



Universitat
de les Illes Balears

GRUP DE NEUROFARMACOLOGIA
INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT
(IUNICS), INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITARIA ILLES BALEARS (IdISBa)
FACULTAT DE CIÈNCIES – DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS CONDUCTUALES INDUCIDOS POR DROGAS
DE ABUSO PSICOESTIMULANTES EN RATAS A
DISTINTAS EDADES DURANTE EL DESARROLLO:
PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL**

Tesis doctoral presentada por
RUBÉN GARCÍA CABRERIZO

Directora
Dra. M. JULIA GARCÍA FUSTER

2019



Universitat
de les Illes Balears

GRUP DE NEUROFARMACOLOGIA
INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT
(IUNICS), INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITARIA ILLES BALEARS (IdISBa)
FACULTAT DE CIÈNCIES – DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

**EFFECTOS CONDUCTUALES INDUCIDOS POR DROGAS
DE ABUSO PSICOESTIMULANTES EN RATAS A
DISTINTAS EDADES DURANTE EL DESARROLLO:
PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL**

Tesis doctoral presentada por
RUBÉN GARCÍA CABRERIZO

Directora
Dra. M. JULIA GARCÍA FUSTER

2019

**DOCTOR POR LA UNIVERSITAT DE LES ILLES
BALEARIS**



Universitat
de les Illes Balears

GRUP DE NEUROFARMACOLOGIA
INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT
(IUNICS), INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITARIA ILLES BALEARS (IdISBa)
FACULTAT DE CIÈNCIES – DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

**EFFECTOS CONDUCTUALES INDUCIDOS POR DROGAS
PSICOESTIMULANTES EN RATAS A DISTINTAS
EDADES DURANTE EL DESARROLLO: PAPEL DE LA
NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL**

Tesis Doctoral presentada por RUBÉN GARCÍA CABRERIZO en el Programa de Doctorado en Neurociencias para optar al grado de Doctor por la Universitat de les Illes Balears. Trabajo realizado en el grupo de Neurofarmacología (IUNICS/IdISBa, UIB) bajo la supervisión de la Dra. M. Julia García Fuster y que cumple con los requisitos para optar al título de Doctor Internacional.

La directora/tutora de la Tesis:
Dra. M. Julia García Fuster

El autor de la Tesis:
Rubén García Cabrerizo

Palma, 2019

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica de un contrato laboral con cargo a un proyecto de investigación financiado por la Fundación Alicia Koplowitz (Ayudas a la investigación en psiquiatría de la infancia y adolescencia y neurociencias en el niño, convocatoria 2014) durante 14 meses (01/01/2015 hasta 29/02/2016) y de una Beca de la Conselleria d'Innovació, Investigació i Turisme del Govern de les Illes Balears i del Fons Social Europeu en el program de formació de doctores (FPI/1793/2015), disfrutada desde el 01/07/2016.

Los trabajos incluidos en la presente Tesis se han financiado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, proyectos 2012/011 (“Complicaciones derivadas del consumo de cocaína durante la adolescencia: Comorbilidad psiquiátrica en el adulto”) y 2016/002 (“Riesgo de vulnerabilidad psiquiátrica en el consumo de cocaína durante la adolescencia: Prevención selectiva mediante tratamiento farmacológico”), así como por la Fundación Alicia Koplowitz (“Neuroadaptaciones inducidas por el consumo de psicoestimulantes durante la adolescencia: Implicaciones para la adicción”), cuya investigadora principal es la Dra. M. Julia García Fuster, que además pertenece como investigadora a la Red de Trastornos Adictivos RD12/0028/0011 y RD16/0017/0010 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).

La presente Tesis Doctoral se presenta en un formato de compendio de artículos de investigación aceptados y publicados. De los resultados obtenidos en la presente Tesis se han derivado las siguientes publicaciones científicas:

1. **García-Cabrerizo R**, García-Fuster MJ: Chronic MDMA induces hippocampal neurotoxicity in adolescent and adult rats: Compensatory down-regulation of apoptotic markers. *NeuroToxicology*, 49: 104-113 (2015).

Factor de impacto: 2,74

Cuartil: Q2

2. **García-Cabrerizo R**, Keller B, García-Fuster MJ: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience*, 304: 302-315 (2015).

Factor de impacto: 3,23

Cuartil: Q2

3. **García-Cabrerizo R**, García-Fuster MJ: Opposite regulation of cannabinoids CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during early adolescence. *Neuroscience Letters*, 615: 60-65 (2016).

Factor de impacto: 2,18

Cuartil: Q3

4. **García-Cabrerizo R**, García-Fuster MJ: Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages. *NeuroToxicology*, 49: 29-39 (2016).

Factor de impacto: 3,1

Cuartil: Q2

5. **García-Cabrerizo R**, Bis-Humbert C, García-Fuster MJ: Methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage following prolonged withdrawal in rats. *NeuroToxicology*, 66: 1-9 (2018).

Factor de impacto: 3,1 (2017)

Cuartil: Q2

- 6. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ:** Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats: Attenuation of c-Fos activation. *Journal of Psychopharmacology*, 33: 154-162 (2019).

Factor de impacto: 4,74 (2017)

Cuartil: Q1

- 7. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ:** Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect and voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal: role of hippocampal FADD. *Addiction Biology*, 24: 239-250 (2019).

Factor de impacto: 5,58 (2017)

Cuartil: Q1 Decil: D1

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. M. Julia García Fuster, como directora de la presente Tesis Doctoral, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar la presente investigación, por depositar su confianza en mí y por su constante apoyo y dedicación al trabajo realizado durante todos estos años.

También quiero agradecer al Dr. Jesús A. García Sevilla su apoyo y el gran ejemplo de dedicación a la investigación que supone verlo cada día. De igual manera me gustaría agradecer al Dr. Juan J. Canales y a la Dra. Aman Asif Malik la oportunidad de haber podido trabajar con ellos ampliando mi formación predoctoral.

Tampoco puedo olvidarme de todos los compañeros del laboratorio de Neurofarmacología de la UIB a lo largo de estos años (Antonio Crespo, Benjamín Keller, María Álvaro, Gloria Salort, Elena Hernández y Cristian Bis) con los que he compartido grandes experiencias y han hecho que este periodo de mi vida vaya a ser difícil de olvidar.

Finalmente, quisiera agradecer el apoyo de todas las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí durante todos estos años y, en especial, al apoyo incondicional de mis padres y mi hermana, que han hecho que pueda llegar hasta donde estoy hoy.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	17
DROGADICCIÓN	19
<i>Ciclo de la adicción a drogas</i>	19
<i>Vulnerabilidad a las drogadicciones</i>	23
La adolescencia como periodo de vulnerabilidad	24
DROGAS PSICOESTIMULANTES	26
<i>La cocaína</i>	27
<i>Los derivados anfetamínicos</i>	27
<i>Mecanismos de acción diferenciales de los psicoestimulantes</i>	28
<i>Efectos crónicos tras la administración de los psicoestimulantes</i>	31
COMORBILIDAD ADICCIÓN-DEPRESIÓN: EFECTOS CONDUCTUALES NEGATIVOS INDUCIDOS POR LOS PSICOESTIMULANTES	33
COMORBILIDAD ADICCIÓN-DEPRESIÓN: NEUROADAPTACIONES INDUCIDAS POR LOS PSICOESTIMULANTES	35
<i>Neurogénesis hipocampal</i>	36
<i>Factores neurotróficos</i>	40
<i>Proteína multifuncional FADD</i>	41
<i>Genes de activación rápida</i>	44
TRATAMIENTOS DURANTE LA ABSTINENCIA A LOS PSICOESTIMULANTES	46
<i>Tratamientos farmacológicos con antidepresivos</i>	46
<i>Tratamientos no farmacológicos con métodos no invasivos de estimulación neuronal</i>	48
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
FÁRMACOS	59
ANTICUERPOS	59
REACTIVOS Y KITS	61
<i>Reactivos utilizados para el WB</i>	61
<i>Reactivos utilizados para el HPLC-ED</i>	62
<i>Reactivos utilizados para la IHC e IF</i>	62
<i>Reactivos utilizados para hibridación in situ (ISH)</i>	62
<i>Reactivos genéricos</i>	63
<i>Kits</i>	64

MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS	64
<i>Material para WB</i>	64
<i>Material para HPLC-ED</i>	64
<i>Material para IHC, IF e ISH</i>	64
<i>Material para el sacrificio de los animales y disección de regiones cerebrales</i>	65
<i>Equipos utilizados</i>	65
PROGRAMAS INFORMÁTICOS	66
ANIMALES	67
TRATAMIENTOS	67
<i>Determinación de la supervivencia celular con el análogo sintético de timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)</i>	68
<i>Inhibición de la proliferación celular basal con el fármaco temozolamida (TMZ)</i>	68
<i>Tratamientos con drogas de abuso psicoestimulantes</i>	69
Tratamientos repetidos con el psicoestimulante cocaína durante diferentes etapas de la adolescencia.....	69
Reexposición aguda a la cocaína durante la etapa adulta.....	69
Tratamientos en régimen de atracón o “binge” con diferentes derivados anfetamínicos	70
Reexposición aguda y repetida a la metanfetamina durante la etapa adulta	70
<i>Aproximaciones terapéuticas mediante la técnica del shock electroconvulsivo (ECS)</i>	71
ENSAYOS CONDUCTUALES	72
<i>Tests para evaluar el fenotipo prodepresivo</i>	72
Evaluación del desespero conductual mediante el test de natación forzada	72
Evaluación de la conducta exploratoria mediante el test del campo abierto	74
Evaluación de la respuesta hedónica mediante el consumo de sacarosa en un modelo de doble elección en botella.....	75
<i>Tests para evaluar el fenotipo proadictivo</i>	76
Evaluación del consumo voluntario de metanfetamina en un modelo de doble elección en botella	76
Condicionamiento de preferencia de lugar por la metanfetamina.....	77
SACRIFICIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS CEREBRALES.....	79
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS DIANA MEDIANTE WESTERN BLOTTING (WB).....	80
<i>Preparación de muestras cerebrales: homogenado total</i>	80
<i>Condiciones experimentales para el WB</i>	82
<i>Sistema de detección y cuantificación de proteínas</i>	85

<i>Reciclado de las membranas de nitrocelulosa (Stripping)</i>	88
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC).....	88
<i>Preparación de la muestra (sampleo y montaje de secciones)</i>	89
<i>Condiciones experimentales para la IHC</i>	90
Proliferación celular endógena (Ki-67).....	90
Supervivencia neuronal temprana (NeuroD).....	91
Supervivencia celular (BrdU).....	92
Actividad neuronal (c-Fos).....	93
<i>Detección y cuantificación de las proteínas</i>	94
PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF).....	96
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE MONOAMINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A UN DETECTOR ELECTROQUÍMICO (HPLC-ED).....	99
<i>Preparación de muestras para HPLC-ED</i>	99
<i>Condiciones experimentales del HPLC-ED</i>	99
<i>Detección y cuantificación de monoaminas y metabolitos</i>	100
DETECCIÓN DE ARNm MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> (ISH)	101
<i>Preparación y marcaje radioactivo de la sonda</i>	102
<i>Condiciones experimentales para la ISH</i>	104
<i>Detección de las sondas marcadas</i>	105
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	106
RESULTADOS	103
ARTÍCULO I.....	109
ARTÍCULO II	125
ARTÍCULO III.....	133
ARTÍCULO IV	145
ARTÍCULO V	159
ARTÍCULO VI	171
ARTÍCULO VII.....	185
ANEXO EXPERIMENTAL I	197
ANEXO EXPERIMENTAL II	205
DISCUSIÓN.....	211
ANTECEDENTES	217

VULNERABILIDAD A LAS ADICCIONES: NEUROADAPTACIONES INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE PSICOESTIMULANTES DURANTE LA ADOLESCENCIA.....	218
<i>La adolescencia temprana-media como un periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por la cocaína</i>	<i>218</i>
<i>La adolescencia tardía como un periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por los derivados anfetamínicos</i>	<i>222</i>
CONSECUENCIAS DERIVADAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PSICOESTIMULANTES: EFECTOS CONDUCTUALES Y MOLECULARES	227
<i>Consecuencias derivadas de la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39).....</i>	<i>227</i>
<i>Consecuencias derivadas de la administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y/o la etapa adulta.....</i>	<i>230</i>
EL ECS MEJORA CIERTOS MARCADORES MOLECULARES ALTERADOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE METANFETAMINA.....	235
CONCLUSIONES	235
BIBLIOGRAFÍA	247

ABREVIATURAS

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético	DMI: desipramina
5-HT: serotonina	DMSO: dimetil sulfóxido
AIF: factor inductor de apoptosis	DOPA: dihidroxifenilalanina
ANOVA: análisis de la varianza	DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético
Amy: amígdala	DPM: desintegraciones por minuto
APS: persulfato amónico	DTT: ditioneitol
ATP: adenosina trifosfato	ECL: electroquimioluminiscencia
Bax: proteína X asociada a Bcl-2	ECS: shock electroconvulsivo
BCA: ácido bicincoónico	ECT: terapia electroconvulsiva
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
BrdU: 5-Bromo-2-desoxiuridina; bromodesoxiuridina	EEG: electroencefalograma
BSA: albúmina bovina sérica	EMG: electromiograma
Cdk-5: quinasa dependiente de ciclina 5	ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
CKIα: caseína quinasa I α	Enolasa-2: fosfopiruvato hidratasa
CPP: condicionamiento de preferencia de lugar	FADD: proteína con dominio de muerte asociada a Fas
CREB: proteína de unión al elemento de respuesta cAMP	FLIP: inhibidor celular proteico de FLICE
CTP: citosina trifosfato	FST: test de natación forzada
Cyt. C: citocromo C	GABA: ácido γ -amino butírico
DA: dopamina	GAD1: glutamato descarboxilasa 1
DAB: 3,3'-diaminobencidina	GAD2: glutamato descarboxilasa 2
DARPP-32: fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y cAMP	GCL: capa granular
DAT: transportador de dopamina	GFAP: proteína gliofibrilar ácida
DCX: doblecortina	GTP: guanina trifosfato
DG: giro dentado	H: hilus
DISC: complejo inductor de señalización de muerte celular	HC: hipocampo
	HIER: exposición del epítipo inducido por calor

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

HRP: peroxidasa de rábano

HVA: ácido homovanílico

IF: inmunofluorescencia

IHC: inmunohistoquímica

IOD: densidad óptica integrada

i.p.: intraperitoneal

ISH: hibridación *in situ*

IUPHAR: Unión Internacional de Farmacología

JNK: quinasa c-Jun N-terminal

LTP: potenciales a largo plazo

NAc: núcleo accumbens

NC: nitrocelulosa

NE: norepinefrina

NET: transportador de norepinefrina

Nf-κB: factor nuclear-κB

NF-H: neurofilamento pesado

NF-L: neurofilamento ligero

NF-M: neurofilamento medio

NSF: período de restricción del alimento

MAOs: monoaminoxidasas

MATs: transportadores para las monoaminas

MDMA: 3,4-metilendioxi metanfetamina

mTOR: diana de rampamicina en células de mamífero

OF: campo abierto

P70-S6K: proteína quinasa ribosomal S6 beta-1

PA: poliacrilamida

PARP-1: polimerasa 1 poli(ADP-ribosa)

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PFC: corteza prefrontal

PND: día postnatal

PSA-NCAM: molécula de adhesión celular neuronal

PSD-95: proteína de densidad postsináptica 95

SDS: sodio dodecil sulfato

SEM: error estándar de la media

SERT: transportador de serotonina

SGZ: zona subgranular

SNC: sistema nervioso central

SSRI: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

SVZ: zona subventricular

TBS: tampón tris-salino

TEMED: tetrametiletilenediamina

TMS: estimulación magnética craneal

TMZ: temozolamida

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

TPH: triptófano hidroxilasa

TrkB: receptor de quinasa B de tropomiosina

VMATs: transportadores de monoaminas vesiculares

VTA: área ventral del tegmento

WB: western blotting

RESUMEN

RESUMEN

La literatura científica sugiere que cuanto más temprano es el inicio en el consumo de drogas más probable es la progresión hacia el abuso y la adicción. Los psicoestimulantes, como la cocaína o los derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y d-anfetamina), son unas de las drogas más consumidas a nivel mundial, iniciándose su consumo durante la adolescencia. Numerosos estudios han demostrado diferencias en los efectos inducidos por las drogas de abuso dependiendo de la edad en la que se inicia el consumo. La adolescencia está considerada como una etapa de cambios tanto a nivel comportamental como molecular, haciendo que sea un periodo de especial susceptibilidad a los efectos neuroquímicos producidos por las drogas de abuso. Durante la adolescencia se ha observado un incremento de los efectos placenteros inducidos por las drogas y una disminución de los efectos negativos durante la abstinencia, pudiendo ser una de las principales causas que potencian su consumo. Además, datos epidemiológicos han puesto de manifiesto que la adolescencia supone un factor de riesgo en el desarrollo de futuras comorbilidades psiquiátricas (adicción-depresión) asociadas a desregulaciones en marcadores de plasticidad (p. ej., neurogénesis hipocampal).

En este contexto, la presente Tesis Doctoral estudió (1) las neuroadaptaciones inducidas durante la adolescencia en ratas después de la administración de diferentes psicoestimulantes (cocaína, MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) para identificar los periodos de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos (p. ej. neurogénesis hipocampal y marcadores de neuroplasticidad), (2) los efectos negativos inmediatos y a largo plazo (p. ej., durante la abstinencia forzada) inducidos por la cocaína o metanfetamina administrada en el periodo de mayor vulnerabilidad adolescente; y (3) los posibles efectos beneficiosos del tratamiento con el shock electroconvulsivo para mejorar las consecuencias negativas a largo plazo a nivel comportamental y molecular inducidas por la administración de metanfetamina durante el periodo de vulnerabilidad adolescente.

Para llevar a cabo estos objetivos, se utilizaron ratas macho adolescentes de la cepa Sprague-Dawley. Además, se realizaron pruebas comportamentales para evaluar el fenotipo prodepresivo (test de natación forzada, campo abierto y test de consumo voluntario de sacarosa) y proadictivo (test de consumo voluntario de droga) inducidos

por la cocaína o metanfetamina. Finalmente, se utilizó una unidad de terapia electroconvulsiva para evaluar las mejoras a nivel comportamental y molecular causadas por el shock electroconvulsivo tras la administración de metanfetamina.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo demostraron un efecto neurotóxico diferencial inducido por las drogas de estudio (cocaína *vs.* derivados anfetamínicos) dependiendo de la edad de administración. Por un lado, se observó una mayor vulnerabilidad durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) tras la administración de cocaína en dos regiones cerebrales. La cocaína desreguló los niveles del marcador multifuncional FADD (*Fas-Associated Death Domain*) a nivel hipocampal (véase Artículo I) y de los receptores cannabinoides en la corteza prefrontal (véase Artículo II). Por otro lado, se observó una mayor vulnerabilidad durante la adolescencia tardía (PND 54-57) tras la administración de los derivados anfetamínicos (véase Artículos III y IV). Durante la adolescencia tardía estas drogas disminuyeron la proliferación y supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo (véase Artículo IV), mostrando cierto grado de insensibilidad o una mejor adaptación a los efectos negativos inducidos por los derivados anfetamínicos durante los primeros estadios de la adolescencia. El segundo objetivo demostró un efecto duradero de las consecuencias negativas inducidas por la administración de cocaína y metanfetamina durante sus respectivos periodos de vulnerabilidad adolescente. En particular, la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) indujo un incremento a largo plazo del desespero conductual (tras una reexposición aguda a la cocaína, PND 71) y de la anhedonia (PND 76-77), asociado a una disminución de la expresión de c-Fos en el estriado dorsal (véase Artículo V). Por otro lado, la administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y la etapa adulta incrementó los efectos negativos tras un largo periodo de abstinencia. Los principales resultados demostraron un incremento del fenotipo prodepresivo (anhedonia) y proadictivos (incremento del consumo voluntario de metanfetamina) (véase Artículo VI) y una disminución de los marcadores para la neurogénesis (véase Artículo VII). Estos resultados sugieren que la administración de ambas drogas (cocaína o metanfetamina) administrada durante los periodos de vulnerabilidad adolescente aumenta la susceptibilidad a sufrir comorbilidades psiquiátricas y adaptaciones neuronales que persisten hasta la etapa adulta, pudiendo ser en parte responsables de las recaídas al consumo (véase Artículo VI, incremento en el consumo voluntario de metanfetamina).

El tercer objetivo demostró que la aplicación del shock electroconvulsivo como tratamiento (véase Anexo Experimental I) mejoró las consecuencias negativas inducidas tras la administración de metanfetamina. En concreto, los resultados indicaron que ratas tratadas con metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y que fueron reexpuestas a la droga durante la etapa adulta (PND 91-95) no mostraron el esperado efecto antidepresivo inducido por el shock electroconvulsivo. En cambio, el tratamiento con el shock electroconvulsivo previno los efectos neurotóxicos inducidos por la metanfetamina sobre la neurogénesis hipocampal, así como sobre el sistema dopaminérgico en el estriado. Estos resultados sugieren un potencial terapéutico de este tratamiento sobre el posible desarrollo de comorbilidades psiquiátricas y en la recaída al consumo durante la abstinencia prolongada a esta droga psicoestimulante.

En conclusión, los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la adolescencia es un periodo de gran vulnerabilidad al consumo de los psicoestimulantes y que la administración de dichas sustancias durante esta etapa vulnerable conlleva al desarrollo de futuras comorbilidades psiquiátricas en la etapa adulta (incremento del fenotipo prodepresivo y proadictivo) asociado a desregulaciones en marcadores de neuroplasticidad (p. ej., neurogénesis hipocampal) que pueden mejorar tras la aplicación de tratamientos no farmacológicos como el shock electroconvulsivo.

RESUM

La literatura científica suggereix que quan abans s'inicia el consum de les drogues més probable és la progressió cap a l'abús i l'addicció. Els psicoestimulants, com la cocaïna o els derivats amfetamínics (MDMA, metamfetamina o d-amfetamina), són uns dels tipus de drogues més consumides a nivell mundial, iniciant-se el seu consum durant l'etapa adolescent. Nombrosos estudis han demostrat una diferència en els efectes induïts per les drogues d'abús depenent de l'edat en la que s'inicia el consum. L'adolescència està considerada com un període de canvis a nivell comportamental i molecular, fent que sigui especialment susceptible als efectes neuroquímics produïts per les drogues d'abús. Durant l'adolescència hi ha un increment dels efectes plaents induïts per les drogues i una disminució dels efectes negatius observats durant l'abstinència, podent ser una de les principals causes potenciadores del consum. A més, dades epidemiològiques han posat de manifest que l'adolescència suposa un factor de risc en el desenvolupament de futures comorbiditats psiquiàtriques (adicció-depressió) associades a desregulacions en marcadors de plasticitat (p. ex., neurogènesi hipocampal).

En aquest context, la present Tesi Doctoral va estudiar (1) les neuroadaptacions induïdes durant l'adolescència a rates després de l'administració de diferents psicoestimulants (cocaïna, MDMA, metamfetamina i d-amfetamina) per identificar el períodes de major vulnerabilitat als efectes neurotòxics (p. ex., neurogènesi hipocampal i marcadors de neuroplasticitat), (2) els efectes negatius immediats i a llarg termini (p. ex., durant l'abstinència forçada) induïts per la cocaïna o la metamfetamina administrada durant el període de major vulnerabilitat adolescent; i (3) el possible efecte beneficiós del tractament amb el xoc electroconvulsiu per millorar les conseqüències negatives a llarg termini a nivell comportamental i molecular induïdes per l'administració de metamfetamina durant el període de vulnerabilitat adolescent.

Per aconseguir aquests objectius, es va utilitzar un model de rata mascle adolescent del cep Sprague-Dawley. A més, es van realitzar proves comportamental per evaluar el fenotip prodepressiu (test de natació forçada, camp obert i test de consum voluntari de sacarosa) i proadictiu (test de consum voluntari de droga) induïts per la cocaïna o metamfetamina. Finalment, es va utilitzar una unitat de teràpia electroconvulsiva per avaluar les millores a nivell comportamental i molecular causades per el xoc electroconvulsiu després de l'administració de metamfetamina.

Els resultats al primer objectiu van demostrar un efecte neurotòxic diferencial induït per les drogues d'estudi (cocaïna *vs.* derivats amfetamínics) dependent de l'edat d'administració. Per una banda, es va observar una major vulnerabilitat durant l'adolescència primerenca-mitjana (dia post natal, PND 33-39) després de l'administració de cocaïna a dues regions cerebrals diferents. La cocaïna va desregular el marcador multifuncional FADD (*Fas-Associated Death Domain*) a nivell hipocampal (vegeu Article I) i els receptors cannabinoides a l'escorça prefrontal (vegeu Article II). Per altra banda, es va observar una major vulnerabilitat durant l'adolescència tardana (PND 54-57) després de l'administració dels derivats amfetamínics (vegeu Articles III i IV). Durant l'adolescència tardana aquestes drogues van disminuir la proliferació i supervivència cel·lular en el gir dentat de l'hipocamp (vegeu Article IV). Aquests resultats van demostrar cert grau de insensibilitat o una millor adaptació als efectes negatius induïts pels derivats amfetamínics durant el primer estadi de l'adolescència. El segon objectiu va mostrar un efecte persistent de les conseqüències negatives induïdes per l'administració de cocaïna i metamfetamina durant els seus respectius períodes de vulnerabilitat adolescent. En particular, l'administració de cocaïna durant l'adolescència primerenca-mitjana (PND 33-39) va induir un increment del desesfer conductual (després de la reexposició aguda a la cocaïna, PND 71) i de l'anhedonia (PND 76-77), associat a una disminució de l'expressió de c-Fos a l'estriat dorsal (vegeu Article V). D'altra banda, l'administració de metamfetamina durant l'adolescència tardana (PND 54-57) i l'etapa adulta va incrementar els efectes negatius després d'un llarg període d'abstinència. Els principals resultats van mostrar un increment del fenotip prodepressiu (anhedonia) i proadictiu (increment del consum voluntari de metamfetamina) (vegeu Article VI) i una disminució de marcadors per a la neurogènesi (vegeu Article VII). Aquests resultats suggereixen que ambdues drogues (cocaïna i metamfetamina) administrades durant els períodes de vulnerabilitat adolescent augmenten la susceptibilitat a sofrir comorbiditats psiquiàtriques i adaptacions neuronals que persisteixen fins l'etapa adulta, podent ser en part responsables de les recaigudes al consum (vegeu Article VI, increment del consum voluntari de metamfetamina). El tercer objectiu va demostrar que l'aplicació del xoc electroconvulsiu com a tractament (vegeu Annex Experimental I) millora les conseqüències negatives induïdes per l'administració de metamfetamina. En concret, els resultats van indicar que rates tractades amb metamfetamina durant l'adolescència tardana (PND 54-57) que varen ser reexposades a la droga durant l'etapa adulta (PND

91-95) no mostraren l'esperat efecte antidepressiu produït pel xoc electroconvulsiu. En canvi, el tractament amb el xoc electroconvulsiu va prevenir els efectes neurotòxics induïts per la metamfetamina sobre la neurogènesi hipocampal, així com sobre el sistema dopaminèrgic en l'estriat. Aquests resultats suggereixen un potencial terapèutic d'aquest tractament sobre el possible desenvolupament de comorbiditats psiquiàtriques i en la recaiguda al consum durant l'abstinència prolongada a aquesta droga psicoestimulant.

En conclusió, els resultats mostrats a la present Tesi Doctoral posen de manifest que l'adolescència és un període de vulnerabilitat al consum dels psicoestimulants i que l'administració d'aquestes substàncies durant l'etapa vulnerable comporta el desenvolupament de futures comorbiditats psiquiàtriques en l'etapa adulta (increment del fenotip prodepressiu i proadictiu) associat a desregulacions en marcadors de neuroplasticitat (p. ex., neurogènesi hipocampal) que poden millorar després de l'aplicació de tractaments no farmacològics com el xoc electroconvulsiu.

ABSTRACT

The literature suggests that early drug use is a key factor for later progression to abuse and addiction. Psychostimulants, such as cocaine or amphetamine-like compounds (MDMA, methamphetamine or d-amphetamine), are one of the most widely drugs consumed worldwide, beginning their consumption during adolescence. Numerous studies have shown a difference in the effects induced by drugs of abuse depending on the age of drug initiation. Adolescence is a period of great change at the behavioral and molecular levels, which is more susceptible to the neurochemical effects of specific drugs of abuse. A potential cause of early drug consumption during adolescence could be explained by the observed increase in the pleasant effects and the decrease in the negative effects during abstinence induced by these drugs. Moreover, epidemiological data show that adolescence is a risk factor in the development of future psychiatric comorbidities (addiction-depression) associated with the dysregulation of neuroplasticity markers (i. e., hippocampal neurogenesis).

In this context, the present Doctoral Thesis studied in rats: (1) whether there was a vulnerable age period during adolescence in which different psychostimulants (cocaine, MDMA, methamphetamine and d-amphetamine) induced neurotoxic effects (i. e., hippocampal neurogenesis and neuroplasticity markers); (2) the immediate and prolonged negative effects (i. e., emerging during forced abstinence) induced by cocaine or methamphetamine when administered during the vulnerable period; and (3) the possible beneficial effects of an electroconvulsive shock treatment on improving the long-term negative behavioral and molecular consequences caused by methamphetamine administration during the vulnerable period.

To achieve these objectives, adolescent male Sprague-Dawley rats were used. Different behavioral tests were performed to determine the pro-depressive (forced-swim test, open field, voluntary sucrose consumption) and pro-addictive (voluntary drug consumption) phenotypes induced by cocaine or methamphetamine. Finally, an electroconvulsive therapy unit was used to improve the negative behavioral and molecular consequences induced by methamphetamine administration.

The results from the first objective demonstrated a differential neurotoxic effect induced by cocaine *vs.* amphetamine-like compounds depending on the age period of adolescence administration. On the one hand, a greater vulnerability period was

observed during early-mid adolescence (post-natal day, PND 33-39) after cocaine administration in two cerebral regions. Cocaine dysregulated the multimodal protein FADD (*Fas-Associated Death Domain*) in the hippocampus (see Article I) and the cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂) in the prefrontal cortex (see Article II). On the other hand, a greater vulnerability period was observed during late adolescence (PND 54-57) by amphetamine-like drugs (MDMA, methamphetamine and d-amphetamine) (see Article III and IV). During late adolescence, these drugs decreased cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of the hippocampus (see Article IV). These data demonstrate certain degree of insensitivity or a better adaptation to the negative effects induced by these amphetamine-like compounds during the early stages of adolescence. The second objective showed persistent negative consequences after cocaine and methamphetamine administration during their respective windows of adolescent vulnerability. In particular, cocaine administration (PND 33-39) induced an increase in behavioral despair (after an acute cocaine re-exposure on PND 71) and anhedonia (PND 76-77), associated with a decrease in the expression of c-Fos in the dorsal striatum (see Article V). On the other hand, methamphetamine administration during late adolescence (PND 54-57) or adulthood exerted negative effects during abstinence such as the observed increase in pro-depressive (anhedonia) and pro-addictive (increase voluntary methamphetamine consumption) phenotypes (see Article VI) and the decrease in neurogenic markers (see Article VII). Taken together, both drugs (cocaine and methamphetamine) when administered during the vulnerable period increased the susceptibility to develop psychiatric comorbidities and neuronal adaptations that persist into adulthood, which could be responsible for relapse (see Article VI, increase of the voluntary methamphetamine consumption). The third objective demonstrated that an electroconvulsive shock treatment (see Experimental Annex I for technical characterization) improved the long-term consequences induced by methamphetamine. In particular, the results indicated that rats treated with a history of methamphetamine administration during late adolescence (PND 54-57) and later re-exposed to the drug in adulthood (PND 91-95) did not show the expected antidepressant-like effects induced by the electroconvulsive shock treatment (see Experimental Annex II). Moreover, the neurotoxic effects induced by methamphetamine on hippocampal neurogenesis, as well as on the dopaminergic system in the striatum, were prevented by the electroconvulsive shock. These results suggest a

potential therapeutic effect for this treatment on preventing the development of psychiatric comorbidities and on relapse during prolonged abstinence.

In conclusion, the data presented in this Doctoral Thesis demonstrate that adolescence is a period of great vulnerability to the negative effects induced by early psychostimulant consumption. Moreover, the administration of cocaine and/or methamphetamine during adolescence leads to the development of psychiatric comorbidities in adulthood (increased pro-depressive and pro-addictive phenotypes) associated with dysregulations of neuroplasticity markers (i. e., hippocampal neurogenesis). The negative effects induced by adolescent methamphetamine later on in adulthood are partly improved by a therapeutic treatment such as electroconvulsive shock.

INTRODUCCIÓN

DROGADICCIÓN

Ciclo de la adicción a drogas

La adicción a drogas de abuso es un desorden crónico caracterizado por (1) la búsqueda compulsiva y consumo de la droga, (2) la pérdida del control en su consumo y (3) la aparición de síntomas negativos de carácter emocional (disforia, ansiedad e irritabilidad) cuando se detiene el consumo (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, 5ª edición). Se conoce que la adicción a las drogas no es un proceso estático, el consumo progresa de la impulsividad a la compulsividad diferenciando una serie de componentes que constituyen un círculo o ciclo de patología creciente (Baumeister et al., 1994). A este círculo denominado ciclo de la adicción a drogas se le han descrito tres componentes que son: el estado de atracción o intoxicación, el estado de abstinencia o síntomas negativos emocionales y el estado de preocupación o anticipación.

La Figura 1 muestra los mecanismos implicados en el desarrollo de una adicción a drogas que se describen a continuación.

	Consumo de la droga		Abstinencia de la droga	
Estado producido	Estado de intoxicación aguda	Estado de intoxicación crónica	Abstinencia aguda	Abstinencia crónica
	Días-semanas →		Meses-años →	
Efecto	Recompensa	Tolerancia, dependencia	Síndrome de abstinencia	Deseo intenso
Mecanismo	Activación de la vía DA mesolímbica ¿Otras vías de recompensa?	Cambios adaptativos de receptores, transportadores y segundos mensajeros	Cambios adaptativos descompensados	Alteraciones de la plasticidad sináptica (↑DLP y PLP)

Figura 1. Mecanismos implicados en la drogadicción donde se muestran los efectos asociados al consumo y la abstinencia de las drogas de abuso. Imagen tomada de Rang y Dale (2016).

El estado de atracción o intoxicación a las drogas de abuso se inicia debido a las propiedades hedónicas de los compuestos. Las propiedades reforzantes que ejercen las drogas son debidas a la gran capacidad que tienen de liberar enormes cantidades de dopamina (DA) al espacio extraneuronal en regiones del sistema límbico y el cuerpo estriado produciendo estados de placer, excitación y euforia (Volkow et al., 1997). Los efectos placenteros originados en el sistema de recompensa están asociados a distintas estructuras cerebrales (véase Figura 2). La vía de la recompensa se inicia gracias a la activación de neuronas dopaminérgicas localizadas en el área ventral del tegmento (VTA), que proyectan al núcleo accumbens (NAc), la corteza prefrontal (PFC) y la

amígdala (Amy), donde se libera la DA promoviendo el aprendizaje y la sensación de placer.

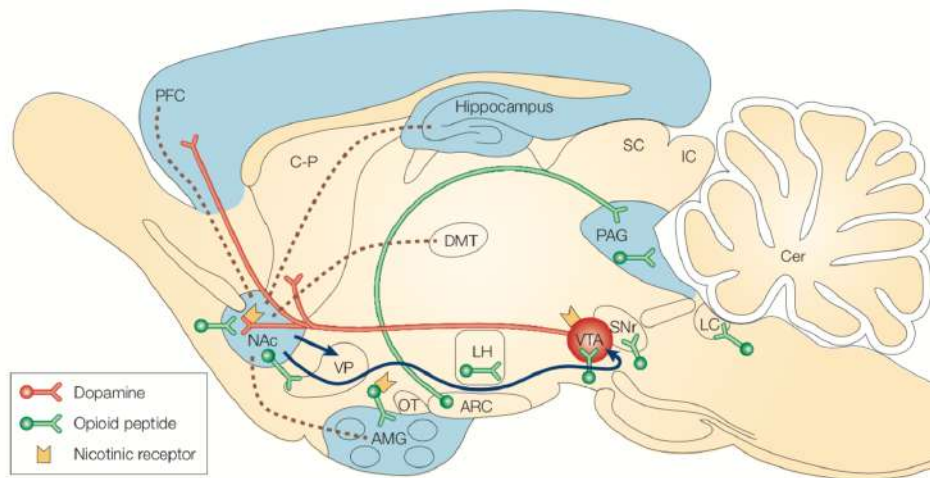


Figura 2. Corte sagital de cerebro de roedor ilustrando los circuitos neuronales claves en la adicción como es el sistema mesolímbico. Las neuronas dopaminérgicas del área ventral del tegmento (VTA) proyectan al núcleo accumbens (NAc) y otras regiones del sistema límbico como el caudado putamen (C-P) o la corteza prefrontal (PFC). Las líneas punteadas indican las vías aferentes del sistema límbico hacia el NAc. Las flechas azules representan las vías eferentes del NAc que participan en el refuerzo de las drogas. Las líneas rojas representan las proyecciones del sistema mesolímbico implicado en la recompensa y el refuerzo positivo. Las líneas verdes indican vías del sistema opioide. Las regiones cerebrales descritas son las siguientes: corteza prefrontal (PFC); núcleo accumbens (NAc); caudado putamen (C-P), pálido ventral (VP); amígdala (AMG); tubérculo olfatorio (OT); tálamo dorsomedial (DMT); núcleo arcuato (ARC); hipotálamo lateral (LH); área ventral del tegmento (VTA); sustancia negra pars compacta (SNr); sustancia gris periacueductal (PAG); colículo superior (SC); colículo inferior (IC); locus coeruleus (LC); cerebelo (Cer). Imagen tomada de Nestler (2001).

La percepción de dichos estados varía en función de la velocidad de liberación de la DA, es decir, cambios rápidos producen grandes efectos reforzantes mientras que cambios pequeños no producen esta respuesta. Además, existen diferencias en la liberación de DA por estímulos naturales y por las sustancias adictivas como las drogas. Las drogas de abuso tienen la habilidad de inducir liberaciones de DA de mayor amplitud y duración que las inducidas por los estímulos naturales. Además, las propiedades farmacocinéticas de cada droga como la velocidad de actuación en el sistema nervioso central (SNC) y la duración de los efectos, son elementos clave para determinar su potencial de adicción (Volkow y Swanson, 2003). Sí el consumo es excesivo y prolongado, se entra en la fase de intoxicación crónica (Véase Figura 1), donde aparece una posible tolerancia a los efectos agudos inducidos por la droga al igual que un estado de dependencia a la sustancia adictiva. Una vez pasada la fase de intoxicación (agudo y/o crónica), se produce el denominado estado de abstinencia, caracterizado por la aparición de disforia, irritabilidad, distrés emocional, ansiedad o

estados depresivos que perduran incluso en estados de abstinencia prolongados (véase Figura 1). Durante las fases iniciales de la abstinencia, se observan adaptaciones en dianas moleculares concretas dependiendo del tipo de droga. Una vez normalizados los cambios producidos en la fase inicial, aparecen los efectos asociados a la abstinencia prolongada. En esta fase, se producen cambios más duraderos como hipofunciones de las vías monoaminérgicas, internalización de receptores y disminuciones en la liberación de neurotransmisores asociados al aumento de síntomas negativos de carácter emocional como la anhedonia (Martinez et al., 2004). En muchos casos, estímulos asociados al consumo de la droga, así como los propios efectos negativos presentes durante la abstinencia, pueden provocar la recaída al consumo. Este estado de preocupación o anticipación al consumo durante la abstinencia provoca la vuelta al consumo de la droga, haciendo que la adicción sea considerada un trastorno crónico y de difícil solución.

Aunque el sistema de recompensa es una pieza clave en la adicción a drogas, otras estructuras como el hipocampo muestran su potencial papel en la adicción (véase Figura 2). Esta estructura tiene un papel importante en funciones como el aprendizaje y la memoria espacial, además de ser la reguladora del humor. Asimismo, varias evidencias sugieren que el hipocampo contribuye a la formación de memorias asociadas al contexto de la droga. Su emergente papel en los procesos adictivos se debe a que se han descubierto conexiones entre el hipocampo y el sistema de recompensa (Koob y Volkow, 2010). El hipocampo recibe conexiones de estructuras clave de este sistema como el VTA, y envía conexiones a estructuras como el NAc y el PFC, encontrándose en una posición privilegiada para influir en los efectos tanto agudos como crónicos de las drogas de abuso (Hyman et al., 2006). El NAc integra información motivacional y afectiva, por lo que el hipocampo actúa como un importante mediador en los efectos inducidos por las drogas de abuso (p. ej., psicoestimulantes), actuando sobre el sistema dopaminérgico en el NAc. La administración repetida de diversas drogas produce adaptaciones comportamentales a largo plazo, como la tolerancia y la sensibilización (Stewart y Badiani, 1993). Estudios previos han demostrado que la inactivación de la parte dorsal del hipocampo, previene el fenómeno de sensibilización inducido por las anfetaminas (Degoulet et al., 2008), evidenciando el papel del hipocampo en los comportamientos inducidos por las drogas. Un paradigma comportamental muy utilizado que caracteriza el papel del hipocampo en la formación de memorias asociadas

al contexto es el condicionamiento de preferencia de lugar (CPP: *Conditioned Place Preference*). Esta tarea de condicionamiento Pavloviano se lleva a cabo en dos compartimentos donde los animales aprenden a diferenciar entre el compartimento en el que reciben la droga y en el que no, produciendo una preferencia clara por el compartimento en el que se recibe la sustancia adictiva, indicando las propiedades reforzantes del compuesto (Tzschentke, 2007). Multitud de experimentos en el CPP han revelado la importancia del giro dentado del hipocampo en la asociación de la memoria, el contexto y los efectos hedónicos o aversivos (Hernández-Rabaza et al., 2008). Estos datos se han visto reforzados gracias a la inactivación del hipocampo con el muscimol (agonista GABA_A) que es capaz de bloquear el efecto del condicionamiento en el CPP (Raybuck y Lattal, 2014). Esto demuestra la importancia de la activación del hipocampo en la consolidación de memorias asociadas al contexto, como se ha observado también en algunos experimentos tras la reexposición a determinados estímulos provocando la expresión de genes de expresión rápida como el *c-fos*, asociados a la actividad neuronal en el giro dentado (Rivera et al., 2015). En paradigmas de autoadministración donde se evalúa el consumo voluntario de droga y los fenómenos de recaída, también se ha puesto de manifiesto el importante papel del hipocampo. La inhibición del subículum dorsal con lidocaína ha demostrado reducciones en el consumo de cocaína durante la fase de mantenimiento (Black et al., 2004). En la misma línea, se ha demostrado en estudios de resonancia magnética con ratas que la autoadministración de cocaína reduce el metabolismo en la corteza prefrontal, NAc y el hipocampo (Gozzi et al., 2011). Además, se ha asociado el período de abstinencia tras la autoadministración de cocaína con alteraciones en los potenciales a largo plazo (LTP: *Long-Term Potentiation*) que pueden durar hasta 100 días tras la última administración (Thompson et al., 2004). Los fenómenos de recaída tras el consumo también están influenciados por el hipocampo. Inyecciones bilaterales de baclofeno (agonista del receptor GABA_B) en la parte ventral del hipocampo atenúan la búsqueda compulsiva de la droga (tras la exposición a estímulos asociados al consumo como tras la inyección aguda de cocaína) (Rogers y See, 2007). Todos estos datos demuestran que no solo la vía tradicional de la recompensa juega un papel importante en la adicción, sino que áreas del sistema límbico, como el hipocampo, pueden modular parte de estas respuestas que favorecen la persistencia del ciclo adictivo.

Vulnerabilidad a las drogadicciones

Estudios realizados en humanos (Dawes et al., 2000) y en animales de experimentación (Barr et al., 2004) sugieren que el inicio temprano en el consumo de drogas y su posterior desarrollo hacia una conducta adictiva son consecuencia de una interacción entre la genética, el ambiente y la psicopatología de cada individuo. El inicio del consumo de drogas suele producirse durante la adolescencia (UNODC, 2018), razón por la que focalizar los estudios sobre el consumo de estas sustancias en esta etapa crucial durante el desarrollo es de vital importancia para comprender la progresión hacia el abuso y la adicción.

Actualmente, las investigaciones sobre las adicciones se centran en intentar comprender los mecanismos neuroadaptativos y los circuitos implicados que median la transición entre un consumo ocasional y controlado de las drogas hacia el abuso y la pérdida del control que define la adicción como una enfermedad crónica. Se han postulado diversos factores que pueden contribuir a una mayor predisposición al desarrollo de una adicción. La genética es uno de los factores propuestos como posible desencadenante de la adicción. La compleja influencia de la genética sobre la adicción a drogas se ha determinado en diversos estudios realizados en gemelos (monocigóticos y dicigóticos), que han convivido juntos o separados (adopciones) y que viven con familiares directos o lejanos. Los resultados muestran un importante peso de la carga genética en la dependencia al consumo (Koob y Le Moal, 2006), contribuyendo a las diferencias individuales. La expresión de la predisposición genética a la dependencia puede estar en parte condicionada por determinados factores ambientales. En este caso, los estudios con gemelos demuestran que el ambiente familiar, maltratos, abusos y el estrés pueden desencadenar el desarrollo de conductas adictivas (Antelman et al., 1980). Por otro lado, estudios epidemiológicos revelan que las diferencias de género también pueden ser otro factor de vulnerabilidad importante. Las mujeres son más susceptibles que los hombres a desarrollar una dependencia a distintas sustancias adictivas, indicativo de una progresión más rápida, a pesar de haber un menor porcentaje de mujeres adictas en comparación a los hombres (UNODC, 2018). Estos hallazgos concuerdan con los estudios realizados en animales donde se ha demostrado que los estrógenos pueden estar implicados en una mayor vulnerabilidad a iniciar el consumo de la droga (Carroll et al., 2004) así como a sufrir mayores índices de recaídas (Larson et al., 2005).

La adolescencia como periodo de vulnerabilidad

La adolescencia es considerada como una etapa de transición, que se caracteriza por una serie de cambios a nivel comportamental, neuronal y hormonal. Aunque suele pensarse que la adolescencia es una fase exclusiva en el desarrollo de los humanos, se encuentra presente en todas las especies de mamíferos y tiene un papel muy importante en el proceso de transición de la dependencia paterna a la independencia como individuo (Spear, 2000). Dado que los cambios observados en la adolescencia humana muestran numerosas similitudes con los observados en el resto de mamíferos, se supone que estos cambios se encuentran evolutivamente conservados entre las especies (Doremus-Fitzwater et al., 2010), permitiendo la realización de estudios durante la adolescencia en animales de experimentación. Los días post natales (PND) que engloban las distintas etapas de la adolescencia en roedores varían entre los estudios realizados en la literatura científica (Yetnikoff et al., 2014), aunque en la mayoría de estudios realizados se ha dividido la adolescencia en tres fases, diferenciando la adolescencia temprana (PND 21-34), la adolescencia media (PND 34-46) y la adolescencia tardía (PND 46-59) (Burke y Miczek, 2014). En general, la edad prototípica para los estudios en la etapa adolescente en roedores se ha considerado como la comprendida entre PND 28-42 (Sengupta, 2013). Estas fases de la adolescencia en roedores van en paralelo a las etapas del desarrollo en humanos (véase Figura 3), tal y como derivan estudios publicados (Wills et al., 1996; Braet et al., 2013), permitiendo estudiar en animales de experimentación los efectos neurobiológicos que median los efectos reforzantes de las drogas, los estímulos sociales, las modulaciones medioambientales, así como las adaptaciones neuronales producidas que elevan la predisposición al consumo de las drogas y sus consecuencias a largo plazo (Spear, 2000).

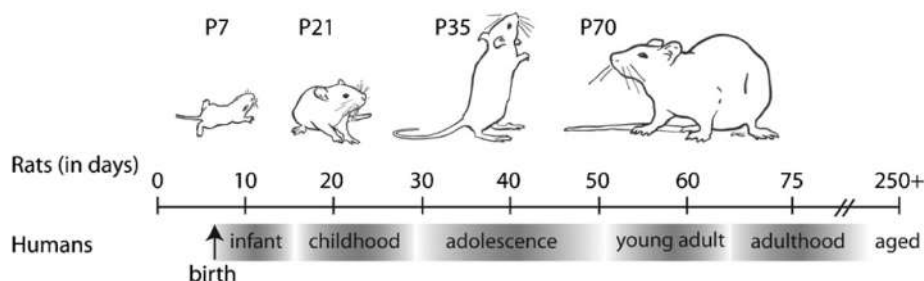


Figura 3. Comparación de los diferentes estadios en el desarrollo del cerebro humano y de rata. Imagen tomada de Counotte et al., (2011).

Durante la adolescencia, los cambios más significativos a nivel comportamental son un incremento de las interacciones sociales con individuos de la misma edad y un aumento de la búsqueda de estímulos novedosos. El incremento de las interacciones ayuda al desarrollo de las habilidades sociales fuera del ámbito familiar, necesarias durante la etapa independiente (Arnett, 1995). Por otro lado, el aumento de la búsqueda de estímulos novedosos favorece el ímpetu y la toma de riesgos por explorar nuevas áreas alejadas de la zona familiar, favoreciendo la colonización de nuevos hábitats, obtención de alimentos e interacción con compañeros de otras comunidades (Arnett, 1992). Esta toma de riesgos por experimentar estímulos novedosos está asociada con los efectos reforzantes inducidos por las sustancias adictivas (Arnett, 1994) y se ha identificado como una pieza clave en el consumo y el abuso de drogas durante la adolescencia (Laviola et al., 2003).

Datos epidemiológicos han demostrado que cuanto más temprano es el inicio en el consumo de las drogas mayor es la probabilidad de progresar hacia el abuso y la adicción. Numerosos estudios han puesto su foco de atención en esta cuestión y han determinado una mayor sensibilidad a los efectos placenteros tanto de sustancias naturales (Vaidya et al., 2004) como adictivas (Vastola et al., 2002; Belluzzi et al., 2004) durante la etapa adolescente en comparación con la adulta. También se ha demostrado una cierta insensibilidad a los estímulos aversivos producidos durante la abstinencia en la adolescencia tras el consumo de drogas (Little et al., 1996; Elliott et al., 2004; Varlinskaya y Spear, 2004; Schramm-Sapyta et al., 2007). Estos resultados sugieren que los efectos experimentados por el consumo de drogas durante la adolescencia son diferentes a los experimentados en la etapa adulta. El aumento de los efectos placenteros y la disminución de los efectos negativos durante la abstinencia observados en la adolescencia pueden presentarse como una de las principales causas potenciadoras del consumo, por lo que se ha postulado que las diferencias observadas en el desarrollo y la maduración de los circuitos cerebrales durante la adolescencia (como las vías de recompensa o las neuroadaptaciones en el hipocampo) pueden tener un papel primordial en el posterior desarrollo de una adicción.

DROGAS PSICOESTIMULANTES

Los psicoestimulantes se definen como drogas con potencial de abuso que incrementan la activación del SNC a nivel motor y cognitivo, capaz de producir efectos neuroplásticos que pueden desencadenar en una dependencia al consumo. Como se ha comentado anteriormente, el consumo de dichas sustancias produce alteraciones en el sistema mesolímbico y en las vías de recompensa (véanse Figuras 1 y 2), desencadenando un síndrome de abstinencia asociado a un aumento en la hipersensibilidad al estrés, búsqueda compulsiva de la droga, ansiedad y disforia entre otros, incluyendo una recaída al consumo y manteniendo el ciclo adictivo (véase Figura 1). El abuso de los psicoestimulantes afecta a millones de personas ya que son una de las drogas más consumidas a nivel mundial (UNODC, 2018). Además, son drogas recreacionales muy consumidas durante la adolescencia o al inicio de la etapa adulta (UNODC, 2018), y que afectan, tanto a nivel neuroquímico como comportamental, de manera diferencial dependiendo de la edad en la que se administran (Vorhees et al., 2005). En la presente Tesis Doctoral se han evaluado los efectos inducidos por diversas drogas ilícitas psicoactivas como la cocaína y los derivados anfetamínicos más consumidos como son el 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), la metanfetamina y la d-anfetamina (véase estructura química, Figura 4). A pesar de que estos psicoestimulantes como la cocaína y los derivados anfetamínicos interactúan con los transportadores para las monoaminas (MATs), debido a sus similitudes estructurales con los neurotransmisores monoaminérgicos, los mecanismos de acción y las dianas con las que interactúan son diferentes entre sí.

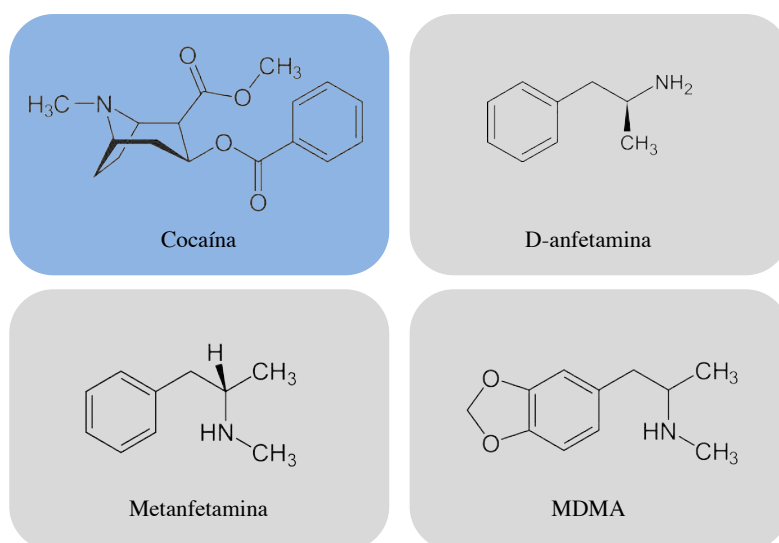


Figura 4. Estructura química de los distintos psicoestimulantes utilizados en la presente Tesis Doctoral.

La cocaína

La cocaína (benzoilmetilecgonina) es un alcaloide obtenido de las hojas de *Erythroxylon coca*. La planta es originaria de la zona tropical Andina y crece en zonas cálidas y húmedas a una altura de entre 500 y 1500 metros sobre el nivel del mar (Grinspoon y Bakalar, 1981). Se estima que el consumo de dicho alcaloide podría datarse del año 3000 a.C. El compuesto era utilizado para diversos ritos o tradiciones de los indígenas nativos y según la mitología inca, el hijo del sol, le regaló al ser humano la planta de coca para paliar el hambre y la fatiga. Los nativos masticaban la hoja de la planta de coca junto con cal y cenizas para extraer el alcaloide (mameo) y así poder resistir las duras condiciones laborales a elevadas altitudes junto a una dieta pobre e insuficiente. Sin embargo, no fue hasta 1859 cuando el farmacéutico y químico Albert Niemann aisló la forma cristalina de la cocaína y unos años después pasó a utilizarse como anestésico en la cirugía oftalmológica. A pesar de la utilización de la cocaína en cirugías o en tónicos y bebidas como la Coca-Cola, gran parte de su uso fue destinado a fines recreativos. En 1884 el neurólogo austriaco Sigmund Freud publicó la monografía denominada *Über coca* en la que aconsejaba el uso de la cocaína para tratar la depresión, alcoholismo, adicción a la morfina, asma, problemas gastrointestinales y la ansiedad (Freud, 1984). Freud intentó tratar con cocaína la adicción a la morfina de su amigo Von Fleishl, que acabó adicto a la cocaína y experimentó el primer caso documentado de psicosis inducido por esta droga denominado *delirium tremens*. A pesar de que los descubrimientos publicados por Freud a nivel fisiológico y psicológico de los efectos de la cocaína fueron muy importantes, sus afirmaciones sobre que era un compuesto que no producía ningún tipo de adicción fueron rápidamente rechazadas a finales del siglo XIX. Gracias a la publicación de varios artículos científicos sobre los efectos toxicológicos de la cocaína, lograron que fuera declarada ilegal en el año 1914.

Los derivados anfetamínicos

Las anfetaminas son compuestos simpaticomiméticos adrenérgicos que muestran un potente efecto estimulante en el SNC. Las primeras referencias al consumo de estas sustancias datan del 3000 a.C. en la actual China, donde se utilizaban bayas rojas procedentes de plantas coníferas y efedras (*Ephedra sínica*) como remedio para tratar el asma. La anfetamina fue sintetizada por primera vez por el químico rumano Lazar Edeleanu en el año 1887, pero no fue hasta 1927 cuando Gordon Alles sintetizó y

descubrió que la forma dextrógira (d-anfetamina) tenía la capacidad de estimular el SNC (Alles y Prinzmetal, 1933). En el año 1932, se comercializó el uso de la anfetamina como inhalador para el asma y la congestión nasal (Anón, 1937), pero no fue hasta más tarde cuando le atribuyeron nuevas aplicaciones como el tratamiento para la obesidad, cansancio, narcolepsia, depresión, etc. Además de las aplicaciones terapéuticas iniciales de estos compuestos sintéticos, las anfetaminas fueron ampliamente utilizadas en multitud de conflictos bélicos para aumentar el estado de vigilia y disminuir el cansancio de los soldados en el campo de batalla, iniciándose el consumo de estas sustancias en la Guerra Civil Española y sufriendo una gran expansión generalizada durante la Segunda Guerra Mundial. Los derivados de estos compuestos químicos (p. ej., MDMA, MDA, MDE, metanfetamina, d-anfetamina) fueron denominados en los años sesenta por el farmacólogo Gary Henderson como drogas de diseño. Denominó así a los compuestos de origen sintético de fabricación clandestina con fines recreativos que presentan estructuras y propiedades similares a las drogas ilegales. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en estudiar el MDMA, la metanfetamina y la d-anfetamina ya que son los tres derivados anfetamínicos más consumidos en la actualidad (véase Figura 4) y son consideradas drogas de diseño ilícitas, debido a que muestran propiedades euforizantes, estimulantes, con un alto potencial de abuso y, en el caso del MDMA, con efectos entactógenos y/o empatogénicos. Actualmente, sólo se utilizan en clínica los derivados anfetamínicos como el metilfenidato para el tratamiento del déficit de atención en niños.

Mecanismos de acción diferenciales de los psicoestimulantes

La cocaína es una base débil ($pK_a= 8,6$) con una gran capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y las membranas celulares. Se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta (sin actuar de manera directa sobre los receptores) aumentando la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica (véase Figura 5). El principal mecanismo de eliminación de éstos en la hendidura lo llevan a cabo los transportadores para las monoaminas (MATs), y son específicos para cada tipo de neurotransmisor. A pesar de que la cocaína actúa como un inhibidor de estos transportadores de membrana para los distintos neurotransmisores monoaminérgicos, tiene una especial afinidad por los transportadores de dopamina (DAT) y norepinefrina (NET) (Fowler et al., 2001). La elevada similitud estructural de la cocaína con la DA, permite la unión de la cocaína con el transportador DAT

provocando una inhibición competitiva con la dopamina endógena. Diversos modelos han determinado que los lugares de unión de la cocaína por el transportador DAT residen en los segmentos transmembrana 1, 3, 6 y 8 solapando con los lugares de unión para la propia DA o para otros compuestos como las anfetaminas (Beuming et al., 2008). El bloqueo de la receptación de DA por parte de la cocaína aumenta su biodisponibilidad en la hendidura y media el mecanismo de euforia agudo tras la administración (Bagchi y Reilly, 1983), estimulando la transmisión dopaminérgica.

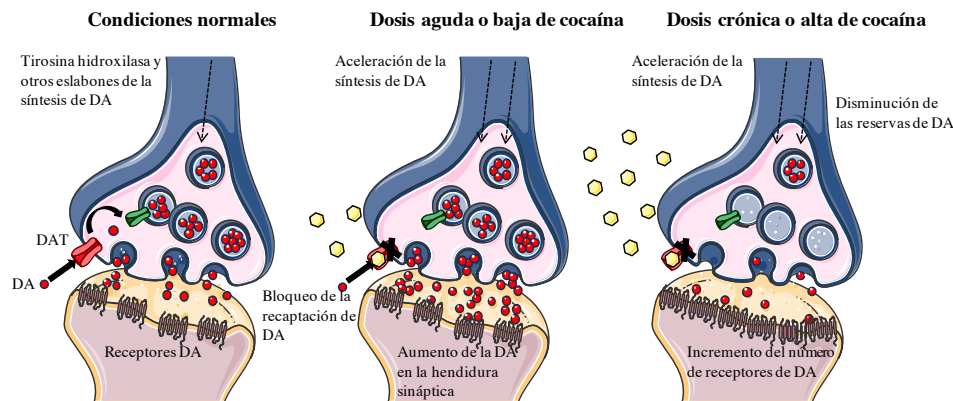


Figura 5. Efectos de la administración de cocaína en neuronas dopaminérgicas. Imagen diseñada a partir de Henry y Jeffry (1990).

Por otro lado, los derivados anfetamínicos (p. ej., d-anfetamina, metanfetamina, MDMA) también tienen una gran capacidad de interactuar con los transportadores de monoaminas en el SNC, debido a las similitudes estructurales que presentan con los neurotransmisores de monoaminas (véase Figura 6) (Rothman y Baumann, 2003). Estos compuestos bloquean la recaptación de los transportadores MATs, favoreciendo la acumulación de los neurotransmisores en la hendidura sináptica (Sulzer et al., 1995). Una de las características diferenciales del mecanismo de acción de las anfetaminas en comparación al de la cocaína es que, además de bloquear los MATs, actúan como lo haría el propio neurotransmisor accediendo al interior neuronal. Las anfetaminas entran en la neurona presináptica a través de los MATs compitiendo con el propio neurotransmisor, derivando en una menor recaptación de las monoaminas favoreciendo así una mayor disponibilidad de estas en la hendidura sináptica para ejercer su acción y aumentar su actividad. Además, a grandes concentraciones, las anfetaminas tienen la capacidad de atravesar la membrana neuronal por difusión simple gracias a la elevada liposolubilidad de estos compuestos (Rudnick y Wall, 1992). En condiciones normales, el almacenamiento de las monoaminas en el interior vesicular es dependiente del gradiente de pH, se necesita un pH bajo para poder almacenarlas en su interior. El

descenso del pH se consigue gracias a la acción de la bomba H⁺ATPasa presente en las vesículas, haciéndolas cada vez más ácidas. Los transportadores de monoaminas vesiculares (VMATs) utilizan este gradiente protónico para introducir las monoaminas en las vesículas las monoaminas. Las anfetaminas son bases débiles (pKa= 9,9-10,1) que muestran una gran afinidad por los VMATs, impidiendo el almacenamiento de las monoaminas dentro de las vesículas. Al igual que pasa con los MATs de la membrana celular, las anfetaminas pueden entrar al interior vesicular a través del VMATs o por difusión simple, disipando el pH ácido interno ya que es una base débil. El aumento del pH vesicular, fuerza la salida masiva de los neurotransmisores al citoplasma neuronal. En condiciones normales un aumento de las concentraciones de monoaminas en el citoplasma es degradado por la acción de las monoaminoxidasas (MAOs) mitocondriales que catalizan la desaminación oxidativa de las monoaminas (Carvalho et al., 2012). Otra de las características diferenciales del mecanismo de acción de las anfetaminas en comparación con el de la cocaína, es que tienen la capacidad de inhibir la acción de las MAOs, impidiendo la degradación monoaminérgica de los neurotransmisores liberados por las vesículas favoreciendo la acumulación masiva de estos en el citoplasma sin ser degradadas (Kokotos y Azmitia, 1994). La acumulación progresiva de las monoaminas en el interior neuronal conlleva a la liberación masiva de los neurotransmisores de manera no exocitótica a través de la membrana por difusión simple y a través de los MATs en un proceso denominado liberación inversa o liberación independiente de calcio aumentando significativamente los niveles del neurotransmisor en la hendidura sináptica durante un largo periodo de tiempo.

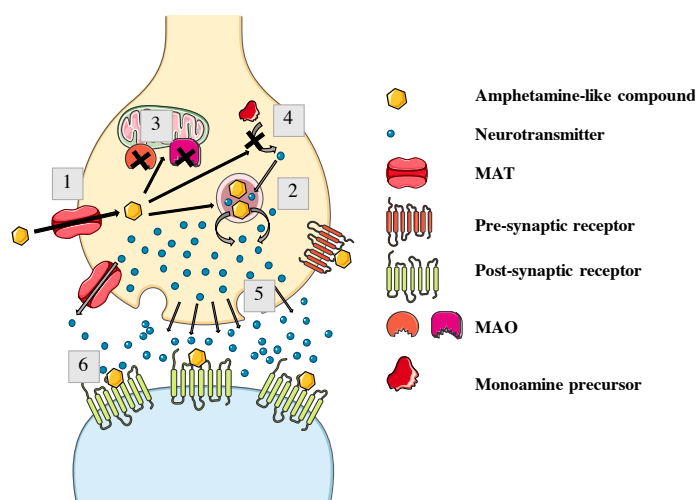


Figura 6. Mecanismo de acción de los derivados anfetamínicos (d-anfetamina, metanfetamina y MDMA). 1. Bloqueo del transportador por parte de la anfetamina e internalización neuronal. 2. Bloqueo del almacenamiento vesicular y liberación del neurotransmisor al citoplasma neuronal. 3. Inhibición de la actividad de la monoaminooxidasa (MAO). 4. Bloqueo de la síntesis de los neurotransmisores. 5. Liberación masiva del neurotransmisor en la hendidura sináptica. 6. Estimulación de los receptores pre- y postsinápticos. Imagen diseñada a partir de Teixeira-Gomes et al., (2015).

La d-anfetamina y la metanfetamina muestran una elevada afinidad por los distintos transportadores, pero actúan preferencialmente sobre los terminales dopaminérgicos, reduciendo la receptación de la DA por parte del transportador DAT (Berger et al., 1992; Sulzer et al., 1995). En condiciones normales, el aumento de la DA citoplasmática es metabolizada por la MAO-B a DOPAC (Davidson et al., 2001), pero dada la capacidad de estas anfetaminas de inhibir la actividad de la MAO, se impide la degradación de la DA presente en el citoplasma (Jones et al., 1998) favoreciendo la transmisión dopaminérgica. El MDMA, al igual que la d-anfetamina y la metanfetamina, muestra una elevada afinidad por los distintos transportadores, pero en este caso su similitud estructural con la serotonina (5-HT) hace que tenga mayor afinidad por los terminales serotoninérgicos actuando sobre SERT (Rudnick y Wall, 1992). Además, el MDMA tiene la capacidad de interactuar con diversos lugares de reconocimiento para la 5-HT a nivel pre- y postsináptico, otorgándole propiedades entactógenas/enpatógenas gracias a su interacción con el receptor 5-HT_{2A} postsináptico (Freo, 1996). Una vez en el interior neuronal, el MDMA tiene la capacidad de detener la síntesis citoplasmática de 5-HT inhibiendo la actividad del enzima triptófano hidroxilasa (TPH) encargada de su formación. La inhibición en este caso de la MAO-A y B por parte del MDMA impide la degradación del neurotransmisor, haciendo que se acumulen grandes cantidades en el citoplasma (Kokotos y Azmitia, 1994). Esta acumulación fuerza la liberación masiva del neurotransmisor aumentando significativamente los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica.

Efectos crónicos tras la administración de los psicoestimulantes

Las interacciones de los psicoestimulantes como la cocaína y los derivados anfetamínicos sobre los MATs en el SNC inducen déficits a largo plazo en el sistema monoaminérgico (Teixeira-Gomes et al., 2015). Además, se han descrito varios mecanismos (p. ej., excitotoxicidad, estrés oxidativo o alteraciones metabólicas) mediante los cuales estas drogas inducen efectos adversos que pueden afectar a la neurotransmisión de las vías monoaminérgicas (Carvalho et al., 2012).

Se ha estudiado en numerosos trabajos los efectos neurotóxicos inducidos por los psicoestimulantes y sus habilidades para producir daño neuronal prolongado en distintas regiones cerebrales (Seiden et al., 1993; McCann et al., 1998; Fleckenstein et al., 2000). Principalmente, se han evaluado los efectos de los psicoestimulantes a

nivel monoaminérgico, alteraciones de los transportadores, así como las enzimas encargadas de la síntesis de los neurotransmisores. Estas alteraciones se han relacionado a nivel comportamental con déficits en el deterioro cognitivo y con fenómenos ansiolíticos y/o depresivos. Uno de los derivados anfetamínicos más estudiados sobre los efectos en la depleción de las monoaminas es el MDMA. Algunos estudios sugieren un efecto neurotóxico diferencial inducido por esta droga en determinadas especies. En primates no humanos parece que el daño neuronal producido por el MDMA puede llegar a ser irreversible, demostrando una gran vulnerabilidad a la degeneración serotoninérgica (disminución de la 5-HT y sus metabolitos, disminución del transportador SERT e incluso alteraciones morfológicas de los terminales y cuerpos neuronales) (Ricaurte et al., 1988). También se ha observado un efecto diferencial en roedores, donde el MDMA muestra una degeneración más selectiva por los terminales serotoninérgicos en ratas (Battaglia et al. 1987), en cambio en los ratones la degeneración ocurre en los terminales dopaminérgicos y se necesitan dosis más elevadas para producir estos efectos (Colado et al., 2001). En cuanto a la metanfetamina, también causa una severa reducción de los niveles de DA a largo plazo en ratas (Ricaurte et al., 1982), incluso se han demostrado disminuciones en la actividad del enzima tirosina hidroxilasa (Sonsalla et al., 1996) reduciendo la conversión de la tirosina a DOPA. Efectos similares se han observado tras la administración de d-anfetamina. Una simple inyección de d-anfetamina redujo los niveles de DA a largo plazo, demostrando efectos neurotóxicos asociados a la destrucción de terminales dopaminérgicos (Ricaurte et al., 1984). Por otro lado, a pesar de verse cambios en la actividad de la tirosina hidroxilasa tras la administración de cocaína a largo plazo, no se observó ninguna disminución de los niveles de DA (Kleven et al., 1988; Ryan et al., 1988; Yeh y Souza, 1991), indicativo de que la cocaína no induce efectos tan neurotóxicos a largo plazo sobre el sistema monoaminérgico como los derivados anfetamínicos.

Estas alteraciones crónicas inducidas por los psicoestimulantes podrían ser en gran parte responsables de los cambios adaptativos descompensados observados durante la fase de abstinencia (p. ej., incremento de síntomas prodepresivos y proadictivos), aumentando la vulnerabilidad a sufrir fenómenos de recaída al consumo de la droga. Se ha visto que estas alteraciones pueden jugar un papel muy importante en la depresión y la anhedonia (Paterson y Markou, 2007), dos de los síntomas más frecuentes durante la

abstinencia a los psicoestimulantes. Por lo tanto, revertir los efectos degenerativos sobre las vías monoaminérgicas podría contribuir a paliar los efectos negativos y reducir los índices de adicción a los psicoestimulantes.

COMORBILIDAD ADICCIÓN-DEPRESIÓN: EFECTOS CONDUCTUALES NEGATIVOS INDUCIDOS POR LOS PSICOESTIMULANTES

En general, los psicoestimulantes como la cocaína y los derivados anfetamínicos a dosis bajas aumentan el estado de alerta, la concentración y la energía, mientras que a dosis altas producen efectos euforizantes denominados *high* o *rush*. Estos efectos placenteros perduran en función del tipo de droga, desde unos minutos para la cocaína (Breiter et al., 1997) hasta horas para la d-anfetamina (Justice y De Wit, 2000) en función de la vía de administración. La disminución de los efectos placenteros provoca la aparición de los efectos negativos de carácter emocional (disforia, irritabilidad, distrés emocional, ansiedad o estados depresivos) que pueden ser revertidos tras una nueva administración de la droga. Sin embargo, si la droga no se administra ya sea por falta de disponibilidad o por decisión propia, la severidad de estos efectos de carácter afectivo puede incrementar durante la fase de abstinencia prolongada provocando la búsqueda compulsiva de la droga y forzando la recaída al consumo (véase Figura 1).

Durante el síndrome de abstinencia se describen numerosos síntomas asociados a la reducción o detención del consumo de una sustancia con un potente efecto adictivo (Renoir et al., 2012). El consumo de sustancias adictivas implica el desarrollo de una dependencia física y/o psicológica tras exposiciones crónicas. Los síntomas pueden aparecer varias horas después de cesar el consumo e incluso hasta semanas y son, por norma general, opuestos a los efectos agudos producidos por la droga, pudiendo variar entre individuos y según las características farmacológicas de la sustancia consumida. Los efectos durante la abstinencia a los psicoestimulantes se han asociado con un incremento de la incidencia de comorbilidades psiquiátricas, como la aparición de desórdenes de tipo afectivo como la depresión y la ansiedad (Filip et al., 2013), que pueden desencadenar el inicio de la dependencia y contribuir a la recaída al consumo (Barr y Markou, 2005). La aparición de estos desórdenes ha sido atribuida en parte a una desregulación en el sistema monoaminérgico, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal y a una pérdida de la plasticidad hipocampal.

En estudios previos realizados con animales de experimentación adultos, la abstinencia a la cocaína ha sido asociada a síntomas depresivos (Markou y Kenny, 2002) donde se ha observado un aumento del desespero conductual, indicativo de una disminución del estado motivacional en el animal. Otro factor de gran relevancia observado en la abstinencia a los psicoestimulantes es la pérdida de interés sobre los estímulos placenteros (anhedonia), siendo uno de los síntomas centrales de la depresión (Cryan et al., 2003). En multitud de estudios se ha asociado la anhedonia con la abstinencia a los psicoestimulantes, comprobando la respuesta a los estímulos reforzantes mediante la estimulación eléctrica intracraneal. La administración de psicoestimulantes (cocaína y d-anfetamina) reduce los niveles necesarios para mantener el umbral neuronal, conservando el sistema de recompensa activado (Markou y Koob, 1991; Paterson et al., 2000). Por el contrario, durante la abstinencia, los animales requieren de una mayor estimulación para mantener la respuesta, indicativo de un déficit de la función del sistema de recompensa (Markou y Koob, 1991). Estos efectos suelen durar según algunos estudios entre 2 y 6 días (Markou y Koob, 1991; Harrison et al., 2001) aunque otros proponen que pueden durar entre 3 (Wise y Munn, 1995) y 10 semanas (Gawin y Kleber, 1986). Otra manera de evaluar los efectos sobre la anhedonia es mediante la utilización de reforzantes naturales. En algunos trabajos se ha publicado que durante la fase de abstinencia hay una clara reducción en la motivación por consumir sacarosa tras la administración de cocaína (Markou y Koob, 1992) o de anfetaminas (Galineau et al., 2005). Además, el incremento de los síntomas negativos de carácter emocional durante la abstinencia puede agravar el estado de preocupación y anticipación forzando la recaída al consumo. Esta recaída al consumo tras un periodo de abstinencia hace que la adicción se defina como una enfermedad crónica, por lo que reducir esta recaída es de vital importancia. En la actualidad, los modelos en experimentación animal más utilizados para investigar las neuroadaptaciones inducidas a largo plazo que desembocan en la recaída y por lo tanto favorecen la permanencia del ciclo adictivo son dos: (1) la reexposición a la droga durante la abstinencia (*challenge o priming*) o (2) la reexposición a estímulos o claves previamente asociados al consumo (véase revisión Shaham et al., 2003).

Estudios epidemiológicos muestran que los índices de depresión en drogadictos y el consumo de drogas en pacientes deprimidos es más alto de lo esperado (Davis et al., 2008), aunque no queda claro si es el consumo de las drogas el que incrementa la

depresión (p. ej., depresión inducida) o viceversa (p. ej., depresión primaria que conlleva a la automedicación) (Fergusson et al., 2009). La probabilidad de sufrir un episodio depresivo en los adictos a la cocaína es de un 32% comparado con el 7% observado en algunos muestreos realizados en diferentes comunidades poblacionales (Robins et al., 1984). Estos datos ponen de manifiesto que ambos desórdenes pueden estar relacionados y no son independientes entre ellos. En este contexto, se han encontrado evidencias que sugieren que el incremento de estos síntomas negativos de carácter emocional pueden ser un predictor del uso de estimulantes (Tremblay et al., 2002, 2005). Algunos estudios en humanos han examinado el estado amotivacional durante largos periodos en la fase de abstinencia y el papel que ejerce en el fenotipo adictivo. En concreto, Kalechstein y sus colaboradores (2002) observaron que pacientes adictos a la cocaína presentaban elevados estados de anhedonia y síntomas depresivos en comparación con pacientes no adictos (Kalechstein et al., 2002). Además, en adictos se observó que el incremento de la sintomatología depresiva durante largos periodos de abstinencia tendía a provocar la vuelta al consumo (Langleben et al., 2008), lo que sugiere una mayor vulnerabilidad a sufrir una recaída (Leventhal et al., 2008). Datos clínicos también han mostrado una conexión entre el consumo de las drogas y la sintomatología depresiva (Herrero et al., 2008), observándose efectos beneficiosos en el tratamiento de las adicciones con fármacos antidepresivos (Torrens et al., 2005).

Los datos presentes en la literatura científica apuntan a que reorganizaciones en el sistema de recompensa y en los circuitos asociados a la memoria (p. ej., en el hipocampo) tras la administración crónica de la droga pueden ser uno de los principales factores responsables de estas respuestas prodepresivas y proadictivas. Por eso mismo, identificar los sustratos neuronales que intervienen en los efectos negativos de carácter emocional durante la fase de abstinencia puede ser de gran importancia para desarrollar terapias farmacológicas efectivas y reducir así la recaída.

COMORBILIDAD ADICCIÓN-DEPRESIÓN: NEUROADAPTACIONES INDUCIDAS POR LOS PSICOESTIMULANTES

Los efectos neurotóxicos asociados a la administración de los psicoestimulantes (cocaína vs. derivados anfetamínicos) sobre distintas regiones implicadas en la adicción, supone uno de los principales ejes de estudio entorno al consumo de estas sustancias adictivas. Se han descrito multitud de sustratos neuronales alterados tras la

administración de los psicoestimulantes y además estas alteraciones se han visto relacionadas con los efectos a largo plazo en el desarrollo de comorbilidades psiquiátricas. Uno de los principales sustratos de estudio analizados en la presente Tesis Doctoral ha sido la neurogénesis hipocampal, debido a su importancia en la consolidación y formación de memorias asociadas a los efectos reforzantes de las drogas (Hernández-Rabaza et al., 2008) y a su papel en el desarrollo de la sintomatología prodepresiva (Filip et al., 2013) y proadictiva (Eisch y Harburg, 2006).

Neurogénesis hipocampal

El hipocampo tiene una gran influencia sobre el sistema de recompensa y dado que las drogas de abuso inducen cambios neuroplásticos sobre él, puede alterar el sistema de recompensa y los componentes de aprendizaje que desencadenan la adicción. Las modulaciones neuroplásticas inducidas por las drogas sobre el hipocampo están en parte asociadas a los efectos a largo plazo sobre el fenotipo prodepresivo y proadictivo, por ello algunos estudios se han centrado en un tipo de plasticidad observada en el hipocampo: la neurogénesis adulta.

Aunque la neurogénesis se considera como la generación de nuevas neuronas a lo largo de la vida, este proceso ocurre en regiones muy concretas (véase Figura 2). Hasta ahora solo se han localizado dos regiones claras donde este proceso muestra una elevada actividad: la zona subventricular (SVZ), proporcionando neuronas que migrarán al bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002), y la zona subgranular del hipocampo (SGZ), que proporciona neuronas que se incorporarán en la capa granular del giro dentado del hipocampo como neuronas maduras (Kempermann et al., 2004; Abrous et al., 2005). Debido a que el giro dentado del hipocampo está posicionado en uno de los puntos de entrada de los circuitos que forman el hipocampo, cabe esperar que tenga una gran influencia entre la conexión del hipocampo y el sistema de recompensa. A pesar de que las funciones de la neurogénesis hipocampal no están claras, los datos obtenidos hacen pensar que pueda tener una gran relevancia en aspectos como el aprendizaje y la memoria, así como en la regulación del humor. Se ha visto que la administración de diferentes sustancias adictivas tiene la capacidad de alterar la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, indicativo de un efecto neurotóxico en el proceso neurogénico y un posible efecto sobre aspectos comportamentales asociado a la adicción (véase revisión en Mandyam y Koob, 2012). Además, la desregulación de la

neurogénesis es una adaptación biológica común con los procesos depresivos (Jacobs et al., 2000) y es esencial para obtener los efectos antidepresivos de determinados fármacos, ya que su inhibición bloquea estos efectos beneficiosos (Santarelli et al., 2003).

En la Figura 7 se muestran los distintos estadios del proceso dinámico de la neurogénesis hipocampal. Distintos marcadores pueden ser utilizados para conocer los diferentes estados de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo como el índice de proliferación celular, la supervivencia celular temprana o la supervivencia celular tardía (hasta 28 días de duración del proceso). En la presente Tesis Doctoral se han seleccionado 3 marcadores de distintos estadios del proceso dinámico de la neurogénesis que se detallan brevemente a continuación. El Ki-67 es un marcador endógeno que se expresa en las células que se encuentran proliferando (células nacidas en las últimas 25 h) durante la fase activa del ciclo G1-M (Kee et al., 2002). Por otro lado, un marcador utilizado frecuentemente en la literatura científica para determinar la supervivencia neuronal temprana es el factor de transcripción endógeno NeuroD. Este marcador se expresa de manera puntual y restringida durante los primeros estadios hacia la diferenciación neuronal, indicando la supervivencia y la diferenciación neuronal temprana (neuronas entre 4 y 10 días de vida) (Lee, 1997). Finalmente, la bromodesoxiuridina (BrdU) es uno de los marcadores más utilizados para diferenciar los estadios de la neurogénesis. Es un marcador exógeno de origen sintético que se incorpora en las cadenas de ADN durante la síntesis en la fase-S del ciclo celular de las células que están proliferando (Wojtowicz y Kee, 2006), indicando el estado de desarrollo de las células nacidas en el momento del marcaje y que tendrán una edad determinada en función del tiempo transcurrido hasta el sacrificio de los animales (p. ej., proliferación, diferenciación y supervivencia celular).

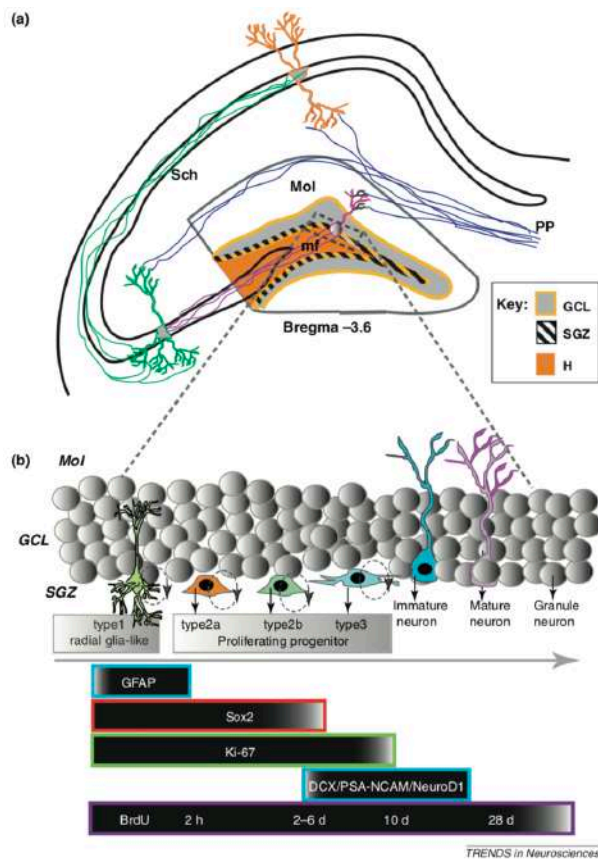


Figura 7. Esquema del hipocampo de rata y de las distintas etapas de la neurogénesis que se llevan a cabo en el giro dentado. (a) Corte coronal del hipocampo de rata donde se observa la capa granular del giro dentado. En el giro dentado distinguimos dos regiones, la capa granular (GCL) de color gris y el hilus (H) de color naranja. En el borde interno entre la GCL y el H se distingue un área denominada la capa subgranular (SGZ) donde se lleva a cabo la neurogénesis, con fondo blanco y rayas negras. (b) Magnificación de la SGZ del giro dentado del hipocampo donde aparecen representados los estadios de la neurogénesis y los marcadores moleculares utilizados para marcar los distintos grados de maduración. Las células radiales de la glía tipo 1 son inmunodetectadas con un marcador denominado proteína gliofibrilar ácida (GFAP). Lentamente estas se dividen en células de tipo 2 que madurarán a células inmaduras de tipo 3. Estos estadios iniciales de proliferación (tipo 2 y 3) pueden detectarse con marcadores endógenos como el Sox2 o el Ki-67. Las células de tipo 3 van madurando a neuronas inmaduras que irán

incorporándose progresivamente a la GCL del hipocampo para convertirse en neuronas plenamente funcionales. Las neuronas inmaduras pueden ser detectadas con marcadores como la doblecortina (DCX), la molécula de adhesión celular neuronal (PSA-NCAM) o NeuroD, en cambio las neuronas maduras pueden utilizarse el marcador NeuN. El BrdU es un marcador exógeno que permite marcar cualquier estadio del proceso de neurogénesis en función del momento en que es administrado. Imagen tomada de Mandyam y Koob (2012).

Los efectos de los psicoestimulantes sobre la neurogénesis hipocampal adulta han sido ampliamente estudiados en la literatura (Mandyam y Koob, 2012). Se ha observado que la exposición a corto y a largo plazo de la cocaína reduce los índices de proliferación celular en el giro dentado del hipocampo sin alterar el fenotipo de las nuevas neuronas existentes (Domínguez-Escribà et al., 2006). También, tras la administración de cocaína durante 3 semanas, se han determinado disminuciones en la proliferación celular. Este efecto fue revertido tras un período de abstinencia prolongado de 4 semanas, mejorando la expresión de marcadores relacionados con la maduración neuronal (Noonan et al., 2008). Sin embargo, tras la administración de anfetaminas (p. ej., metanfetamina, MDMA), se han observado efectos más severos y potentes sobre la neurogénesis. Una simple dosis de metanfetamina fue suficiente para disminuir los niveles de proliferación celular en jerbos, aunque estos efectos fueron transitorios debido a que se normalizaron 36 horas después de la administración (Hildebrandt et al., 1999; Teuchert-Noodt et al., 2000). A pesar de ello, la

autoadministración de metanfetamina de manera intermitente incrementó los niveles de proliferación celular, mientras que una autoadministración continuada produjo una marcada disminución de la neurogénesis, tanto del número de neuronas en la capa granular como del volumen hipocampal (Mandyam et al., 2008). En cuanto al MDMA, sus efectos varían mucho dependiendo de la especie de estudio y la dosis. Se ha observado que administraciones en atracón o *binge* son capaces de reducir la neurogénesis, afectando a la supervivencia neuronal temprana durante la abstinencia pero sin alterar los niveles de proliferación basal (Hernández-Rabaza et al., 2006). Tras la administración crónica de MDMA en ratas adolescentes se ha observado disminuciones en la supervivencia celular, sin alterar los niveles de proliferación (Catlow et al., 2010). Por el contrario, cuando el MDMA se administró de manera oral durante 30 días se redujeron los niveles basales de proliferación (Cho et al., 2007). Los estudios realizados con d-anfetamina no muestran grandes efectos sobre marcadores para la neurogénesis como la proliferación, maduración o supervivencia neuronal. Solo se han observado efectos neuroplásticos durante la abstinencia a largo plazo, mostrando un retraso en la maduración neuronal o bien un cambio en el fenotipo celular, convirtiéndose en otro tipo celular como los astrocitos (Barr et al., 2010).

Las evidencias sugieren que las reducciones de marcadores para la neurogénesis comportan un factor de riesgo que puede influir en los comportamientos adictivos (Eisch y Harburg, 2006). Además, el consumo de psicoestimulantes induce cambios asociados con disfunciones hipocampales (DeCarolis y Eisch, 2010) que conllevan a un incremento de los efectos negativos de carácter emocional como la anhedonia y la depresión, considerados componentes importantes en el desarrollo de la adicción (Koob y Volkow, 2010). Por lo tanto, ampliar los conocimientos sobre los efectos inmediatos en la adolescencia y a largo plazo inducidos por las drogas psicoestimulantes sobre la neurogénesis hipocampal puede contribuir al entendimiento de los procesos relacionados con la dependencia y la adicción. Por otro lado, también se ha analizado el papel de otros sustratos con una elevada implicación en el consumo de las drogas de abuso y efectos negativos afectivos como la modulación de factores neurotróficos, marcadores de destino celular y/o la expresión de genes de activación rápida, que se detallarán brevemente a continuación.

Factores neurotróficos

La hipótesis de que las drogas de abuso inducen neuroadaptaciones ha llevado a la realización de multitud de trabajos. Se ha evaluado tanto a nivel celular como molecular los efectos neuroplásticos inducidos sobre el aprendizaje y el comportamiento tras el consumo de drogas (Nestler, 2001). Los investigadores han puesto en el punto de mira el papel que puede jugar el BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) en la vía dopaminérgica del sistema mesolímbico, y su manipulación en los efectos comportamentales inducidos por diversas drogas (Bolaños y Nestler, 2004). Además, el BDNF también se ha visto asociado a fenómenos comportamentales relacionados con la depresión (Yu y Chen, 2011), por lo que se ha postulado como un factor neurotrófico de relevancia en el desarrollo de comorbilidades psiquiátricas inducidas tras el consumo de las drogas de abuso (Haerian, 2013).

En este contexto, incrementos en los niveles de BDNF se han correlacionado positivamente con aumentos en el número de células de nueva formación en el giro dentado del hipocampo en condiciones no patológicas (Lee et al., 2000; Pierce y Bari, 2001). La realización de infusiones intrahipocámpales de BDNF ha demostrado un incremento de la neurogénesis en el giro dentado, acompañado de un aumento de células granulares ectópicas (Scharfman et al., 2005). Además, se ha observado una reducción de la supervivencia neuronal en ratones heterocigotos *knockout* para el BDNF (Lee et al., 2002). Varios estudios realizados en cultivos celulares han ayudado a elucidar gran parte del mecanismo de acción del BDNF, que parece involucrar al receptor Trk B (*Tropomyosin receptor kinase B*), activando las vías de las MAP quinasas (Barnabé-Heider y Miller, 2003) encargadas de producir cambios en diferentes factores de transcripción. En cuanto al rol que desempeña el BDNF sobre el destino celular, hay diversos estudios que han propuesto que el mecanismo de acción concluye en un efecto sobre la proliferación (Kato-Semba et al., 2002), aunque otros sugieren que el efecto más importante es sobre la supervivencia celular (Lee et al., 2002).

A pesar de que hay discrepancias sobre su papel, el BDNF ha mostrado que media efectos tanto sobre el destino celular durante la abstinencia, como sobre los efectos reforzantes de la droga y la recaída al consumo (Mattson et al., 2004). En animales heterocigotos *knockout* para el BDNF se ha observado una disminución de los efectos reforzantes inducidos por la cocaína en el CPP (Hall et al., 2003), demostrando la importancia del BDNF en el aprendizaje contextual. La disminución de estos efectos

reforzantes también se ha descrito tras la administración de anfetaminas, gracias a la utilización de un inhibidor no selectivo K-252a para el receptor Trk B, consiguiendo bloquear así las acciones del BDNF (Shen et al., 2006). En estudios más recientes, se ha observado tras la administración de metanfetamina aumentos en la expresión de BDNF en el hipocampo, asociado a déficits cognitivos a largo plazo (Grace et al., 2008). Al contrario de lo observado con la cocaína y la metanfetamina, la administración de MDMA redujo de manera temporal los niveles de BDNF en ratas adultas (Martínez-Turrillas et al., 2006) y no los alteró en ratas adolescentes (Ádori et al., 2010). Por otro lado, se han observado efectos contradictorios en los niveles de BDNF tras la administración de d-anfetamina. Algunos estudios han observado disminuciones en la expresión del ARNm para BDNF en el hipocampo de rata tras su administración en la adolescencia, pero no en la etapa adulta (Banerjee et al., 2009). En otros estudios, tratamientos con d-anfetamina en ratas durante la etapa adulta han incrementado la expresión de BDNF en diferentes regiones cerebrales (Meredith et al., 2002), incluyendo el hipocampo (Griesbach et al., 2008). Por eso mismo, averiguar el papel inmediato y a largo plazo en la etapa adulta que desempeña este factor neurotrófico tras la administración de los psicoestimulantes durante la adolescencia puede ayudar a explicar parte de los comportamientos prodepresivos y proadictivos asociados al consumo.

Proteína multifuncional FADD

Uno de los mecanismos fundamentales para mantener la función y la homeostasis celular es la regulación de lo que podríamos denominar ‘destino celular’, definido como el balance entre la proliferación, la diferenciación, o el inicio de la muerte celular (véase Figura 8), siendo la apoptosis o muerte celular programada el mecanismo más estudiado (Galluzzi et al., 2018).

En general, es aceptado que algunas drogas de abuso pueden inducir muerte celular tanto en animales como humanos, donde se ha observado una pérdida neuronal y astrocitaria tras la exposición a la drogas (Cunha-Oliveira et al., 2008; Büttner, 2011). Los efectos neurotóxicos y neuroplásticos que ocurren tras la administración de drogas podrían explicar los déficits cognitivos, fenómenos depresivos y los comportamientos adictivos asociados tras el consumo de las drogas. En el proceso apoptótico, proteínas pertenecientes a la vía extrínseca (p. ej., receptor Fas, adaptador FADD: *Fas-Associated*

Death Domain y caspasas efectoras) han ganado un interés especial en el estudio de los efectos neuroplásticos inducidos por las drogas, gracias a su dualidad funcional; promoviendo la muerte celular o la supervivencia y/o diferenciación celular (Park et al., 2005).

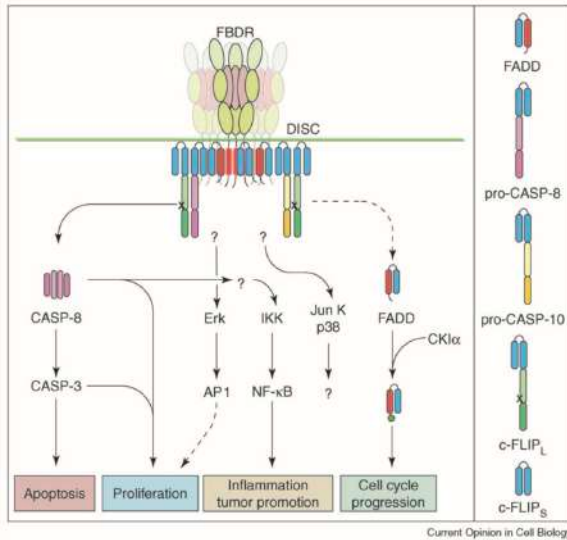


Figura 8. Proteínas implicadas en el destino celular (apoptosis, proliferación, inflamación o progresión del ciclo celular). La oligomerización de los receptores Fas favorece la asociación de los dominios de muerte donde se acopla la proteína adaptadora FADD. Esta proteína multifuncional recluta a la procaspasa-8 a través de sus secuencias análogas, formando un complejo denominado DISC. La activación de la caspasa-8 activa a la caspasa-3 induciendo la apoptosis. La unión de FLIP_i al complejo DISC impide la activación de la caspasa-8, favoreciendo la presencia de FADD en el citoplasma que puede ser fosforilado por la CKI α a p-FADD. El p-FADD juega un papel regulando acciones antiapoptóticas, translocándose del citoplasma al núcleo participando en la regulación del ciclo celular, la supervivencia y proliferación. Imagen tomada de Park et al., (2005).

Por ello, la proteína FADD que señala las acciones del receptor Fas y de la superfamilia de receptores TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) (Tourneur y Chiocchia, 2010) puede ejercer un papel importante en el destino neuronal tras la administración de diversas drogas de abuso. Tradicionalmente, en el área de estudio del cáncer se la ha adscrito al FADD una función proapoptótica (Galluzzi et al., 2018) y a su forma fosforilada (p-FADD) una función antiapoptótica, regulando la supervivencia y proliferación celular (Scaffidi et al., 2000; Alappat et al., 2005), pero estas funciones no están tan claras en los estudios realizados sobre el SNC. En estos trabajos se ha demostrado el papel multifuncional ejercido por FADD tras la administración de drogas de abuso como los opiáceos (García-Fuster et al., 2007) o el deterioro cognitivo (Ramos-Miguel et al., 2017; Hernández-Hernández et al., 2018).

Estos descubrimientos realizados sobre FADD han hecho que sea una molécula interesante a la hora de estudiar los efectos neurotóxicos y/o neuroplásticos inducidos por el consumo de drogas. Hay pocos estudios realizados en relación a los efectos de las drogas de abuso sobre el marcador FADD. Uno de los primeros estudios llevados a cabo para determinar el papel de FADD se centró en su modulación tras la administración de opiáceos. García-Fuster y colaboradores (2007) demostraron que la administración aguda de agonistas opioides, que había previamente aumentado el contenido proteico

del receptor pro-apoptótico Fas (Boronat et al., 2001), redujo los niveles de FADD en la corteza cerebral de rata, promoviendo señales anti-apoptóticas dependientes de la activación de la vía de señalización ERK $\frac{1}{2}$ (García-Fuster et al., 2007). La realización de tratamientos con agonistas opiáceos selectivos de los receptores μ/δ incrementaron los niveles de la forma fosforilada de FADD (p-FADD), indicativo de un aumento de los efectos neuroplásticos en regiones de la corteza cerebral (García-Fuster et al., 2008). Los incrementos de p-FADD y las disminuciones de FADD tras la exposición a opiáceos sugieren efectos adaptadores que podrían desempeñar un papel muy importante en la neuroplasticidad cerebral inducida por la morfina, como el desarrollo de la sensibilización (Ramos-Miguel et al., 2010) o la inducción de dependencia física (Ramos-Miguel et al., 2011). En cerebros *post mortem* de adictos a opiáceos se han obtenido resultados similares a los observados en animales de experimentación, los adictos a opiáceos muestran un aumento de la forma p-FADD y una disminución de la forma total FADD (Ramos-Miguel et al., 2009). El papel de FADD también ha sido estudiado tras el consumo de cocaína. Se ha observado un aumento de los niveles de FADD tras la administración aguda de cocaína (García-Fuster et al., 2009; Álvaro-Bartolomé et al., 2011), asociado a la activación del autoreceptor dopaminérgico D₂ (García-Fuster et al., 2009). Tras la administración repetida de cocaína se observó una taquifilaxia a los efectos agudos en FADD, mientras que durante la abstinencia los niveles de FADD se redujeron en la corteza cerebral de rata (García-Fuster et al., 2009). En modelos de autoadministración de cocaína se ha demostrado la importancia de FADD en la abstinencia a cocaína, con un importante aumento de este marcador tras 14 días de abstinencia en el hipocampo, asociado a una disminución de la proliferación celular en el giro dentado (García-Fuster et al., 2011). En animales seleccionados por su respuesta locomotora en ambientes novedosos (alta actividad locomotora bHR o baja actividad bLR) se observaron diferencias a nivel comportamental y bioquímico. Las ratas bHR presentan un nivel basal de FADD mayor a nivel cortical en comparación con las bLR y además, estos niveles de FADD muestran una clara correlación con el nivel de locomoción exhibido (García-Fuster et al., 2009). A pesar de que los animales bHR presentaron un incremento en la sensibilización a la cocaína en comparación con las bLR, se observaron los mismos efectos sobre FADD que los obtenidos en ratas comerciales. En cerebros *post mortem* de adictos puros a cocaína no se han observado aumentos en las proteínas apoptóticas de las vías extrínseca o intrínseca en la corteza

prefrontal (Álvaro-Bartolomé et al., 2011). A pesar de no observarse cambios en las proteínas apoptóticas analizadas, si hubo una degradación de PARP-1 (marcador de muerte celular) en adictos crónicos. Esto puede ser debido a una posible activación de otra subrutina de muerte celular denominada *parthanatos*, que envuelve la activación del efector de muerte mitocondrial (AIF: *Apoptosis-Inducing Factor*) demostrando cierto grado de toxicidad en los adictos a cocaína (Álvaro-Bartolomé et al., 2011).

Estos resultados demuestran un papel importante de FADD en la adicción a las diversas drogas de abuso (véase revisión Ramos-Miguel et al. 2012), y apuntan a un incremento de las adaptaciones inducidas tras la exposición en lugar de a un aumento de la toxicidad, aunque poco se sabe de la regulación por otras sustancias de abuso como las anfetaminas. Además, la proteína multifuncional FADD está regulada en depresión (véase García-Fuster et al., 2014 para estudios en cerebros *post mortem* de sujetos depresivos) y por fármacos antidepresivos de diversa índole (véase García-Fuster y García-Sevilla 2015). Por eso mismo, ampliar el conocimiento sobre el papel que juega esta molécula en los efectos inducidos por diversas drogas psicoestimulantes (p. ej., d-anfetamina, metanfetamina, MDMA) es de gran relevancia, ya que podría aportar nueva información sobre las neuroadaptaciones inducidas por estas drogas y su relevancia en los procesos negativos asociados con la abstinencia.

Genes de activación rápida

La regulación genética es un mecanismo que produce cambios relativamente estables en las neuronas (Nestler et al., 1993). Se conoce que la exposición a las drogas de abuso puede producir alteraciones en las funciones nucleares y alterar la transcripción de determinadas dianas genéticas (Graybiel et al., 1990; Uslaner et al., 2001). La alteración de estos genes puede modificar la actividad de las neuronas traduciéndose en cambios muy sólidos a nivel comportamental.

A pesar de que la expresión de los genes está regulada por multitud de factores de transcripción, dos factores han destacado sobre el resto en el ámbito de las drogodependencias y procesos depresivos: la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB) y los elementos de la familia Fos (Nestler, 2004a). Se conoce que CREB puede inducir efectos de tolerancia y dependencia a las drogas, y contribuye en las primeras fases de la abstinencia a mediar los estados motivacionales negativos. En cambio, los elementos de la familia Fos, están asociados a los efectos de la

sensibilización a largo plazo, afectando al estado motivacional sobre la droga, influyendo en uno de los aspectos centrales del desorden adictivo. Un amplio rango de fármacos y drogas de abuso son capaces de incrementar la expresión de esta familia de proteínas en regiones del estriado y en otras regiones implicadas en la adicción (Nestler, 2001). La transcripción de los elementos de esta familia puede ser inducida por CREB, Elk-1, proteínas activadoras AP-1, proteínas de la familia Jun o proteínas de la propia familia de Fos (Hyman et al., 2006). Algunos factores de transcripción como c-Fos presentan una vida media corta (2-6 horas), por lo que inducen la transcripción de multitud de genes. Uno de los miembros de la familia, FosB, genera un producto truncado denominado Δ FosB que presenta una degradación más lenta de entre 1-2 días. Δ FosB puede ejercer funciones de factor de transcripción como su forma nativa (FosB). Se ha visto que la exposición repetida a los psicoestimulantes (cocaína, metanfetamina y d-anfetamina) promueve la acumulación de Δ FosB en las neuronas, incrementando la expresión de genes inducidos por Fos (Nestler, 2004b), pudiendo originar respuestas conductuales de sensibilización a las drogas (Nestler, 2008). Se ha demostrado en diversos estudios que la administración de psicoestimulantes y otras drogas de abuso alteran la expresión del gen *c-fos*, además esta expresión se encuentra modulada y potenciada por el contexto ambiental donde se ha experimentado la administración (Uslaner et al., 2001). Badiani y colaboradores (1998) han observado que la administración de anfetaminas incrementa la expresión de *c-fos* cuando es administrada en un ambiente novedoso (aumento de la sensibilización) en comparación a cuando la droga es administrada en la caja de estabulación (Badiani et al., 1998). Además, se ha visto que el contexto donde se ha administrado la anfetamina determina las poblaciones neuronales del estriado que se activan (Badiani et al., 1999). Por tanto, evaluar la activación neuronal por c-Fos y otros miembros de esta familia de genes de expresión rápida podría aportar información sobre las respuestas a nivel comportamental (tolerancia o sensibilización) inducidas tras la administración de los psicoestimulantes a largo plazo, así como su posible implicación en los efectos negativos derivados de su consumo.

TRATAMIENTOS DURANTE LA ABSTINENCIA A LOS PSICOESTIMULANTES

Basado en la hipótesis de que los sustratos de actuación de los psicoestimulantes y los antidepresivos son similares (p. ej., a nivel de desregulación de la neurogénesis hipocampal), se ha explorado en multitud de estudios si los antidepresivos pueden atenuar los síntomas emergentes durante la abstinencia. El modelo de abstinencia en ratas permite evaluar los efectos de posibles tratamientos durante los periodos más críticos, cuando emergen los efectos negativos de carácter emocional (depresión y anhedonia) que pueden desencadenar la recaída. La mayoría de estudios se han centrado en los efectos antidepresivos durante la fase aguda de la abstinencia, pero pocos trabajos se han centrado en los tratamientos tras un largo periodo de abstinencia. Como se ha comentado anteriormente, la abstinencia a los psicoestimulantes se ha asociado a alteraciones hipocampales (neurogénesis, factores neurotróficos, genes de expresión rápida). En este contexto la utilización de fármacos que puedan revertir estos efectos negativos podría ser de gran relevancia en el contexto de las adicciones.

Tratamientos farmacológicos con antidepresivos

Déficits en el sistema serotoninérgico han sido observados en el hipocampo tanto en la abstinencia a los psicoestimulantes como en la depresión. Se han demostrado alteraciones a nivel de receptores pre- y postsinápticos, al igual que disminuciones en el contenido de 5-HT a nivel neuronal (Renoir et al., 2012). Por lo tanto, una de las aproximaciones terapéuticas con una gran repercusión en el tratamiento de las adicciones ha sido la utilización de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRIs: *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*). Los SSRIs tienen la función de bloquear la recaptación de la 5-HT, e inicialmente resulta en una disminución de los niveles de serotonina debido a la activación del autoreceptor 5-HT_{1A}, induciendo su desensibilización y así mejorando la señalización serotoninérgica (Kinney et al., 2000). Este bloqueo del autoreceptor favorece el aumento de los efectos terapéuticos sobre la sintomatología prodepresiva, por lo tanto, se ha visto que la administración combinada de SSRIs y antagonistas del receptor 5-HT_{1A} proporciona un efecto antidepresivo durante la abstinencia a los psicoestimulantes en ratas (Harrison et al., 2001), consiguiendo disminuir el umbral de activación neuronal durante la abstinencia. En estudios clínicos sobre la dependencia a estimulantes en humanos se ha

observado que la fluoxetina disminuye el ansia por el consumo de anfetaminas durante la abstinencia (Srisurapanont et al., 2014), aunque no se han reportado beneficios para la dependencia. Otros antidepresivos como la mirtazapina (antagonista α_2), mejoraron los efectos subjetivos durante la abstinencia sin mejorar los índices de depresión (Kongsakon et al., 2005). Para el tratamiento de la abstinencia a cocaína se han realizado diversos estudios con multitud de antidepresivos, demostrando una falta de efectos beneficiosos tras la administración de antidepresivos serotoninérgicos (Ciraulo et al., 2005a, 2005b). Sin embargo, se han determinado efectos beneficiosos con antidepresivos que afectan a dianas dopaminérgicas y noradrenérgicas (mejora de síntomas asociados a la abstinencia con cocaína), aunque no se han observado claros efectos sobre la dependencia a los psicoestimulantes (Parsons et al., 1991; Weiss et al., 1992).

Los antidepresivos no solo corrigen el balance neuroquímico del sistema monoaminérgico, sino que también actúan a nivel neurotrófico mejorando la conectividad neuronal. En pacientes deprimidos, se han observado disminuciones en algunas regiones cerebrales (Elkis et al., 1995) que podrían estar asociadas a disminuciones de BDNF en el tejido hipocampal. En cerebros *post mortem* de pacientes deprimidos se ha demostrado atrofia o muerte neuronal en el hipocampo, por lo que el BDNF puede tener un papel importante en esta pérdida neuronal (Chen et al., 2001; Dwivedi et al., 2005). Estudios preliminares han demostrado que la administración repetida de antidepresivos incrementa los niveles de BDNF en el hipocampo, mediando en parte los efectos clínicos. Infusiones de BDNF en el hipocampo producen efectos similares a los observados tras la administración de antidepresivos (Siuciak et al., 1997); comparables a los observados en animales transgénicos con un incremento en la actividad del receptor Trk B, lo que sugiere que la activación del BDNF y el Trk B pueden producir efectos antidepresivos. Asimismo, animales *knockout* para para Trk B o BDNF han demostrado insensibilidad a los efectos de los antidepresivos (Saarelainen et al., 2003). Además, la iniciación de procesos neurotróficos, asociados a la poda neuronal de fibras serotoninérgicas, podría estar relacionado con el lento desarrollo de los efectos clínicos (Mamounas et al., 1995).

El BDNF participa en la diferenciación, crecimiento y supervivencia neuronal, por lo que los efectos neurotróficos y neurogénicos contribuyen a los efectos terapéuticos de los antidepresivos. En estudios recientes se ha determinado que la

inducción de neurogénesis es necesaria para llevar a cabo la respuesta antidepresiva (Santarelli et al., 2003). Por lo tanto, el aumento de BDNF por parte de los antidepresivos puede mediar cambios en la neurogénesis hipocampal, al igual que otros tipos de plasticidad neuronal que proporcionan un efecto terapéutico (D'Sa y Duman, 2002). Se ha visto que reducciones en los niveles de neurogénesis durante la abstinencia potencia los efectos de la búsqueda compulsiva de la droga, dificulta la extinción y favorece la recaída al consumo (Deschaux et al., 2014; Castilla-Ortega et al., 2016). Estos datos sugieren que la normalización o el incremento de la neurogénesis en el hipocampo podrían mejorar la susceptibilidad y los índices de recaída. Por consiguiente, el uso de antidepresivos administrados de manera crónica que aumentan la neurogénesis, podría ser un mecanismo que ayude a revertir los efectos negativos asociados al consumo de las drogas de abuso (Malberg et al., 2000).

Tratamientos no farmacológicos con métodos no invasivos de estimulación neuronal

La estimulación magnética craneal (TMS) es un método no invasivo para el tratamiento psiquiátrico que implica la proyección de campos magnéticos fluctuantes a través del cráneo hacia el cerebro (Kluger y Triggs, 2007; Rossini y Rossi, 2007) generando corrientes eléctricas que modulan los disparos neuronales (véase Figura 9). Estudios realizados en animales han demostrado multitud de efectos biológicos tras la aplicación de la TMS, como efectos antidepresivos (Fleischmann et al., 1995; Keck et al., 2001), efectos sobre el contenido y el recambio de neurotransmisores (Ben-Shachar et al., 1997), modulaciones en receptores serotoninérgicos y glutamatérgicos (Ben-Shachar et al., 1999; Kole et al., 1999), así como efectos en la inducción de genes de expresión rápida (Ji et al., 1998; Hausmann et al., 2000) o expresión de factores neurotróficos como el BDNF (Müller et al., 2000). A pesar de que la utilización de la TMS para la depresión es una técnica probada, su papel en el tratamiento para las adicciones está en una fase inicial. Hay menos de una veintena de estudios en la literatura que han utilizado dicha técnica como tratamiento para diferentes drogas de abuso, pero solo 5 de estos son estudios clínicos controlados. Dos de estos estudios controlados han mostrado una reducción en el consumo de cigarrillos tras aplicar la TMS (Eichhammer et al., 2003; Amiaz et al., 2009). En cuanto a los psicoestimulantes, se ha observado una disminución en el consumo de cocaína de los voluntarios (Carlyle

et al., 2015), indicativo de que la técnica puede mediar efectos sobre procesamientos relevantes de la adicción, haciendo que sea una técnica con un futuro prometedor.

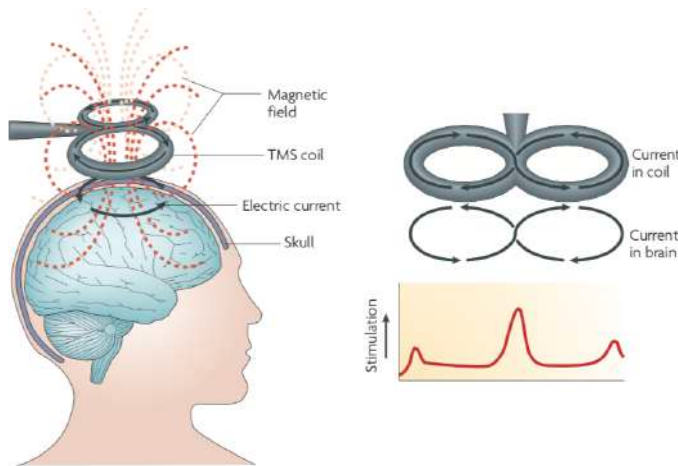


Figura 9. Esquema del funcionamiento de la estimulación magnética intracraneal (TMS). La fluctuación del campo magnético creado por la bobina cerca de la superficie craneal, induce corrientes eléctricas en la corteza cerebral. La estimulación continua de la corteza propaga el impulso a zonas del sistema mesolímbico, aumentando o disminuyendo el umbral neuronal dependiendo de la región. Imagen tomada de Ridding y Rothwell, (2007).

Una terapia mucho más antigua que la recién explicada y con una amplia aplicación en el tratamiento de diferentes dolencias psiquiátricas es la terapia electroconvulsiva (ECT). El ECT consiste en la colocación de dos electrodos bilateralmente (ECT bitemporal) para la aplicación del estímulo eléctrico (véase Figura 10). Para determinar la corriente óptima se realiza una aplicación de corriente creciente hasta que se observa la convulsión adecuada mediante la utilización de un electroencefalograma (EEG) y un electromiograma (EMG), debido a que los pacientes están bajo los efectos de la anestesia y relajantes musculares (Tendolkar et al., 2013). Las neuronas con un potencial de membrana en reposo se despolarizan y transmiten el potencial de acción cuando reciben un estímulo mecánico, eléctrico o químico. Normalmente la actividad eléctrica en el SNC es desincronizada, pero cuando ciertas poblaciones neuronales se despolarizan simultáneamente se producen estados convulsivos (Grover et al., 2005). El ECT aplica la corriente en la superficie craneal a través de los electrodos, produciendo despolarizaciones simultáneas en varias poblaciones neuronales dependiendo de la intensidad y frecuencia a la que se aplica dicho estímulo eléctrico (Pinna et al., 2018). Una vez determinada la corriente óptima para generar la convulsión con el ECT, se realiza el tratamiento. Durante el tratamiento se utiliza un 50% extra de la corriente óptima determinada para cada paciente entre 2-3 veces a la semana durante 1-2 meses (Tendolkar et al., 2013).

LA TERAPIA ELECTROCONVULSIVA

La TEC es usada para tratar episodios graves depresivos, el trastorno bipolar y algunos tipos de esquizofrenia. No es un tratamiento que se utilice como primera opción.

Se realiza de manera interdisciplinaria: psiquiatría, anestesiología, enfermería



Figura 10. Esquema del funcionamiento de la terapia electroconvulsiva (ECT). Los electrodos colocados en sobre la superficie craneal en las regiones temporales, inducen corrientes eléctricas. La estimulación eléctrica produce despolarizaciones sincronizadas que provocan convulsiones generalizadas. El paciente es monitorizado mediante un electroencefalograma (EEG) y un electromiograma (EMG) bajo los efectos de la anestesia y de los relajantes musculares. Una vez el paciente está dormido, se aplica la estimulación eléctrica y se espera hasta que se despierta de los efectos de la anestesia. Una vez despierto, se monitorizan durante 1 hora el EEG y el EMG antes de dar por finalizada la sesión de ECT. Imagen tomada del diario Los Andes, 2014.

Se ha visto que la ECT consigue efectos comportamentales y bioquímicos similares a los observados tras la TMS (Ben-Shachar et al., 1997; Grunhaus et al., 2000). En estudios clínicos se ha demostrado una alta efectividad del ECT en pacientes con depresión severa mayor y depresión resistente a fármacos (Pagnin et al., 2004), además de un elevado porcentaje de remisión en pacientes con depresiones psicóticas (Petrides et al., 2001). A pesar de ser un potente inductor de la neurogénesis en el hipocampo (Bolwig, 2011), no se ha estudiado lo suficiente como para tratar la adicción a drogas. Los datos observados en los diferentes estudios sugieren que diferentes vías celulares pueden aportar efectos terapéuticos manipulando la neurogénesis, pero con diferentes eficacias en el tratamiento de los desórdenes psiquiátricos, adicciones y las comorbilidades (véase revisión Segi-Nishida, 2011).

En este contexto, el shock electroconvulsivo (ECS) en animales de experimentación imita los efectos antidepresivos observados tras la aplicación del ECT en humanos, otorgándole a los hallazgos en modelos animales un valor translacional importante para elucidar un mecanismo de acción. Se han descrito multitud de cambios morfológicos y funcionales en neuronas del giro dentado del hipocampo tras el tratamiento con ECS (véase revisión Segi-Nishida, 2011). La estimulación neuronal llevada a cabo por esta técnica provoca la inducción de genes de expresión rápida como el *c-fos* en neuronas maduras. Además, favorece la expresión de factores neurotróficos como el BDNF, con un rol importante en los efectos antidepresivos y la neurogénesis. Madsen y colaboradores (2000) han demostrado que su aplicación tanto aguda como

crónica incrementa la neurogénesis en el hipocampo (Madsen et al., 2000), demostrándose que es un inductor de la neurogénesis mucho más potente que los antidepresivos convencionales (Malberg et al., 2000). Al mismo tiempo, no solo se han observado mejoras a nivel molecular y celular, sino también a nivel comportamental reduciendo los niveles de inmovilidad en el test de natación forzada (Porsolt et al., 1978) y en el test de suspensión por la cola en ratones (Christiansen y Woldbye, 2010). Por ello profundizar en los mecanismos de acción de técnicas estimuladoras como el ECS y el papel que desempeñan durante la abstinencia sobre los efectos negativos de carácter emocional prodepresivos, puede aportar una valiosa información sobre cómo abordar futuros tratamientos para la adicción a psicoestimulantes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Estudiar las neuroadaptaciones (p. ej., neurogénesis hipocampal y marcadores de neuroplasticidad) inducidas tras la administración aguda y/o repetida de distintos psicoestimulantes (cocaína, MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) durante diferentes etapas de la adolescencia en rata para identificar periodos de mayor vulnerabilidad durante el desarrollo a los efectos neurotóxicos inducidos por estas drogas psicoestimulantes.
2. Estudiar las consecuencias inmediatas y a largo plazo inducidas durante la abstinencia a nivel comportamental (fenotipo prodepresivo y proadictivo) y molecular (p. ej., neurogénesis hipocampal y marcadores de neuroplasticidad) tras la administración de cocaína o metanfetamina durante el periodo adolescente de mayor vulnerabilidad en rata.
3. Estudiar la posible mejora inducida por el tratamiento con el shock electroconvulsivo sobre las consecuencias a largo plazo inducidas durante la abstinencia a nivel comportamental (fenotipo prodepresivo) y molecular (p. ej., neurogénesis hipocampal y marcadores de neuroplasticidad) tras la administración de metanfetamina durante el periodo adolescente de mayor vulnerabilidad en rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se detallan todos los fármacos, anticuerpos, reactivos, materiales y aparatos utilizados en los distintos tratamientos y procedimientos.

FÁRMACOS

A continuación, se detallan los fármacos utilizados. Se indica en cursiva su nomenclatura según la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) y entre paréntesis el número de lote y la entidad suministradora:

- Cocaína, hidrocloreuro; *methyl (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylate* (Lote 1/11, Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España).
- 3,4-metilenedioximetanfetamina o MDMA, hidrocloreuro; *[1-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)propan-2-yl](methyl)amine* (Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España).
- (+) Metanfetamina, hidrocloreuro; *N-methyl-1-phenylpropan-2-amine* (Lote SLBH6140V, Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.).
- D-anfetamina, sulfato; *(2S)-1-phenylpropan-2-amine* (Lote APN11123-1-1, Abcam, CB, Reino Unido).
- 5-Bromo-2-desoxiuridina o BrdU; *5-bromo-1-(2-deoxy-β-S-ribofuranosyl)uracil* (Lote D00149957, Calbiochem, CA, EE.UU.).
- Temozolamida; *3-methyl-4-oxo-3H,4H-imidazo[4,3-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxamide* (Lote LRAB4112, Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.).

ANTICUERPOS

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas especializadas o inmunoglobulinas producidas por el sistema inmunitario como respuesta a la presencia de antígenos en el cuerpo. La unión del anticuerpo a una región en particular del antígeno, denominada epítopo, conlleva el marcaje de dicha sustancia para poder eliminarla de manera directa o indirecta (p. ej., bacterias o virus). Los anticuerpos son caracterizados como monoclonales o policlonales en función del número de linfocitos B que los producen.

Los anticuerpos monoclonales son producidos exclusivamente por una única célula linfocitaria B de ratón, rata, conejo o hámster reconociendo un solo epítopo del

antígeno, evitando en la mayoría de casos reacciones cruzadas con antígenos no específicos. La fusión de dichos linfocitos B productores de anticuerpos monoclonales con mielomas celulares forman hibridomas inmortalizados proporcionando de manera constante anticuerpos primarios monoclonales.

Los anticuerpos policlonales provienen a partir de poblaciones heterogéneas de linfocitos B activados con un antígeno específico. Tradicionalmente dichos anticuerpos son producidos en conejos, cabras y ovejas. Al estar producidos por diferentes linfocitos B, tienen la capacidad de reconocer diversos epítomos. Una desventaja importante es que al ser producidos en diferentes animales de la misma especie (lotes de producción) pueden variar la respuesta inmunitaria frente a un mismo antígeno. Por otro lado, presentan una mayor amplificación de la señal en proteínas de baja expresión y son capaces de detectar polimorfismos, formas glicosiladas o parcialmente desnaturadas.

A continuación, se detallan los anticuerpos primarios monoclonales y policlonales utilizados en la presente Tesis Doctoral para las técnicas de *Western blotting* (WB) (véase Tabla 1) e inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia (IF) (véase Tabla 2).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para el *Western blotting* (WB).

Anticuerpo	Especie inmunizada	Especie antígenica	Secuencia antígenica	Catálogo	Lote	Proveedor	Dilución
FADD (H-181)	Humano	Conejo	Residuos 28-208	sc-5559	D0109	Santa Cruz, USA	1:5000
p-FADD (AB I)	Ratón	Conejo	Péptido incluyendo p-Ser191	2785	1	Cell Signaling, USA	1:500
Bax	Humano	Conejo	Residuos 1-171	sc-493	G-101	Santa Cruz, USA	1:1000
Cytochrome c	Paloma	Ratón	Residuos 93-104	556433	59671	BD Pharmigen, USA	1:750
PARP-1	Humano	Conejo	Péptido sintético	9542L	11	Cell Signaling, USA	1:1000
ERK 1/2	Humano	Conejo	Péptido sintético de p42	442704	D33075	Calbiochem, FRG	1:2000
p-ERK 1/2	Humano	Conejo	Péptido incluyendo p-Thr202/ p-Thr204	9101	20	Cell Signaling, USA	1:1000
JNK 1/2	Humano	Conejo	Proteína de fusión JNK2-GST	9211	6	Cell Signaling, USA	1:2000
p-JNK 1/2	Humano	Conejo	Péptido incluyendo p-Thr183/ p-Thr185	9251	10	Cell Signaling, USA	1:1000
DARPP-32	Vaca	Conejo	Residuos 134-195	sc-11365	K1009	Santa Cruz, USA	1:1000
Fos B	Humano	Conejo	Residuos 1-237	sc-28213	K0805	Santa Cruz, USA	1:1000
c-Fos	Humano	Conejo	Péptido incluyendo región interna	sc-253	D012	Santa Cruz, USA	1:1000
Cdk-5	Humano	Ratón	Proteína recombinante Cdk-5	DC17	905P604A	Lab vision, USA	1:1000
p-p70 S6 Kinase	Humano	Conejo	Péptido incluyendo p-Thr389	9205	12	Cell Signaling, USA	1:1000
p-mTOR	Humano	Conejo	Péptido incluyendo Ser2448	2971S	14	Cell Signaling, USA	1:1000
PSD-95	Humano	Ratón	PSD-95 recombinante de rata	MAB1596	6	Merck Millipore, USA	1:1000
BDNF	Humano	Conejo	Región interna de BDNF humano	sc-546	J1110	Santa Cruz, USA	1:2500
NF- κ B	Humano	Conejo	Péptido incluyendo Ser276	3034	7	Cell Signaling, USA	1:1000
5-HT2a	Humano	Conejo	Residuos 1-75	sc-166775	C0917	Santa Cruz, USA	1:1000
5-HT2a	Humano	Conejo	Residuos 22-41	RA24288	401554	Neuromics, USA	1:666
5-HT2c	Humano	Ratón	Residuos 374-458	sc-17797	L1813	Santa Cruz, USA	1:500
CB1	Humano	Conejo	Aminoácidos 461-472 de CB1 humano	23703	877720	Abcam, UK	1:200
CB2	Humano	Conejo	Péptido sintético de CB2 humano	101550	0424681-1	Cayman, USA	1:1000
D2DR	Humano	Conejo	Residuos 1-50	sc-9113	G2806	Santa Cruz, USA	1:1000
p-TH	Humano	Conejo	Péptido incluyendo p-Ser31	AB5423	2161109	Merck Millipore, USA	1:1000
DAT	Humano	Rat	Residuos N-terminales	MAB369	2251749	Chemicon, USA	1:5000
GAD 1	Humano	Conejo	Péptido sintético	5305S	1	Cell Signaling, USA	1:1000
GAD 2	Humano	Conejo	Péptido sintético	3988S	2	Cell Signaling, USA	1:1000
Enolase-2	Humano	Conejo	Péptido sintético	8171S	D20H2	Cell Signaling, USA	1:1000
NF-H and M	Humano	Ratón	NF-H no fosforilado de mamífero	SMI-32	14831502	Covance, USA	1:1000
NF-L	Cerdo	Ratón	Extracto de médula espinal porcina	5139 NR4	086K4923	Sigma, USA	1:5000
GFAP	Cerdo	Ratón	Extracto de médula espinal porcina	GFAP-GA5	C02601	Novocastra, USA	1:5000
α -Tubulin	Humano	Ratón	Microtúbulos de embriones de gallina	T5168	051k4820	Sigma, USA	1:10000
β -Actin	Humano	Ratón	Residuos 2-16	A1978	016K4823	Sigma, USA	1:10000

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo y técnica	Especie inmunogénica	Especie inmunizada	Secuencia antigénica	Catálogo	Lote	Proveedor	Dilución
Ki-67 (IHC)	Humano	Conejo	Proteína recombinante Ki-67	B7	239	Akil H. y Watson S.	1:40000
BrdU (IHC)	Análogo	Conejo	BrdU conjugado	B4	247	Akil H. y Watson S.	1:40000
Neuro-D (IHC)	Ratón	Cabra	Residuos N-terminales	sc-1084	A0616	Santa Cruz, USA	1:25000
c-Fos (IF)	Humano	Conejo	Péptido incluyendo región interna	sc-253	D012	Santa Cruz, USA	1:40000
Ki-67 (IF)	Humano	Ratón	Proteína recombinante Ki-67	Ki67-MM1	6046005	Novocastra, USA	1:12500
Iba-1 (IF)	Humano	Conejo	Residuos C-terminales	016-20001	5AJ2219	Wako, JPN	1:1000
NF-L (IF)	Cerdo	Ratón	Extracto de médula espinal porcina	5139 NR4	086K4923	Sigma, USA	1:1000
GFAP (IF)	Cerdo	Ratón	Extracto de médula espinal porcina	GFAP-GA5	C02601	Novocastra, USA	1:1000
FADD (IF)	Humano	Conejo	Residuos 28-208	sc-5559	J1613	Santa Cruz, USA	1:500
p-FADD (IF)	Ratón	Conejo	Péptido incluyendo p-Ser191	sc-33399	A1306	Santa Cruz, USA	1:250

Los anticuerpos secundarios utilizados en la presente Tesis Doctoral se encuentran listados en la Tabla 3. Fueron utilizados anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) para la técnica del WB, anticuerpos biotinizados para IHC y anticuerpos unidos a fluoróforos para IF.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios.

Diana	Especie inmunogénica	Especie inmunizada	Secuencia antigénica	Catálogo	Lote	Proveedor	Dilución	Técnica
IgG	Caballo	Ratón	Secuencia de la cadena pesada	7076	Varios	Cell Signaling, USA	5000	WB, HRP
IgG	Cabra	Conejo	Secuencia de la cadena pesada	7074	Varios	Cell Signaling, USA	5000	WB, HRP
IgG	Cabra	Rata	Secuencia de la cadena pesada	7077	Varios	Cell Signaling, USA	5000	WB, HRP
IgG	Cabra	Conejo	Secuencia de la cadena pesada	BA-1000	Varios	Vector Laboratories, USA	1000	IHC, biotinizado
IgG	Conejo	Cabra	Secuencia de la cadena pesada	BA-5000	ZA0425	Vector Laboratories, USA	1000	IHC, biotinizado
IgG	Cabra	Ratón	Secuencia de la cadena pesada	A21422	1729804	Invitrogen, USA	100	IF, Alexa fluor® 555
IgG	Burro	Conejo	Secuencia de la cadena pesada	A21206	1754421	Invitrogen, USA	100	IF, Alexa fluor® 488

REACTIVOS Y KITS

Reactivos utilizados para el WB

- Acrilamida/bis-acrilamida (solución stock de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0,8%; ProtoGel, LX, Reino Unido)
- Persulfato amónico (APS; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Tetrametiletilenediamina (TEMED; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Marcador molecular standard (Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Albúmina bovina sérica (BSA; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Sistema de quimioluminiscencia para revelado con anticuerpos conjugados con HRP (ECL™; Amersham, BK, Reino Unido)
- Líquidos de revelado (revelador y fijador; Kodak, NY, EE.UU.)
- Cocktail inhibidor de proteasas (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)

- Cocktail 3 inhibidor de fosfatasa (cantaridina, (-)-p-bromolevamisole oxalato y caliculiina A; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)

Reactivos utilizados para el HPLC-ED

- Norepinefrina (NE), dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Ácido perclórico (HClO₄; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- EDTA dipotásico (K₂-EDTA; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄; Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Ácido octano-1-sulfónico (C₈H₁₇NaO₃S; Merck Millipore, Darmstad, Alemania)

Reactivos utilizados para la IHC e IF

- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Fosfato potásico (KPO₄; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂; Acros Organics, NJ, EE.UU.)
- Trisodio citrato dihidratado (C₆H₅Na₃O₇; Fisher Scientific, LE, Reino Unido)
- Formamida (Calbiochem, CA, EE.UU.)
- Ácido Bórico (H₃BO₃; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Suero de cabra (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Suero de burro (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Cloruro de níquel II (NiCl₂; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Violeta de cresilo (Acros Organics, NJ, EE.UU.)
- Etanol absoluto (Labkerm, Barcelona, España)
- Xileno (Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Permount® (Fisher Scientific, NJ, EE.UU.)
- Aquamount (Dako Fluorescent Mounting Medium, CA, EE.UU.)
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Acetato sódico trihidrato (Fisher Scientific, LE, Reino Unido)

Reactivos utilizados para hibridación *in situ* (ISH)

- Enzimas de restricción (EcoRI-HF, HindIII, BamHI-HF y XbaI: New England Biolabs, MA, EE.UU.)

- Agarosa (Eurogentec, Lieja, Bélgica)
- Bromuro de etidio (Bioron, Mannheim, Alemania)
- Blue Loading Dye (Promega, WI, EE.UU.)
- S³⁵ uridina trifosfato (S³⁵ UTP; Perkin Elmer, MA, EE.UU.)
- S³⁵ citosina trifosfato (S³⁵ CTP; Perkin Elmer, MA, EE.UU.)
- Adenosina trifosfato (ATP; Roche, Penzberg, Alemania)
- Citosina trifosfato (CTP; Roche, Penzberg, Alemania)
- Guanina trifosfato (GTP; Roche, Penzberg, Alemania)
- Ditiotreititol (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Inhibidor ARNasa (Qiagen, Hilden, Alemania)
- Polimerasas (Qiagen, Hilden, Alemania)
- Líquido de centelleo (Perkin Elmer, MA, EE.UU.)
- Trietanolamina (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Anhídrido acético (Panreac, Barcelona, España)
- Fosfato trisódico (Na₃PO₄; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Dextrán sulfato (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- ARNasa A (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- ARNt (Roche, Penzberg, Alemania)
- ADNasa (Roche, Penzberg, Alemania)

Reactivos genéricos

- Ácido clorhídrico (HCl; Labkem, Barcelona, España)
- Cloruro potásico (KCl; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Cloruro sódico (NaCl; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Dimetil-sulfóxido (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Glicerol (Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Glicina (H₂NCH₂COOH; Panreac, Darmstad, Alemania)
- Tris-(hidroximeil)-aminometano (C₃H₈N₃O₃; Panreac, Darmstad, Alemania)
- Dodecilsulfato sódico (Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Fosfato monopotásico dihidrógeno (KH₂PO₄; Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Fosfato disódico (HNa₂PO₄; Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Fosfato dipotásico anhídrido (K₂HPO₄; Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Cloruro de magnesio (MgCl₂; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Metanol (Panreac, Darmstad, Alemania)

- Pirofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Isopentano (Panreac, Darmstad, Alemania)

Kits

- Kit para la determinación de proteínas por el método de la BCA (Thermo Scientific, IL, EE.UU.)
- Kit de bloqueo Avidina/Biotina (Vector Laboratories, CA, EE.UU.)
- Kit Vectastein ABC HRP (Vector Laboratories, CA, EE.UU.)
- Qiagen Clean Up Kit para purificar el DNA de las muestras (Qiagen, Hilden, Alemania)

MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

Material para WB

- Mini-geles de poliacrilamida (geles de 6 x 8 cm, con un grosor de 1 mm), peines de Teflón™ de 1 mm, cubeta de electroforesis, casete de transferencia, esponjas compresoras de fibra de vidrio (Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Membranas de nitrocelulosa (poro de 0,2 y 0,45 μm), papel de cromatografía Whatman 3MM (Amersham, BK, Reino Unido)
- Películas autorradiográficas (Hyperfilm ECL™; Amersham, BK, EE.UU.)
- Casete de exposición membrana-película 18 x 24 cm (Hypercassette™; Amersham, BK, Reino Unido)

Material para HPLC-ED

- Precolumna Tracer ODS2 C18; 2 a 5 μm de tamaño de partícula (Teknokroma, Barcelona, España)
- Columna Spherisorb S3 ODS1 C18; 3 μm de tamaño de partícula, 4,6 mm x 10 cm (Waters, Barcelona, España)
- Filtro para jeringuilla Spartan-3 de 0,45 μm de poro (Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Jeringuillas de 1 ml (BD Plastipak™; Barcelona, España)

Material para IHC, IF e ISH

- Portaobjetos Superfrost® Plus y cubreobjetos (Thermo Scientific, IL, EE.UU.)
- Medio de congelación OCT (Leica, Wetzlar, Alemania)
- Matriz para embeber tejidos M-1 (Thermo Scientific, IL, EE.UU.)
- Cuchillas para criostato Leica DB80 LS (Leica, Wetzlar, Alemania)

- Super Pap Pen, cubetas de vidrio para tinción 10 x 8 x 6 cm y cestas verticales para portaobjetos (25 portaobjetos) (Electron Microscopy Sciences, PA, EE.UU.)
- Cámaras de hibridación (22 x 22 x 2 cm; Sharlau Chemie, Barcelona, España)
- Columnas cromatográficas Micro Bio-Spin (Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Films BioMax ® MR film (Carestream® Kodak®; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.)
- Casete de exposición membrana-película 35 x 43 cm (Hypercassette™; Amersham, BK, Reino Unido)

Material para el sacrificio de los animales y disección de regiones cerebrales

- Material para decapitación (guillotina; Nemi Scientific, MA, EE.UU.)
- Disección (tijeras, bisturí, espátulas, pinzas, cucharas y cilindro metálico de disección; Labbox, Barcelona, España)

Equipos utilizados

- Homogenizador (Ultra-turrax IKA® T10 basic; Staufen, Alemania)
- Sonicador (Sonifier 250; Branson Ultrasonics Corporation, CT, EE.UU.)
- Espectrofotómetro (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Fuente de electroforesis (Power Pac 200; Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Baño termorregulador en agitación (Unitronic OR; JP Selecta, Barcelona, España) y estático (Isotemp ® GDP 10; Fisher Scientific, LE, Reino Unido)
- Escáner para medición de autoradiogramas (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (Waters, Barcelona, EE.UU.)
- Detector electroquímico (ISAAC Waters Electrochemical Detector, CA, EE.UU.)
- Interfase busSAT/IN Module (Waters, IL, EE.UU.)
- Criostato CM1520 (Leica, Hamburgo, Alemania)
- Microscopio confocal Leica DMI 4000B acoplado a un sistema láser TCS SPE (Leica, Hamburgo, Alemania)
- Microscopio Leica DMR (Leica, Hamburgo, Alemania)
- Fuente de electroforesis para geles de agarosa (Embi Tec, CA, EE.UU.)
- Escáner para la medición de geles de agarosa (Gel Doc™ XR system; Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Estufa (Nahita drying oven model 631 plus; Despatch, IL, EE.UU.)
- Contador de centelleo (LS 1801; Beckman Coulter, CA, EE.UU.)
- Microcentrífuga 5415 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)

- Microcentrífuga Biocen 22R, rotor 222 (Ortoalresa, Madrid, España)
- Rotor de sobremesa (Labnet, Barcelona, España)
- pH-metro basic 20 (Crison, Barcelona, España)
- Agitador orbital gyro-rocker SSL3 (Stuart, Reino Unido) y agitador horizontal (Thermolyne; Thermo-Fisher, IL, EE.UU.)
- Termómetro EcoScan Series Temp JKT (Eutech instruments, Thermo Scientific, IL, EE.UU.) con una prueba rectal RET-3 (Pfysutemp instruments, inc, NJ, EE.UU.)
- Unidad de shock electroconvulsivo 7801 (Ugo Basile, Verase, Italia)
- Cubos cilíndricos (40 cm de altura y 32 cm de diámetro) para el test de natación forzada
- Campo abierto cilíndrico (80 cm de diámetro y 60 cm de altura)
- Condicionamiento de preferencia de lugar (dos compartimentos de 30 x 30 x 35 cm y un compartimento central de 30 x 10 x 35 cm)
- Webcam c270 (Logitech HD webcam, Lausana, Suiza)
- Sistema de purificación para agua, Mili-Q Synthesis A10 (Merck Millipore, NJ, EE.UU.)

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- GraphPad Prism, versión 6 (GraphPad Software, Inc., CA, EE.UU.)
- Behavioral Tracker Software (Versión 1.5, CA, EE.UU.)
- Quantity One, versión 4.6.9 (Bio-Rad, CA, EE.UU.)
- Smart Video Tracking, versión 2.5 (PanLab, Barcelona, España)
- ImageJ (National Institute of Health, MD, EE.UU.)
- Empower Pro (Waters, Barcelona, España)

ANIMALES

En todos los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral se utilizaron ratas macho albinas a distintas edades durante el desarrollo (distintos estadios de la adolescencia o etapa adulta) de la cepa Sprague-Dawley. Para realizar los experimentos iniciales los animales se compraron a Charles River (L'Arbresle, Francia). Posteriormente, se creó un stock propio de ratas criadas en el estabulario de la Universitat de les Illes Balears tras comprar, a la misma casa comercial, varias camadas de ratas macho y hembra para generar la colonia de ratas. Las ratas se estabularon individualmente o en grupos de 2 a 4, según la edad, tamaño, y la prueba comportamental a realizar, en cajas de metacrilato transparente (Panlab, Barcelona, España) con un lecho de virutas de madera (Ultrasorb; Panlab, Barcelona, España), y con acceso libre a una dieta estándar (Panlab A04) y agua bajo unas condiciones ambientales controladas de temperatura (20 ± 2 °C), humedad (50-60 %) y ciclo de luz/oscuridad (12 horas; período diurno 08:00 hasta las 20:00 h., intensidad lumínica \approx 300 lux). Durante el período de aclimatación, los animales fueron acostumbrados al manejo del investigador para reducir el estrés en el momento de realizar los procedimientos y se asignaron a cada grupo experimental de manera aleatoria.

Los procedimientos experimentales se llevaron según la guía ARRIVE (McGrath y Lilley, 2015) y las directrices éticas establecidas en el Consejo de la Unión Europea 2010/66/EU. Como se establece en el Real Decreto 53/2013, todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat de les Illes Balears y la Comunitat de les Illes Balears. Se realizaron todos los esfuerzos posibles con tal de minimizar el número de animales de experimentación durante los estudios, así como su sufrimiento.

TRATAMIENTOS

A continuación, se detallarán los diversos tratamientos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. En todos los tratamientos, la inoculación del fármaco de elección se llevó a cabo por vía intraperitoneal (i.p.), disuelto en suero salino (0,9 % NaCl) o en el vehículo dimetil-sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.) en función de las características de solubilidad del fármaco, a un volumen de 1 ml/kg de peso corporal.

Determinación de la supervivencia celular con el análogo sintético de timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)

El BrdU (Calbiochem, CA, EE.UU.) es un nucleótido análogo sintético de la timidina. Dicha homología le permite incorporarse en el ADN durante la fase de división substituyendo a la timidina endógena (Brown et al., 2003). La incorporación del compuesto permite marcar las células en la fase de replicación para trazar su viabilidad. En los procedimientos experimentales en los que se administró BrdU (véanse Tablas 4 y 5), los animales fueron pretratados con un total de 6 pulsos (50 mg/kg, i.p. 2 dosis al día) disuelto en DMSO durante 3 días consecutivos (García-Fuster et al., 2010) y 4 días antes del tratamiento con los diferentes psicoestimulantes, para así favorecer la correcta incorporación del compuesto (Thomas et al., 2007). Este protocolo evita la dilución del análogo tras la división celular (Dayer et al., 2003) marcando las células de nueva generación y permitiendo evaluar correctamente la supervivencia celular en el momento del sacrificio del animal. Por otro lado, en otro diseño experimental (véase Tabla 6 y Anexo Experimental I), los animales recibieron en la etapa adulta una única dosis de BrdU de 200 mg/kg i.p. previa a la realización del tratamiento para determinar la supervivencia celular inducida por este fármaco.

Inhibición de la proliferación celular basal con el fármaco temozolamida (TMZ)

La TMZ (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) es un agente alquilante utilizado frecuentemente como tratamiento antineoplásico para el glioblastoma multiforme (Nokia et al., 2012; Brozka et al., 2017). El fármaco tiene la habilidad de alquilar o metilar el ADN de las células en división dañándolo y provocando la muerte celular. Para determinar el efecto producido por el TMZ en ratas se llevó a cabo un experimento preliminar (véase Figura 3 del Anexo Experimental I) donde una serie de ratas con un peso comprendido entre 200-250 g, se trataron con TMZ, disuelto en DMSO, durante 1 ciclo (5 días a la dosis diaria de 25 mg/kg TMZ, i.p.) o 2 ciclos (5 días cada ciclo: 25 mg/kg TMZ, i.p.; 10 días en total con dos días de descanso entre ciclos). Los animales control recibieron en paralelo inyecciones con el vehículo DMSO durante todos los días de administración. Vistos los resultados obtenidos en el experimento preliminar (véase Anexo Experimental I), para futuros experimentos se seleccionó la administración de 2 ciclos de TMZ para inhibir la proliferación celular (véase Tabla 6 y Anexo Experimental I).

Tratamientos con drogas de abuso psicoestimulantes

Tratamientos repetidos con el psicoestimulante cocaína durante diferentes etapas de la adolescencia

Se realizaron diversos tratamientos con el psicoestimulante cocaína (gentilmente proporcionado por la ‘Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad’, España). La cocaína se administró de manera repetida (7 o 14 dosis, una dosis al día, 15 mg/kg, i.p.) en ratas a diferentes etapas durante la adolescencia (véanse detalles experimentales en la Tabla 4 y en los Artículos I, II y V). La administración diaria de cocaína se llevó a cabo en una sala contigua diferente a la de estabulación, ya que se conoce que administrar la droga en un ambiente nuevo mejora la inducción de una sensibilización psicomotora (Badiani et al., 1995). Los animales del grupo control recibieron suero salino en lugar de cocaína en las mismas condiciones experimentales.

Reexposición aguda a la cocaína durante la etapa adulta

En algunos diseños experimentales, las ratas fueron reexpuestas a cocaína en la etapa adulta durante la fase de abstinencia. En particular, tras 32 días de abstinencia después de haber recibido un tratamiento repetido con cocaína (15 mg/kg durante 7 días consecutivos) en la adolescencia (PND 33-39), los animales fueron reexpuestos de manera aguda a la droga (15 mg/kg, i.p.) o a suero salino en PND 71 (véanse Procedimientos 4 y 5 de la Tabla 4 y Artículo V) y de nuevo en PND 98 (solo para el Procedimiento 5 de la Tabla 4 y Artículo V).

Tabla 4. Representación esquemática de los procedimientos experimentales realizados con cocaína.

Procedimiento	BrdU (PND)	Paradigma	Edad (PND)	Ensayo comportamental	Sacrificio (PND)	Técnicas utilizadas	Artículo
1. Cocaína	26-28 33-35 40-42	1 x 15 mg/kg, i.p., 7 días	33-39 40-46 47-53	-	40 47 54	WB, IHC	I y II
2. Cocaína	26-28	1 x 15 mg/kg, i.p., 7 días	33-39	FST (PND 63)	64	WB, IHC	I y II
3. Cocaína	26-28	1 x 15 mg/kg, i.p., 14 días	33-46	FST (PND 63)	64	WB, IHC	I y II
4. Cocaína	-	1 x 15 mg/kg, i.p., 7 días 1 única inyección	33-39 71	-	71	WB, IHC	V
5. Cocaína	-	1 x 15 mg/kg, i.p., 7 días 1 única inyección	33-39 71 y 98	FST (PND 71 y 98), OF (PND 73) y sacarosa 1% (PND 76-77)	99	WB, IHC	V

Tratamientos en régimen de atracón o “binge” con diferentes derivados anfetamínicos

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron diferentes derivados anfetamínicos. En este caso, los animales recibieron inyecciones siguiendo un régimen de atracón (cada 2-3 horas, 3 veces al día, i.p.), durante 1 o 4 días consecutivos en dos ventanas de la adolescencia y durante la etapa adulta, con los diferentes derivados anfetamínicos: MDMA a una dosis de 5 mg/kg (gentilmente proporcionado por la ‘Agencia Española de Medicamento y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad’, España), (+)-metanfetamina hidroclicorada a 2,5, 5 y 7,5 mg/kg (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) o d-anfetamina sulfato a 5 mg/kg (Abcam, CB, Reino Unido) (véase Tabla 5 o Artículos III, IV, VI, VII y Anexo Experimental II). Los animales del grupo control recibieron suero salino en lugar de anfetaminas a los tiempos indicados.

Reexposición aguda y repetida a la metanfetamina durante la etapa adulta

Tras 34 días en abstinencia forzada después de haber recibido un tratamiento en atracón con metanfetamina a una dosis de 5 mg/kg durante 4 días consecutivos (PND 54-57), los animales se reexpusieron a la metanfetamina de manera aguda (PND 91, véase Procedimiento 10 o Artículo VII) o de manera repetida (PND 91-95, véase Procedimiento 11 o Anexo Experimental II). La reexposición aguda se llevó a cabo mediante una única inyección de metanfetamina a una dosis 5 mg/kg, i.p o suero salino (véase Tabla 5 y Artículo VI). La reexposición repetida constó de una dosis diaria a 5 mg/kg, i.p durante 5 días consecutivos o suero salino a los mismos tiempos. En dicha reexposición, solo recibieron metanfetamina de manera repetida los animales que habían tenido una historia previa con la droga durante la adolescencia PND 54-57 (véase Tabla 5 y Anexo Experimental II).

Tabla 5. Representación esquemática de los procedimientos experimentales realizados con los diferentes derivados anfetamínicos.

Procedimiento	BrdU (PND)	Paradigma	Edad (PND)	Ensayo comportamental	Sacrificio (PND)	Técnicas utilizadas	Artículo
6. MDMA	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 1 día	36	-	37	WB, IHC	III, IV
	48-50		57		58		
	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	33-36		37		
	48-50		54-57		58		
7. METH	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 1 día	36	-	37	IHC	IV
	48-50		57		58		
	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	33-36		37		
	48-50		54-57		58		
8. D-AMPH	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 1 día	36	-	37	IHC	IV
	48-50		57		58		
	27-29	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	33-36		37		
	48-50		54-57		58		
9. METH		3 x 2,5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	>60	FST, Sacarosa 1%, Consumo voluntario de METH	>60	WB, IHC, HPLC	VI
		3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días					
		3 x 7,5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días					
10. METH	48-50	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	54-57	-	91	WB, IHC	VII
		1 única inyección	91				
11. METH	48-50	3 x 5 mg/kg, 2 h, i.p., 4 días	54-57	FST (PND 59), NSF (PND 61)	97	IHC, HPLC	Anexo II
		1 x 5 mg/kg, i.p., 5 días	91-95	FST (PND 96)			

Aproximaciones terapéuticas mediante la técnica del shock electroconvulsivo (ECS)

Como se ha mencionado anteriormente, el ECS es una técnica que induce múltiples efectos sobre distintos sistemas neurobiológicos (Ríos y Vicente 2001). La técnica es utilizada como un tratamiento contra la depresión mayor multiresistente a fármacos y además se especula que podría ejercer su efecto antidepresivo mediante la generación de nuevas neuronas en el hipocampo (Malberg, 2004). El ECS se aplicó de manera rutinaria en ratas con un peso de 200-250 g utilizando la unidad de terapia electroconvulsiva (ECT; Ugo Basile, Verase, Italia). Para la aplicación del ECS, los animales se conectaron a la unidad electroconvulsiva a través de clips auriculares

utilizando una intensidad 95 mA para 0,6 s y a una frecuencia 100 Hz, de manera aguda (1 sesión) o repetida (5 sesiones, 1 por día) según diseños experimentales previos (Menargues et al., 1990; Lillethorup et al., 2015; García-Fuster y García-Sevilla, 2016). Los animales control fueron conectados a los clips auriculares, pero sin aplicar la corriente eléctrica (véase Tabla 6 y Anexo I).

Tabla 6. Representación esquemática de los procedimientos experimentales realizados mediante la técnica de shock electroconvulsivo (ECS).

Procedimiento	TMZ (PND)	Paradigma	Edad (PND)	Ensayo comportamental	Sacrificio (PND)	Técnicas utilizadas	Artículo	
12. ECS	-	Agudo (1 sesión) o repetido (5 sesiones, 1 diaria) a 95mA, 0,6 s, 100 HZ	>60	-	>60	WB, IHC	Anexo I	
13. ECS	-	Repetido (5 sesiones, 1 diaria) a 95mA, 0,6 s, 100		FST basal, 1, 3 y 7 días después de la última sesión		-		IHC
14. ECS	-	HZ		-				
15. ECS	-	Agudo (1 sesión) a 95mA, 0,6 s, 100 HZ		FST basal y 1 día después de la última sesión	-	-		
16. TMZ+ECS	>60	5 sesiones, una diaria, 3 h después de la última inyección de TMZ durante el segundo ciclo		FST basal, 1, 3 y 7 días después de la última sesión	>60	IHC		
17. TMZ+ECS				-				
18. METH+ECS (continuación EXP 11)	-	5 sesiones, una diaria, 3 h después de la última inyección de METH durante la reexposición en la etapa adulta	91-95	FST (PND 59), NSF (PND 61)	97	IHC, HPLC	Anexo II	
				FST (PND 96)				

ENSAYOS CONDUCTUALES

Tests para evaluar el fenotipo prodepresivo

Evaluación del desespero conductual mediante el test de natación forzada

El test de natación forzada (FST: *Forced Swim Test*) es una técnica utilizada para detectar el potencial efecto antidepresivo de determinadas sustancias. La prueba fue originariamente desarrollada por Porsolt (Porsolt et al., 1977), para determinar los efectos inducidos por la mayoría de antidepresivos conocidos en su momento. Posteriormente, Porsolt sugirió que la prueba de natación forzada podría ser un buen modelo para testar los efectos prodepresivos en modelos animales junto a otras pruebas

comportamentales (Porsolt et al., 1978). El test consiste en someter al animal a una situación de estrés del cual no puede escapar. La rata es forzada a nadar en un espacio confinado (normalmente un cilindro) de donde inicialmente tiende a intentar escapar, pero a medida que pasa el tiempo adopta un estado más inmóvil. Esta inmovilidad es lo que se denomina desespero conductual, y es utilizado como un índice de desesperación o depresión. A continuación, se detalla el procedimiento particular llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral.

Cada animal se introdujo individualmente en un cubo cilíndrico de 41 cm de altura por 32 cm de diámetro lleno con agua a una temperatura de 25 ± 1 °C hasta una altura de 25 cm (véase Figura 11). El agua se reemplazó para cada animal y la temperatura fue continuamente monitorizada. La prueba constó de dos fases. En la primera fase, los animales fueron introducidos en el cubo para nadar individualmente durante 15 min y una vez finalizada la prueba volvieron a ser estabulados en sus respectivas jaulas. La segunda fase se llevó a cabo 24 horas después de la primera, donde los animales fueron introducidos de nuevo en el cubo para nadar bajo las mismas condiciones, pero por un período de 5 min. Durante esta fase, todas las pruebas se grabaron (Logitech HD webcam c270; Lausana, Suiza) para el posterior análisis de las conductas llevadas a cabo por cada animal (actividad vs. inmovilidad) mediante la utilización de un programa informático (Behavioral Tracker, CA, EE.UU.) utilizado por un investigador que desconocía el diseño experimental.

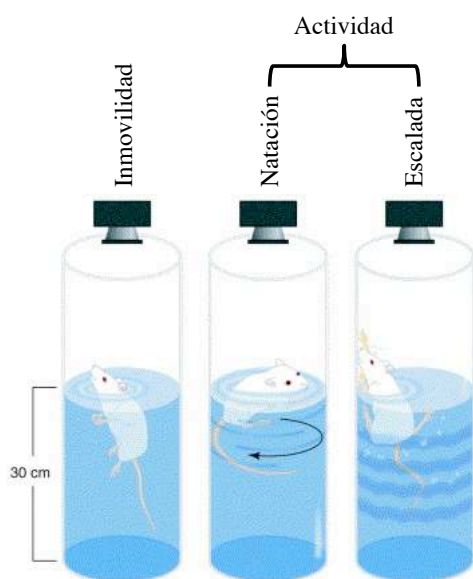


Figura 11. Comportamientos exhibidos por las ratas sometidas al FST. El FST es utilizado para testar los efectos de fármacos antidepresivos al igual que los efectos prodepresivos inducidos tras determinados tratamientos. La inmovilidad mostrada en dicho test es considerada como una medida de desespero conductual y se utiliza como un índice prodepresivo. Imagen tomada de Cryan et al., (2002).

Evaluación de la conducta exploratoria mediante el test del campo abierto

La ansiedad es una respuesta fisiológica normal producida por amenazas reales o potenciales, pero una excesiva respuesta puede desencadenar en una ansiedad patológica. Se han desarrollado multitud de tests comportamentales para detectar estados proansiogénicos, siendo unos de los tests más utilizados el campo abierto o la exposición al campo abierto con motivación hacia la comida tras un período de restricción alimentaria.

El test del campo abierto (OF: *Open Field*) es una prueba comportamental originalmente descrita por Hall (1934) para estudiar la conducta exploratoria en un ambiente novedoso en roedores (Hall, 1934). Dicha prueba consiste en someter al animal a un ambiente novedoso rodeado por paredes del cual no puede escapar. El campo abierto suele ser un aparato circular, con paredes altas y bien iluminado donde la rata es depositada en el centro y cuyo comportamiento es grabado durante un tiempo determinado. De hecho, se ha convertido en una prueba esencial para determinar los niveles de ansiedad en animales de experimentación basándose en dos factores: la prueba individual (el animal es separado de su grupo) y la agorafobia (el campo abierto es un espacio muy grande en comparación a su habitáculo o medio natural). Estos dos factores pueden mostrar estados proansiogénicos en animales sociales y temerosos a los espacios abiertos como son los roedores. Además, la prueba del campo abierto puede complementarse con la introducción de estímulos motivadores como es la comida tras un período de restricción del alimento (NSF: *Novelty-Suppressed Feeding*). El NSF combina el conflicto entre los efectos ansiogénicos producidos al introducir la rata en un ambiente novedoso y la sensación de hambre producida por la restricción de comida antes de la prueba (de 24 a 48 h). En este caso, durante la exposición del animal al OF se deposita comida en la zona central del aparato para evaluar su motivación hacia la comida después de la restricción. Los animales con un fenotipo más proansiogénico tienden a no comer y entrar menos veces a la zona central del aparato. A continuación, se detallarán los procedimientos particulares llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral.

Para determinar los niveles de ansiedad en el OF, los animales fueron introducidos individualmente en la zona central de un campo abierto circular de 80 cm de diámetro y rodeado por paredes de 60 cm de altura. La conducta exploratoria (distancia recorrida, tiempo inactivo, tiempo invertido en el centro, latencia a volver al

centro) se grabó durante 5 min. En el NSF, a las ratas se les privó durante 48 h del acceso a la comida antes de la exposición del OF circular. En la zona central del OF se depositaron 3 pellets de comida y los animales se introdujeron en la zona periférica. La conducta exploratoria (latencia a ir al centro y latencia a comer) se grabó durante 5 min. Los vídeos obtenidos tanto para el OF como el NSF se analizaron con un programa informático (Smart versión 2,5; PanLab, Barcelona, España) utilizado por un investigador que desconocía el diseño experimental.

Evaluación de la respuesta hedónica mediante el consumo de sacarosa en un modelo de doble elección en botella

La anhedonia, o pérdida de interés hacia estímulos placenteros, es un síntoma común en una gran variedad de desórdenes neuropsiquiátricos como por ejemplo la depresión. Además, es uno de los síntomas que pueden ser evaluados en animales de experimentación y otorga información sobre el sistema mesolímbico, conocido por ser el mayor componente del sistema de recompensa (Markou, 1998). La prueba de preferencia a la sacarosa es frecuentemente utilizada para evaluar el nivel de anhedonia en roedores. Normalmente, animales que presentan un fenotipo proanhedónico tienden a consumir menos sacarosa disuelta en agua en un modelo de doble elección en botella (Slattery et al., 2007). A continuación, se detallará la puesta a punto inicial (dosis para inducir preferencia) así como el procedimiento experimental llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral.

Para determinar la dosis de sacarosa necesaria para inducir preferencia, se realizó un estudio preliminar de dosis respuesta (0,1, 0,5, 1 y 2 % de sacarosa) utilizando el método de doble elección en botella. Para realizar dicho estudio, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (n=25, 5 animales por grupo) estabuladas individualmente en cajas para poder evaluar el consumo diario para cada animal de manera individual (agua vs. sacarosa, 48 horas). Primero, se introdujo una segunda botella de agua en la caja para habituar al animal a beber de dos botellas. Al día siguiente, una de las botellas de agua fue sustituida (posición derecha o izquierda de la caja de manera aleatoria) por una que contenía sacarosa. A las 24 horas, la posición entre las botellas de agua y sacarosa se intercambió para evitar el condicionamiento del animal a beber de la misma botella. Finalmente, la botella que contenía sacarosa fue sustituida de nuevo por otra con agua para comprobar que las ratas bebían de manera indiferente de ambas botellas. Los resultados obtenidos mostraron una clara preferencia

de los animales por la sacarosa a las concentraciones de 1 y 2 % (véase Figura 12).

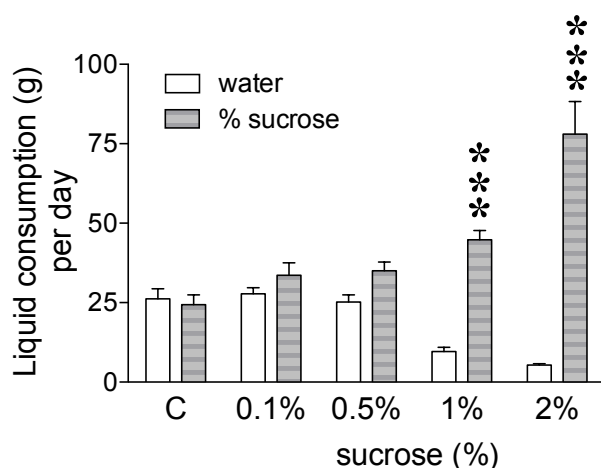


Figura 12. Estudio preliminar dosis respuesta (0,1-2%) para determinar la preferencia por el consumo de sacarosa utilizando el método de libre elección en botella para el estudio de la respuesta hedónica. En la gráfica se muestra un marcado aumento en el consumo para las dosis de 1 % y 2 % de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm SEM del total de agua o sacarosa consumida (g) por día. ANOVA de dos vías seguido de un test de Bonferroni *** $p < 0,001$ comparando el consumo de agua vs. sacarosa.

Por tanto, para los experimentos posteriores se decidió utilizar la dosis al 1 % de sacarosa debido a que fue la dosis de menor concentración capaz de producir una elevada preferencia por el consumo por día (véase Tabla 4, 5 o Artículos V y VI).

Tests para evaluar el fenotipo proadictivo

Evaluación del consumo voluntario de metanfetamina en un modelo de doble elección en botella

La administración crónica de psicoestimulantes es capaz de producir cambios a nivel de plasticidad neuronal en el cerebro induciendo dependencia, abstinencia y búsqueda compulsiva de la droga. Durante el síndrome de abstinencia, se producen numerosos cambios comportamentales como ansiedad, depresión, búsqueda compulsiva de la droga y recaída al consumo. Un método utilizado para determinar la recaída al consumo durante el período de abstinencia es la prueba del consumo voluntario de droga, utilizando un modelo de doble elección en botella (Wheeler et al., 2009). A continuación, se detallará la puesta a punto inicial y el procedimiento llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral.

Para determinar la dosis de metanfetamina necesaria para inducir aversión, se realizó un estudio preliminar de dosis respuesta (0, 5, 10 y 20 mg/l) utilizando el método de doble elección en botella. Para realizar dicho estudio, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (n=25, 5 animales por grupo) estabuladas individualmente en cajas para poder evaluar el consumo diario para cada animal de manera individual (agua vs. metanfetamina, 7 días). Inicialmente, se introdujo una segunda botella de agua en la caja para habituar al animal a beber de dos botellas. Al día siguiente, una de las botellas

de agua fue sustituida (posición derecha o izquierda de la caja de manera aleatoria) por una que contenía metanfetamina disuelta. A las 24 horas, la posición entre las botellas de agua y metanfetamina se intercambi6 para evitar el condicionamiento del animal a beber de la misma botella. El intercambio en la posici6n de las botellas se realiz6 diariamente durante 7 d1as. Finalmente, la botella que conten1a metanfetamina fue sustituida de nuevo por otra con agua para comprobar que las ratas beb1an de manera indiferente de ambas botellas. Los resultados obtenidos mostraron una clara aversi6n por la metanfetamina a la dosis m1s elevada de 20 mg/l (v6ase Figura 13), por lo que se utiliz6 esta dosis para experimentos futuros (v6ase Tabla 5 y Art1culo VI).

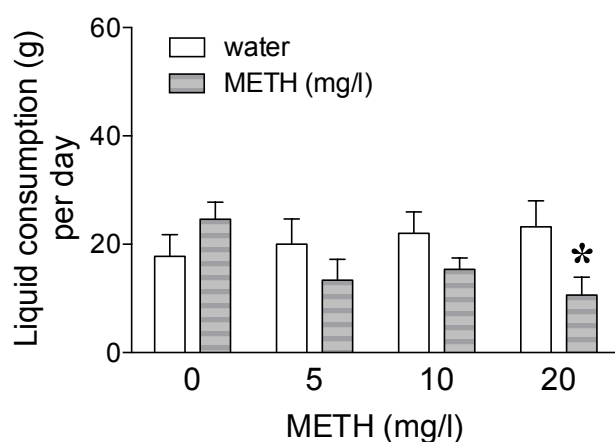


Figura 13. Estudio preliminar dosis respuesta (5-20 mg/l) para determinar el consumo voluntario de metanfetamina utilizando el m6todo de libre elecci6n en botella. En la gr1fica se muestra una disminuci6n en el consumo para la dosis de 20 mg/l de metanfetamina. Los datos representan el promedio \pm SEM del total de agua o metanfetamina consumida (g) por d1a. Student *t*-test * $p < 0,05$ comparando el consumo de agua vs. metanfetamina.

Condicionamiento de preferencia de lugar por la metanfetamina

El condicionamiento de preferencia de lugar (CPP: *Conditioned Place Preference*) es un comportamiento aprendido presente tanto en animales vertebrados como invertebrados (Tzschentke, 2007). El CPP es un m6todo ampliamente utilizado para caracterizar las propiedades de recompensa o aversivas de f1rmacos y drogas de abuso (Olds y Milner, 1954). El condicionamiento ocurre cuando los animales muestran preferencia por un lugar respecto a otro una vez se les ha administrado con una sustancia reforzante.

El procedimiento se llev6 a cabo en unas cajas de madera pintadas de color negro o blanco con diferentes gu1as visuales (caja negra decorada con lunares blancos y caja blanca decorada con l1neas negras y diferentes patrones t1ctiles en los suelos met1licos para mejorar la discriminaci6n ente compartimentos por parte de los animales. Ambos habit1culos (30 x 30 x 35 cm) estaban conectados entre s1 por un compartimento central de color gris sin decoraci6n (30 x 10 x 35 cm) y con un suelo

metálico distinto al de los habitáculos. Para confinar los animales durante las sesiones de condicionamiento, cada habitáculo contaba con una puerta para bloquear la entrada al compartimento central y al otro habitáculo. A continuación, se detallará la puesta a punto llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral.

El procedimiento experimental constó de tres fases (véase Figura 14): en la primera fase o precondicionamiento, los animales fueron habituados dos días consecutivos al CPP durante 15 min. Durante el segundo día de precondicionamiento, los animales se grabaron para analizar el nivel de preferencia basal por cada compartimento utilizando un programa informático (Behavioral Tracker, CA, EE.UU.). En la segunda fase o fase de condicionamiento, las sesiones de condicionamiento se realizaron alternando en cada habitáculo (durante 8 días consecutivos) la administración droga (en el compartimento de menor preferencia basal) (metanfetamina 5 mg/kg i.p., 1 ml/kg, una vez al día) con sesiones de administración de salino (0,9 % NaCl 1 ml/kg) en el compartimento con mayor preferencia basal. En cada sesión de condicionamiento, al animal se le administró metanfetamina o salino y fue confinado en el compartimento previamente asignado durante 30 min. En la tercera fase o fase de postcondicionamiento, todos los animales fueron inyectados con salino y se depositaron en el compartimento central del CPP con las puertas abiertas para permitir la libre exploración por los compartimentos durante 15 min. En la fase de postcondicionamiento, se grabaron todos los animales para analizar el tiempo que destinaban a cada compartimento durante la libre exploración. El nivel de preferencia para los compartimentos se calculó en función del tiempo destinado en cada compartimento por separado respecto al tiempo total (excluyendo el tiempo invertido en el compartimento central). Todas las fases del CPP fueron realizadas en luz roja para disminuir los efectos ansiogénicos producidos al introducir a un animal en un ambiente completamente novedoso y con elevada luminosidad.

Condicionamiento de preferencia de lugar

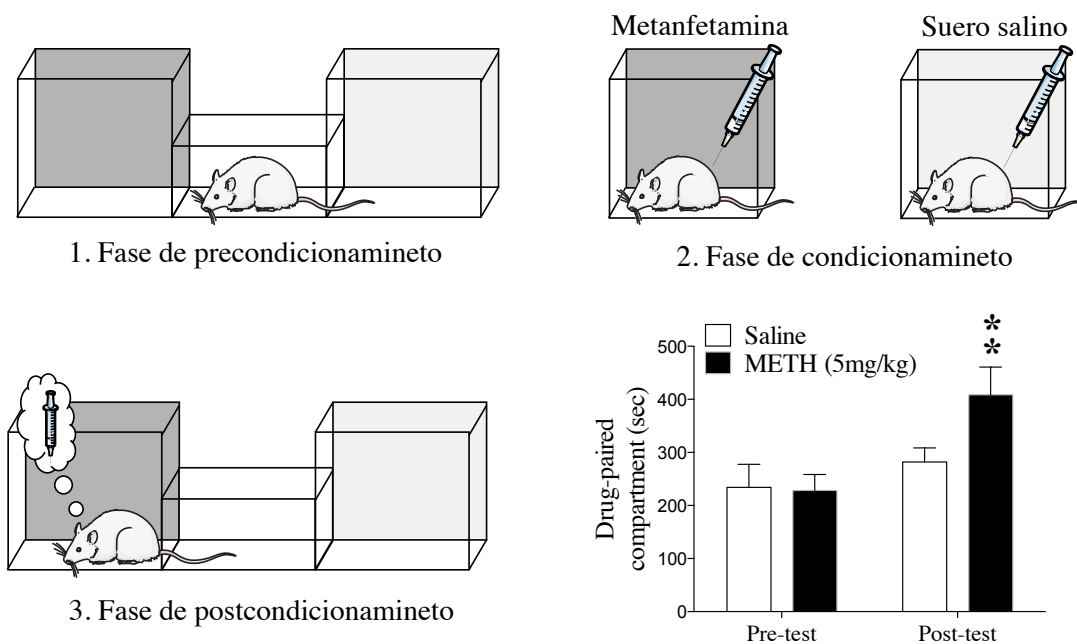


Figura 14. Representación esquemática de las diferentes fases del condicionamiento de preferencia de lugar (CPP). En la primera fase, los animales exploran libremente el aparato para determinar los niveles de preferencia basal a los compartimentos. En la segunda fase, los animales son condicionados a la droga mediante la administración de metanfetamina y salino en diferentes compartimentos. En la tercera fase, los animales exploran libremente el aparato para determinar los efectos del condicionamiento. En la gráfica se muestra un efecto de condicionamiento preferente tras la administración de metanfetamina. ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak $**p < 0,01$ comparando el condicionamiento entre la fase de precondicionamiento vs. la fase de postcondicionamiento en los animales tratados con metanfetamina.

SACRIFICIO Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS CEREBRALES

Los animales se sacrificaron por decapitación y sin anestesia a los tiempos indicados (véanse Tablas 4, 5 y 6). Los cerebros se extrajeron con material quirúrgico sobre un soporte metálico en frío. Una vez extraído el cerebro, se cortó de manera sagital para separar ambos hemisferios. Se diseccionaron diferentes regiones del hemisferio derecho como el hipocampo, el estriado o la corteza prefrontal. Las regiones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso para inmunodetectar proteínas mediante la técnica del *western blotting* (WB) o los niveles de monoaminas utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector electroquímico (HPLC-ED). El hemisferio izquierdo se congeló rápidamente en isopentano (Panreac, Darmstad, Alemania) a una temperatura de entre -20 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su futuro procesamiento en el criostato para el marcaje de proteínas mediante la técnica de IHC o del ARNm mediante la ISH.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE WESTERN BLOTTING (WB)

La detección y cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica del WB, una técnica analítica utilizada para la identificación de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas presente en extractos celulares o tejidos mediante la utilización de anticuerpos específicos. La técnica consta de tres pasos: en primer lugar se lleva a cabo una separación electroforética de la muestra biológica, en la cual las proteínas migran con una velocidad diferencial, en función de su peso molecular o tamaño, a través de un gel de poliacrilamida; en segundo lugar la proteínas atrapadas en el gel son transferidas a un soporte sólido como una membrana adsorbente de nitrocelulosa, donde quedan inmovilizadas; en tercer lugar estas membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos para las proteínas diana inmovilizadas en las membranas de nitrocelulosa, por reconocimiento de la secuencia antigénica. Finalmente se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios que reconocen las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G (IgG) que componen los anticuerpos primarios unidos a las proteínas dianas. Estos anticuerpos secundarios suelen estar unidos a un trazador para ser detectables, el cual emite una señal que puede ser cuantificada y será proporcional a la cantidad de anticuerpo fijado y, por lo tanto, a la cantidad de proteína diana presenta en la membrana. A continuación, se detallan los pasos y condiciones utilizados para la detección y cuantificación de proteínas de esta Tesis Doctoral.

Preparación de muestras cerebrales: homogenado total

Las muestras de diferentes regiones cerebrales del cerebro de rata fueron preparadas para su posterior análisis mediante la técnica del WB. Para la inmunodetección de las proteínas dianas en el homogenado total de las regiones cerebrales de interés las muestras fueron homogenizadas con un politrón (IKA® T10 basic ultra-turrax) durante 2 ciclos de 10 segundos en un tampón de homogenización que contenía 50 mM de Tris HCl, pH 6,8, 1 mM de EDTA, 2 % de SDS y un cóctel de inhibidores de proteasas (1 %) y otro de fosfatasa (1 %) en una proporción de 1:10 de peso/volumen. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a dos ciclos de sonicación de 5 segundos, para conseguir el lisado de las membranas celulares para la liberación del contenido celular. De los homogenados resultantes fueron recogidas alícuotas (50

μl) para analizar la concentración de proteínas totales presentes en cada muestra mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

El método de la BCA para la cuantificación de proteínas fue desarrollado por Paul K. Smith y colaboradores (Smith et al., 1985), y se basa en un reactivo que contenía BCA. La técnica es una combinación de la reacción de biuret (reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} entre las proteínas en un medio alcalino) y la detección colorimétrica del catión cuproso (Cu^{+}) capaz de formar un complejo púrpura con el BCA. El complejo púrpura emite un pico de luz a 562 nm, de manera que la absorbancia a dicha longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra. Para conocer la concentración de proteína de cada muestra, es fundamental generar una curva patrón con diluciones de concentraciones conocidas a partir una proteína común como la albúmina bovina sérica (BSA) para poder extrapolar los valores obtenidos de las muestras biológicas. En el presente trabajo, para determinar la concentración de proteína total presente en el homogenado fue utilizado el kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific, IL, EE.UU.). Primero, se preparó una curva patrón (por duplicado) mediante la dilución de BSA (2 mg/ml). Se generó una curva de 8 puntos con concentraciones de BSA de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μg en un volumen final de 100 μl. Seguidamente, 5 μl de muestra fueron disueltos en 95 μl de agua miliQ (por triplicado para cada muestra). Posteriormente, se añadieron 2 ml de una mezcla (50:1) de reactivo A (compuesto por BCA en 0,1 M de hidróxido de sodio) y reactivo B (compuesto por 4 % de sulfato cúprico) a la curva patrón y muestras. La curva patrón y muestras fueron mezcladas en el vórtex e incubadas durante 30 min a 37 °C en agitación constante (20 rpm). Una vez finalizada la incubación, las muestras se dejaron atemperar durante 5 min y se leyó la absorbancia a 562 nm con un espectrofotómetro (bio Photometer; Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Una vez leída la curva patrón, se determinó el contenido proteico presente en cada muestra (por triplicado) frente a un blanco de reactivo sin proteína. La media obtenida de los valores por triplicado de las muestras fue dividida por 5 para obtener el contenido (μg) en 1 μl. El resultado obtenido fue la estimación final de la concentración de proteína de la muestra.

Una vez determinada la concentración de proteínas totales presente en cada muestra, las muestras fueron ajustadas con tampón de homogenización para alcanzar una concentración de 6 μg/μl. La muestra fue diluida 1:1 con el tampón de Laemmli 2X

(doble concentrado) que contenía 100 mM Tris HCl pH 6,8, 3 % SDS, 20 % de glicerol, 5 % de β -mercaptoetanol y \approx 0,1 % de azul de bromofenol, alcanzando una concentración de proteína final de 3 μ g/ μ l. Al final de procedimiento, las muestras fueron hervidas para desnaturalizar las proteínas durante 4 min a 95 °C, una alícuota se almacenó a -80 °C y la otra a -20 °C hasta su posterior uso.

Condiciones experimentales para el WB

Las separaciones electroforéticas realizadas en este trabajo fueron llevadas a cabo en geles desnaturalizantes y discontinuos de poliacrilamida (SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970). Para preparar el gel resolutivo o *running gel*, según el peso molecular de la proteína de interés, se adicionó entre un 10 % y un 12 % de acrilamida/bis-acrilamida (ProtoGel) ya que la concentración del gel determina el rango de separación de las proteínas en el gel de electroforesis. Además, se adicionó 0,75 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,05 % de APS, y 0,05 % de TEMED. Inmediatamente se vertieron 5 ml de líquido entre los cristales del gel y se cubrieron cuidadosamente con agua para su correcta polimerización durante 45 min a temperatura ambiente. Una vez polimerizado el gel resolutivo se retiró el agua y se añadió el gel concentrador o *stacking gel*, al 4 % de acrilamida/bis-acrilamida, 166 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % de SDS, 0,05 % de APS, y 0,05 % de TEMED. Antes de la polimerización del gel concentrador se introdujeron peines de teflón de 1 mm de grosor para formar los carriles donde se cargaron las distintas muestras. Para preparar los geles se utilizaron soportes Mini-Protean® 3 Cells (minigeles de 6 x 8 cm de 1 mm de grosor; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

En experimentos rutinarios fueron cargados en los pocillos elaborados en el gel de concentración volúmenes de muestra que contenían 40 μ g de proteína total. En el extremo izquierdo del gel, junto a las muestras, se cargaron 5 μ l de un patrón estándar coloreado (Prestained SDS-PAGE Standards, BroadRange, Bio Rad, CA, EE.UU.) que presentaba proteínas marcadoras con pesos comprendidos entre 7 y 200 kDa que permitió identificar la banda correspondiente a la proteína diana (de masa molecular conocida) a través del corrimiento de las proteínas del marcador. Una vez cargadas las muestras en los pocillos del gel, las células Mini-Protean se embebieron en el tampón de electroforesis, compuesto de 25 mM Tris-HCl pH 8,6, 0,2 M de glicina y 0,1 % SDS. Entre los electrodos se aplicó inicialmente una corriente eléctrica de 80 V mientras las

muestras migraban en el gel concentrador. La corriente eléctrica fuerza el desplazamiento a través del gel de las proteínas presentes en las muestras cargadas. Una vez que las proteínas traspasan el gel concentrador y pasan a la zona del gel de resolución, empiezan a distinguirse las diferentes bandas compuestas del marcador estándar, momento en el cual se incrementó la corriente a 120 V. La porosidad del gel de resolución permite la separación en función del peso molecular de las proteínas presentes en la muestra, las proteínas de menor tamaño migrarán a mayor velocidad que las de mayor tamaño. Cuando el frente de la electroforesis (marcado por el compuesto azul de bromofenol) salió del gel, se dio por concluida la electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis y las proteínas correctamente separadas en el gel en función de su peso molecular, fueron transferidas a un medio más estable y rígido como es una membrana de nitrocelulosa (Amersham, BK, Reino Unido). Según el tamaño molecular de la proteína diana a detectar, se utilizó una membrana con un diámetro de poro de 0,2 μm (para la inmunodetección de proteínas de bajo peso molecular) o de 0,45 μm (para la inmunodetección del resto de proteínas con mayor peso molecular). La transferencia se realizó, como se describe en el procedimiento de Towbin (Towbin et al., 1979), aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel. Para ello se preparó el casete de transferencia, el gel se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa, sumergida en tampón de transferencia para evitar la formación de burbujas de aire entre la membrana y el gel que dificultaría la correcta transferencia de proteínas. El gel y la membrana se ponen en contacto a ambos lados con papel Whatmann 3MM (3 mm de grosor; Amersham, BK, Reino Unido) y esponjas de fibra de vidrio, que ayudan a mantener el sistema unido y húmedo bajo presión en el casete de transferencia formando el denominado sándwich (véase Figura 15). El sándwich se introdujo en la cubeta de transferencia y se llenó con tampón de transferencia previamente enfriado a 4 °C, compuesto por 25 mM de Tris-HCl a pH 8,3, 0,19 M de glicina y 20 % de metanol. En el interior de la cubeta se introdujo un bloque de hielo y un imán para mantener el tampón en constante agitación y frío. Seguidamente la cubeta se cubrió con hielo con la finalidad de mantenerla a una temperatura de 4 °C durante todo el proceso de transferencia. La transferencia se realizó a 110 V durante 2 horas y 30 min en tampón de transferencia.

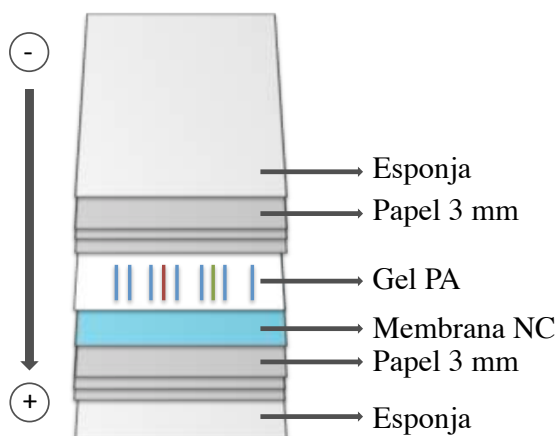


Figura 15. Preparación del sándwich de transferencia. Se pone en contacto el gel de poliacrilamida (PA) con la membrana de nitrocelulosa (NC), cubiertos a ambos lados con papel Whatmann de 3 mm y esponjas de fibra de vidrio.

Al finalizar la transferencia, se extrajeron las membranas de nitrocelulosa del sándwich y se comprobó la correcta transferencia de las proteínas en la membrana observando la presencia del marcador molecular en ellas. Seguidamente se lavaron para eliminar el exceso de metanol 3 veces durante 5 min en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS; 137 mM de NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM de Na_2HPO_4 y 1,38 mM de KH_2PO_4) para inmunodetectar proteínas diana sin fosforilar, o en tampón Tris salino pH 7,6 (TBS; 20 mM Tris-HCl y 137 mM NaCl) para proteínas dianas fosforiladas. Previamente a la incubación con los anticuerpos se procedió al bloqueo de los lugares de fijación inespecíficos para evitar el ruido de fondo o *background*. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en una solución bloqueadora que contenía 10 % de leche en polvo desnatada y 0,2 % de Tween-20 (T-20, monolaureato de polioxietileno-sorbitan, detergente que reduce el ruido de fondo de la membrana, Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.) en PBS (para proteínas no fosforiladas) o TBS (para proteínas fosforiladas). Una vez finalizado el bloqueo, las membranas se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 min en PBS o TBS antes de ser incubadas con el anticuerpo primario. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con agitación constante en una solución bloqueadora que contenía el anticuerpo primario (véase Tabla 1). Dependiendo de la proteína diana a determinar, la solución bloqueadora contenía 5 % leche, 0,5 % BSA y 0,2 % T-20 en PBS, o bien, 5 % BSA en T-TBS. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 min en PBS/TBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, ratón o cabra ligado a peroxidasa de rábano) en PBS-T/TBS-T en una dilución de 1:5000 (véase Tabla 3). Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas de nuevo 3 veces con PBS/TBS antes de ser reveladas.

Sistema de detección y cuantificación de proteínas

Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con un enzima (peroxidasa de rábano), que en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cataliza una reacción quimioluminiscente de oxidación del luminol. La detección de la actividad peroxidasa se realizó mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada (ECL™; Amersham, BK, Reino Unido). Es un método de emisión de luz no radioactiva para detectar antígenos específicos inmovilizados en una membrana, directa o indirectamente, con anticuerpos marcados con una peroxidasa de rábano (HRP) (véase Figura 16). El sistema HRP/ H_2O_2 cataliza la oxidación del luminol (sustrato luminiscente, es una diacilhidracida cíclica) en condiciones alcalinas. La luz producida en la reacción quimioluminiscente (428 nm) presenta un máximo de intensidad a los 5-20 min de haber reaccionado el ECL con la HRP del anticuerpo secundario. Una vez pasado ese tiempo de máxima exposición la intensidad lumínica empieza a decaer progresivamente. La reacción presenta una semivida de 60 min.

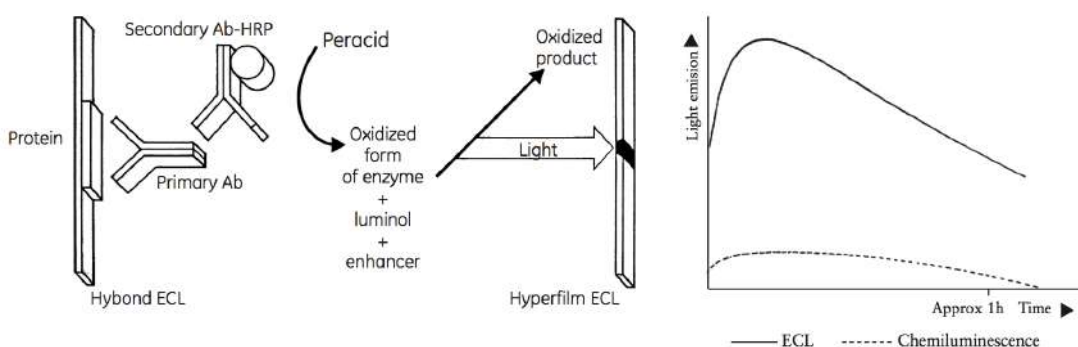


Figura 16. Principios del reactivo ECL para el WB. A la izquierda se muestra una representación esquemática de la detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando los reactivos ECL. A la derecha se observa la gráfica de emisión de luz frente al tiempo, mostrando las diferencias entre la quimioluminiscencia y el ECL. Figura tomada de GE Healthcare.

Las membranas se incuban durante 2 min con una mezcla proporcional de los reactivos A y B que forman el kit. Posteriormente fueron secadas con papel absorbente, plastificada con film transparente e introducidas en un casete de revelado (Hypercassette™; Amersham, BK, Reino Unido). En un cuarto oscuro, se introduce una película fotográfica sensible a la luz (Hyperfilm ECL™; Amersham, BK, Reino Unido) en el casete con las membranas. La luz emitida por la reacción de oxidación del luminol anteriormente descrita, incide sobre el film fotográfico dejando marcas a la altura donde se encuentra la proteína que se quiere detectar. El tiempo de exposición del film

fotográfico puede variar entre 1-60 min y dependerá de varios factores como la calidad y cantidad del anticuerpo y la concentración de proteína diana presente en la membrana. Una vez realizada la exposición, el film se sumerge en un líquido de revelado durante 1 min, lavado con agua, y sumergido en un líquido fijador durante 1 min. Finalmente se obtuvo un autorradiograma con bandas inmunoreactivas para su posterior análisis.

Los autorradiogramas fueron escaneados con un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad, CA, EE.UU.) y se obtuvieron imágenes digitalizadas que posteriormente fueron procesadas con el software (Quantity One 4.6.9; Bio Rad, CA, EE.UU.). El software permitió calcular el peso molecular de las bandas inmunodetectadas utilizando el marcador molecular como referencia. Posteriormente fueron calculados los valores de densidad óptica integrada (IOD: *Integrated Optical Density*) de cada banda inmunorreactiva obtenida de cada gel presente en el film. Los cálculos de la variación en los contenidos de proteína diana cargada se compararon con los niveles obtenidos de las muestras control cargadas en el mismo gel (véase Figura 17). Primero se calculó el promedio de las IODs de las muestras del grupo control y posteriormente se calculó el porcentaje de variación de cada una de las IODs de las muestras cargadas con respecto al promedio control en el mismo gel. Cada una de las muestras fue cargada como mínimo 3 veces en distintos geles para cada proteína diana que se quiso inmunodetectar. Una vez calculado el porcentaje de variación proteica de cada muestra en los diferentes geles, se calculó el promedio de los porcentajes obtenidos en cada uno de los geles para cada muestra y así obtener una estimación final. Por último, se calculó el promedio y el error estándar (SEM) de los valores finales de cada muestra perteneciente a un mismo grupo experimental para obtener un valor porcentual para cada proteína diana y poder compararlos entre si estadísticamente.

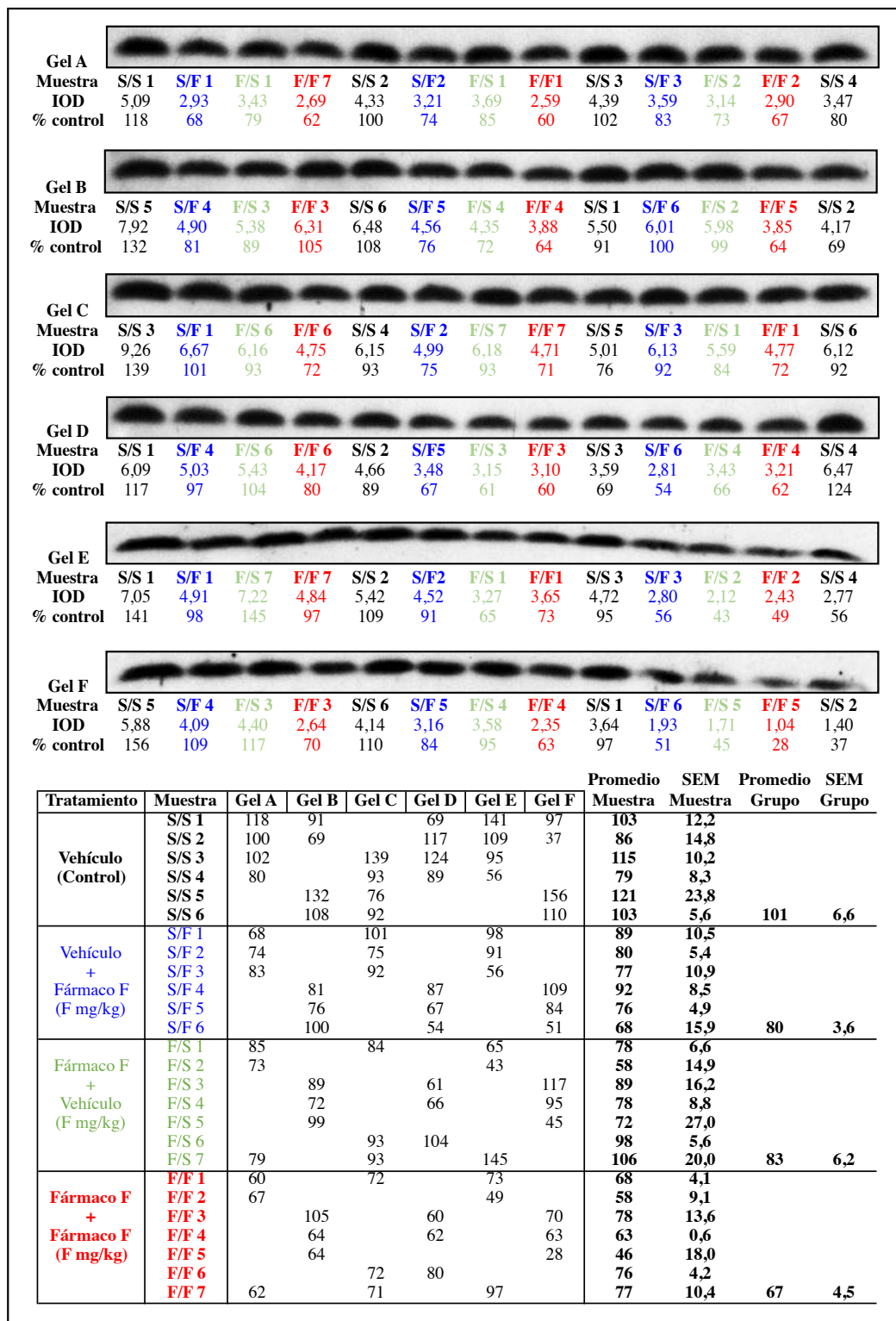


Figura 17. Representación de un experimento definido del efecto ejercido de un fármaco F sobre el contenido hipocampal de la proteína X, administrado durante el período adolescente (F/S: 5 mg/kg, i.p., 3 veces al día, 4 días), durante la etapa adulta (S/F: 5 mg/kg, i.p.) o durante la adolescencia y la etapa adulta (F/F). Las ratas del grupo control (C) fueron recibieron en paralelo inyecciones de suero salino (1 ml/kg i.p.). Los animales fueron sacrificados por decapitación 45 min después de la última administración. Las muestras hipocampales fueron preparadas para determinar el contenido total de proteína X mediante la técnica del WB utilizando anticuerpos primarios específicos contra la proteína. En la parte superior de la imagen se muestran los inmunoblots representativos (40 µg de proteína) de la proteína X. En la tabla inferior se muestra el análisis de los inmunoblots mostrados en el panel superior.

Reciclado de las membranas de nitrocelulosa (*Stripping*)

Una vez expuesta la membrana de nitrocelulosa a la película fotográfica, ésta puede volver a ser utilizada eliminando los anticuerpos primarios y secundarios mediante el método denominado *stripping* para poder utilizar nuevos anticuerpos y así detectar diferentes proteínas diana. El método se utilizó de manera rutinaria como control negativo, se seleccionó una proteína control (*housekeeping*), normalmente inalterada a los tratamientos farmacológicos, para comprobar que los cambios observados en las proteínas dianas no fueron debidos a errores de carga en los geles. En cada gel, los niveles de proteínas relacionadas con el citoesqueleto como la β -actina o α -tubulina fueron cuantificados como control de carga. En el caso de las proteínas fosforiladas se cuantificaron las formas totales para calcular el balance entre la forma fosforilada y la proteína total.

En el procedimiento de *stripping*, las membranas fueron rehidratadas realizando 3 lavados de 10 min cada uno, y se incubaron en agitación durante 30 min a 50 °C en tampón de *stripping* compuesto por 62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8, 100 mM de β -mercaptoetanol y 2 % SDS. Después de 3 lavados rápidos con PBS se realizaron 3 lavados más de 10 min en agitación constante. Seguidamente las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente en solución bloqueadora para reincubarlas con el anticuerpo primario durante toda la noche *reprobing* (véase Tabla 1). Al día siguiente, como se ha descrito anteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (véase Tabla 3), se incubaron con el sistema de detección quimioluminiscente ECL y finalmente se expusieron a una película fotográfica que fue escaneada para cuantificar las bandas autorradiográficas.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIANA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

La IHC es una técnica ampliamente utilizada en la investigación que se basa en la utilización de anticuerpos específicos contra determinados antígenos (generalmente proteínas) y permite identificar la localización, distribución y expresión de dicho antígeno a nivel tisular o celular. Esta técnica consta de varios pasos: en primer lugar, la preparación del tejido, el hemisferio izquierdo de cada animal fue seccionado en un criostato y montado en un portaobjetos. En segundo lugar, se llevó a cabo la fijación del

tejido para preservar los antígenos y la estructura tisular. Finalmente, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios marcados (detección indirecta) unidos a enzimas para visualizar los complejos antígeno-anticuerpo. A continuación, se detallan los pasos y condiciones utilizadas para la detección y cuantificación de proteínas de esta Tesis Doctoral.

Preparación de la muestra (sampleo y montaje de secciones)

Los cerebros fueron fijados a un soporte utilizando un medio de congelación OCT (Leica, Wetzlar, Alemania) para cortar el tejido. Una vez el medio de congelación se solidificó, el cerebro fue embebido en una matriz M-1 (Thermo Scientific, IL, EE.UU.) utilizada para cubrir tejidos congelados que van a ser cortados en un criostato y así evitar roturas del tejido durante el corte. Mediante la utilización de un criostato (Leica CM1520, Hamburgo, Alemania), se seccionó el hemisferio izquierdo realizando cortes coronales a varias alturas dependiendo de la región a estudiar. Para determinar la presencia de marcadores en el estriado dorsal, se recogieron secciones desde -1,30 hasta -1,72 mm a nivel del bregma y para analizar marcadores en el giro dentado del hipocampo se obtuvieron secciones desde -1,80 hasta -6,72 mm a nivel del bregma (Paxinos y Watson, 2006). Para cada animal, una de cada 8 secciones, con un grosor de 30 μ m, se montó en un portaobjetos (Superfrost® Plus; Thermo Scientific, IL, EE.UU.) y se almacenó de nuevo a -80 °C hasta su posterior marcaje IHC (véase Figura 18).

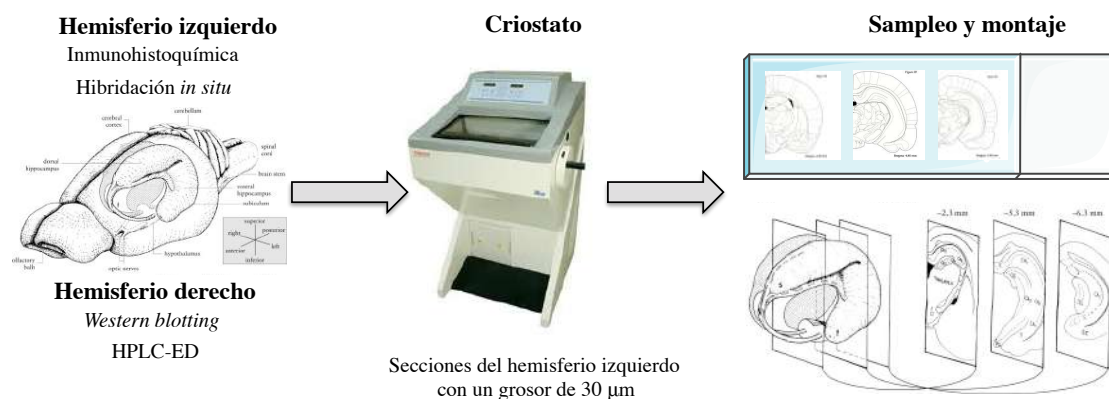


Figura 18. Representación esquemática del proceso de sampleo y montaje de secciones para marcajes IHC. El hemisferio izquierdo se seccionó en un criostato con un grosor de 30 μ m a una temperatura de -20 °C y se montó en un portaobjetos para obtener secciones representativas de diferentes zonas del estriado dorsal o del giro dentado del hipocampo.

Condiciones experimentales para la IHC

Proliferación celular endógena (Ki-67)

Para determinar la proliferación celular endógena, se utilizó el marcador Ki-67, un marcador endógeno intrínseco que se expresa en células durante la fase activa de la división (primeras 25 horas) del ciclo celular (G₁M). Las secciones fueron fijadas durante 1 hora a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4 % (PFA: 0,2 M de buffer NaPO₄, 4 % paraformaldehído a pH 7-7,4) para preservar la histología y antígenos presentes en la muestra (véase Figura 22). Una vez fijado el tejido, las secciones se lavaron 5 min con tampón fosfato salino para IHC (PBS-IHC: 0,02 M de buffer KPO₄, 0,9 % NaCl) y seguidamente se llevó a cabo la exposición del antígeno. La mayoría de tejidos fijados requieren de este paso previo al marcaje con el anticuerpo, debido a la formación de puentes metileno entre proteínas durante el proceso de fijación que pueden enmascarar los antígenos. El método de exposición antigénica rompe los puentes metileno exponiendo el antígeno y permitiendo la correcta unión con el anticuerpo. Para el marcaje del Ki-67, el método utilizado para la exposición del antígeno fue el de exposición del epítipo inducido por calor (HIER). Las secciones fueron sumergidas en una solución de trisodio citrato dihidratado al 10 % (Fisher Scientific, NJ, EE.UU.) a 90 °C durante 1 hora. Una vez finalizado el proceso de exposición del antígeno se dejaron atemperar las secciones en el buffer de sodio citrato durante 20 min y se lavaron con PBS-IHC durante 5 min. A continuación, las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno (Acros Organics, NJ, EE.UU.) al 0,3 % disuelto en PBS-IHC durante 30 min para inhibir la actividad endógena de las peroxidasas presentes en el tejido y así evitar falsos positivos reduciendo el ruido inespecífico. Una vez finalizada la inhibición de la actividad peroxidasa, las secciones fueron nuevamente lavadas en PBS-IHC 3 veces durante 5 min. Para realizar los siguientes pasos de incubación en cámaras de hibridación, los portaobjetos fueron sellados con un bolígrafo hidrofóbico (Super Pap Pen; Electron Microscopy Sciences, PA, EE.UU.) para evitar la pérdida de líquido por difusión una vez se deposite sobre el portaobjetos con las secciones. Una vez selladas las secciones, se introdujeron en las cámaras de hibridación, que contenían PBS-IHC para evitar la desecación del tejido en los pasos de incubación, y se incubaron con una solución bloqueadora (BSA de cabra: 0,9 % NaCl, 0,6 % K₂HPO₄, 0,2 % KH₂PO₄, 1 % BSA, 0,4 % tritón X-100 y suero de cabra al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones

inespecíficas del anticuerpo primario y secundario. Al finalizar el bloqueo, las secciones fueron incubadas en las cámaras de hibridación durante toda la noche con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-Ki-67 (véase Tabla 2) (gentilmente proporcionado por la Dra. Huda Akil y el Dr. Stanley J. Watson, Universidad de Michigan, MI, EE.UU.) diluido en la solución bloqueadora a la concentración apropiada (1:40000). Al día siguiente, tras lavar las secciones 3 veces durante 5 min con PBS-IHC, se incubaron de nuevo en las cámaras de hibridación con el anticuerpo secundario biotinilizado anti-conejo (Vector Laboratories, CA, EE.UU.) diluido en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario biotinilizado, las secciones fueron nuevamente lavadas en PBS-IHC por triplicado y se volvieron a incubar con Avidina/Biotina (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, CA, EE.UU.) diluida en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora. La biotina unida covalentemente al anticuerpo secundario (biotinización) se une con una alta afinidad a la avidina del complejo Avidin/Biotina peroxidasa presente en la dilución, favoreciendo la formación de grandes complejos unidos al anticuerpo secundario. Al finalizar la incubación, las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min y posteriormente con acetato sódico trihidrato 0,1 M (Fisher Scientific, NJ, EE.UU.) por duplicado 5 min.

Supervivencia neuronal temprana (NeuroD)

La supervivencia temprana de neuronas en desarrollo (células de nueva proliferación con una edad comprendida entre 4-10 días y con un fenotipo neuronal) se visualizó utilizando el marcador NeuroD, un factor de transcripción con una expresión puntual, restringido a células en diferenciación cuyo destino final será un linaje neuronal. Las secciones se fijaron con PFA al 4 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el proceso de fijación, se lavaron con PBS-IHC durante 5 min e incubaron con peróxido de hidrógeno al 0,1 % para inhibir la actividad peroxidasa endógena del tejido (véase Figura 22). Posteriormente, fueron lavadas por triplicado con PBS-IHC 5 min, se sellaron con un bolígrafo hidrofóbico Pap Pen y se introdujeron en las cámaras de hibridación donde fueron incubadas con la solución bloqueadora (BSA de burro: 0,9 % NaCl, 0,6 % K_2HPO_4 , 0,2 % KH_2PO_4 , 1 % BSA, 0,4 % tritón X-100 y suero de burro al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario policlonal producido en cabra anti-NeuroD (véase Tabla 2) (Santa Cruz, CA, EE.UU.) a la

concentración apropiada (1:25000). Después de incubar durante toda la noche con el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min e incubadas con el anticuerpo secundario biotinilizado anti-cabra (Vector Laboratories, CA, EE.UU.) diluido en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones fueron lavadas de nuevo en PBS-IHC por triplicado 5 min y se volvieron a incubar con una dilución de Avidina/Biotina en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora. Las secciones se lavaron con PBS-IHC por triplicado 5 min y posteriormente con sodio acetato 0,1 M por duplicado 5 min.

Supervivencia celular (BrdU)

La supervivencia de células nacidas en un determinado punto, fue determinado con el marcador BrdU (Calbiochem, CA, EE.UU.), un análogo sintético de la timidina que se incorpora en la fase S del ciclo celular durante la duplicación del ADN (Wojtowicz y Kee, 2006). Las secciones se fijaron con PFA al 4 % durante 1 hora, se lavaron con PBS-IHC por triplicado 5 min y se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0,3 % durante 30 min para inhibir la actividad peroxidasa endógena (véase Figura 22). Para el marcaje con BrdU, el antígeno fue expuesto por inducción de calor (HIER) en una dilución compuesta por un 50 % de formamida (Calbiochem, CA, EE.UU.) y un 50 % de buffer 2X sodio-salino citrato (2X SSC: 1,75 % NaCl y 0,9 % sodio citrato a pH 7-7,4) a una temperatura de 65 °C durante 2 horas seguido por 2 lavados en 2X SSC de 5 min. Una de las características del BrdU es que un agente intercalante, por lo tanto, para exponer correctamente el antígeno, las hebras del ADN han de estar desnaturalizadas. La desnaturalización de las hebras se llevó a cabo incubando las secciones con ácido clorhídrico 2 N (HCl; Labkem, Barcelona, España) a una temperatura de 37 °C durante 30 min. Inmediatamente después de la incubación con el HCl, para neutralizar el pH, las secciones fueron bañadas con ácido bórico 0,1 M a pH 8,5 (H₃BO₃; Sigma-Aldich, CA, EE.UU.) durante 10 min. Para eliminar los restos de la dilución de H₃BO₃, las secciones se lavaron con PBS-IHC por triplicado 5 min. Las secciones presentes en los portaobjetos fueron selladas con un bolígrafo hidrofóbico (Pap Pen) y se introdujeron en las cámaras de hibridación. Para evitar el ruido de fondo o *background* las secciones fueron bloqueadas con un kit de Avidina/Biotina (Avidin/Biotin blocking kit SP-2001; Vector Laboratories, CA, EE.UU.). El kit de avidina/biotina bloquea la biotina endógena, receptores para biotina y lugares de unión para la avidina presente en el tejido. En el primer paso las secciones se incubaron con el

bloqueo para avidina diluido 1:5 en PBS-IHC durante 15 min. Al finalizar el bloqueo con avidina, las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min y se incubaron con el bloqueo para biotina diluido 1:5 en PBS-IHC 15 min. Las secciones fueron lavadas de nuevo por triplicado con PBS-IHC 5 min y fueron incubadas de nuevo con una solución bloqueadora (BSA suero de cabra) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizado el bloqueo con BSA, las secciones fueron incubadas en las cámaras de hibridación durante toda la noche con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-BrdU (véase Tabla 2) (gentilmente proporcionado por la Dra. Huda Akil y el Dr. Stanley J. Watson, Universidad de Michigan, MI, EE.UU.) diluido en la solución bloqueadora a la concentración apropiada (1:40000). Al día siguiente, tras lavar las secciones 3 veces durante 5 min con PBS-IHC, se incubaron en las cámaras de hibridación con el anticuerpo secundario biotinilizado anti-conejo diluido en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario biotinilizado, las secciones fueron nuevamente lavadas en PBS-IHC por triplicado y se incubaron en Avidina/Biotina diluida en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora. Las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min y posteriormente con sodio acetato 0,1 M por duplicado 5 min.

Actividad neuronal (c-Fos)

La actividad neuronal fue visualizada mediante la utilización del marcador c-Fos, un factor de transcripción de genes de expresión rápida. Las secciones fueron fijadas con PFA al 4 % durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas con PBS-IHC 5 minutos e incubadas con peróxido de hidrógeno al 0,1 % (véase Figura 22). Posteriormente, fueron lavadas por triplicado con PBS-IHC 5 min y selladas con un bolígrafo hidrofóbico (Pap Pen) para introducirlas en las cámaras de hibridación e incubarlas con la solución bloqueadora (BSA suero de cabra) durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-c-Fos (véase Tabla 2) (Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido en solución bloqueadora (1:40000). Después de incubar durante toda la noche con el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min e incubadas con el anticuerpo secundario biotinilizado anti-conejo diluido en solución bloqueadora (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron de nuevo en PBS-IHC por triplicado 5 min y se volvieron a incubar con Avidina/Biotina en solución bloqueadora

(1:1000) durante 1 hora. Las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 minutos y con sodio acetato 0,1 M por duplicado 5 min.

Detección y cuantificación de las proteínas

La detección de los lugares de unión antígeno-anticuerpo se llevó a cabo sumergiendo las secciones en una solución de sodio acetato 0,1 M que contenía 0,04 % del cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) y 0,015 % peróxido de hidrógeno durante 6 min para los marcadores Ki-67 y BrdU. El DAB en presencia del complejo A/B reacciona con el peróxido de hidrógeno generando un sustrato de color marrón que precipita, dando lugar a una señal visible en las zonas del tejido donde se encuentran estos marcadores (véase Figura 22). A los marcadores NeuroD y c-Fos, además de sumergirlos en una disolución durante 6 min con 0,04 % DAB y 0,015 % de peróxido de hidrógeno, se les añadió 1,25 % del cromógeno cloruro de níquel II (NiCl₂; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.) que proporciona una tonalidad liliácea a la muestra. La reacción de precipitación de los cromógenos se detuvo bañando las secciones en PBS-IHC por triplicado 5 min y con agua miliQ por triplicado 5 min. Para reconocer estructuras presentes en el tejido, fue necesaria la utilización de un colorante del grupo de las oxacinas llamado violeta de cresilo (Acros Organics, NJ, EE.UU.) capaz de marcar los núcleos celulares con una tonalidad azul-violeta tras 1 min de exposición para el marcador Ki-67. Las secciones para los diferentes marcadores anteriormente descritos se deshidrataron en un gradiente ascendente de etanol (50, 70, 80, 95, 100 %) evitando la formación de burbujas y así conseguir un óptimo resultado de tinción y visualización. Seguidamente, los portaobjetos fueron sumergidos un mínimo de 3 minutos en xileno (Scharlau, Barcelona, España) y las secciones de tejido se cubrieron con un cristal cubreobjetos con Permount® (Fisher Scientific, NJ, EE.UU.). Finalmente, el montaje de las secciones se dejó secar un mínimo de 10 min hasta que el Permount® quedó totalmente seco y las secciones estuvieron listas para el montaje al microscopio.

Para el conteo de los marcadores realizados por IHC, se utilizó un microscopio de luz Leica DMR (Hamburgo, Alemania) que permitió observar el inmunomarcaje en el giro dentado del hipocampo (Ki-67, NeuroD, BrdU y c-Fos) o estriado dorsal (c-Fos) enfocando a través del grosor de la muestra para cada sección utilizando un objetivo de 63 aumentos (63X; Leica, Hamburgo, Alemania). Para las secciones del giro dentado,

se utilizó un método estereológico imparcial para el conteo (Malberg y Duman, 2003) en el cual una de cada ocho secciones se contabilizó a lo largo del giro dentado del hipocampo (véanse más detalles en Figura 19). El número de células positivas se corrigió en relación al área del giro dentado de las secciones contabilizadas. Las áreas de cada sección se midieron con un densitómetro (GS-800; Bio-Rad, CA, EE.UU.) para todas las ratas, así los resultados fueron expresados como el número total de células positivas en el giro dentado dividido por el área total analizada (mm²). Este método de cuantificación permite corregir las posibles diferencias en las áreas de conteo inducidas por los tratamientos (Amrein et al., 2011), lo cual es muy relevante cuando se compara el número total de células marcadas con diferentes marcadores y a distintas edades durante el desarrollo.

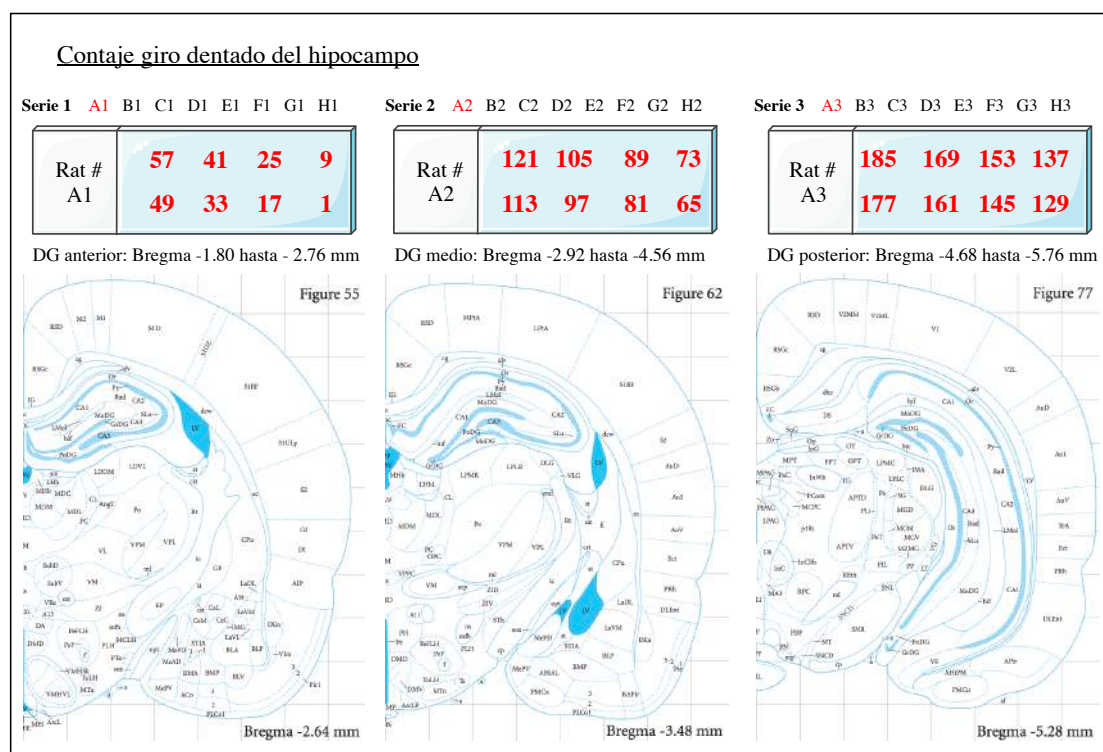


Figura 19. Representación esquemática del conteo realizado en el giro dentado del hipocampo. Fue utilizada una letra de cada serie (correspondiente a las diferentes alturas del giro dentado a lo largo del bregma), de tal manera que fue contada una sección de cada ocho secciones recogidas.

Para las secciones del estriado dorsal, se contaron 2 secciones representativas (p. ej., bajo la capsula externa) entre -1,30 hasta -1,80 mm del bregma (véase Figura 20). El conteo se realizó tomando imágenes a 20 aumentos (20X; Leica, Hamburgo, Alemania) en el microscopio y contabilizando manualmente el marcaje celular observado en dicha imagen. Posteriormente el número de células positivas se corrigió por el área de marcaje tisular utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, MD, EE.UU.).

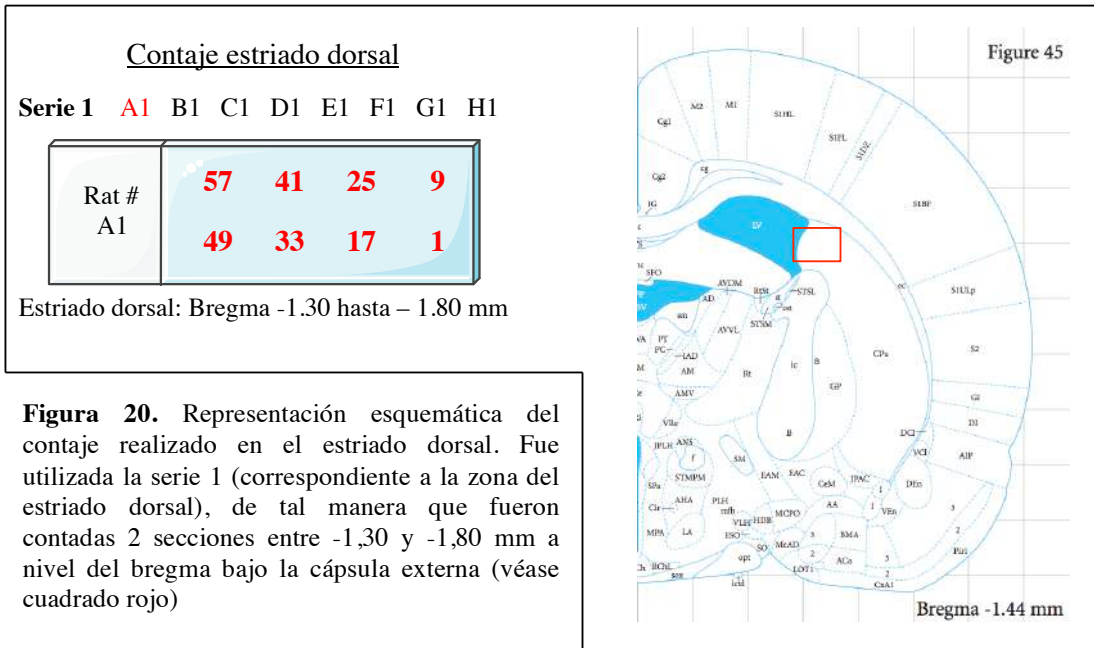


Figura 20. Representación esquemática del contaje realizado en el estriado dorsal. Fue utilizada la serie 1 (correspondiente a la zona del estriado dorsal), de tal manera que fueron contadas 2 secciones entre -1,30 y -1,80 mm a nivel del bregma bajo la cápsula externa (véase cuadrado rojo)

PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

En la presente Tesis Doctoral se puso a punto la técnica de detección de antígenos mediante la IF. Al igual que la IHC, utiliza anticuerpos para el reconocimiento de antígenos, pero en este caso el anticuerpo primario o el secundario se encuentra unido químicamente a un fluorocromo.

Para llevar a cabo el correcto marcaje, las secciones se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 1 hora, lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min e incubadas con peróxido de hidrógeno al 0,3 % durante 30 min (véase Figura 22). La exposición antigénica fue inducida por calor (HIER) en una dilución compuesta por un 50 % de formamida y un 50 % de 2X SSC a una temperatura de 65 °C durante 2 horas seguido por 2 lavados en 2X SSC de 5 min. La desnaturalización de las hebras se llevó a cabo incubando las secciones con HCl 2 N a una temperatura de 37 °C durante 30 min e inmediatamente después de la incubación se bañaron con H₃BO₃ 0,1 M a pH 8,5 durante 10 min. Las secciones fueron lavadas con PBS-IHC por triplicado 5 min y se sellaron con un bolígrafo hidrofóbico (Pap Pen) para bloquearlas con solución bloqueadora (BSA suero de cabra) durante 1 h a temperatura ambiente en cámaras de hibridación. Las secciones se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios FADD, p-FADD, NF-L, Iba-1, Ki-67, BrdU y GFAP diluidos en solución bloqueadora a diferentes concentraciones a temperatura ambiente (véase Tabla 2 de

anticuerpos primarios para inmunohistoquímica en materiales). Una vez finalizado el período de incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS-IHC e incubaron con el anticuerpo secundario a una concentración (1:100) marcado con un fluoróforo (anti-conejo producido en burro Alexa 594 o anti-ratón producido en burro Alexa 647; Thermo Fisher, CA, EE.UU.) y DAPI (Invitrogen, CA, EE.UU.) a una concentración (1:500) ambos diluidos en solución bloqueadora durante 1 hora a temperatura ambiente. A partir de este punto, la incubación con el anticuerpo secundario y los lavados se realizó en completa oscuridad para que el fluoróforo unido al anticuerpo secundario no perdiera la señal lumínica. Las secciones fueron lavadas de nuevo con PBS-IHC y agua miliQ cada una por triplicado 5 min. Finalmente, los portaobjetos se montaron cubriendo las secciones con aquamount (Dako Fluorescent Mounting Medium, CA, EE.UU.) y un cubreobjetos. El montaje de las secciones se dejó secar un mínimo de 24 horas en oscuridad y a 4 °C hasta que el medio de montaje quedó totalmente seco y listo para el montaje al microscopio confocal (Leica DMI 4000B; Leica, Hamburgo, Alemania). En la Figura 21 se muestra un ejemplo representativo de IF.

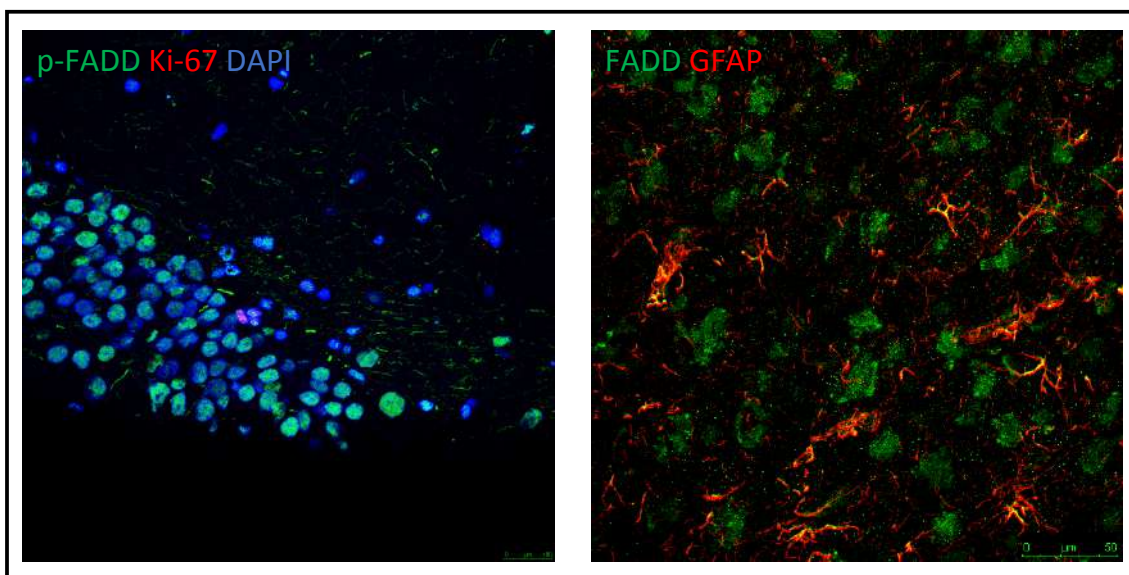


Figura 21. Imágenes representativas de dos marcajes para IF. A la izquierda se muestra una imagen del giro dentado del hipocampo de rata para el marcaje p-FADD (verde), Ki-67 (rojo) y DAPI (azul). Escala de 100 μm. A la derecha se muestra una imagen de la corteza prefrontal de rata para el marcaje FADD (verde) y el GFAP (rojo). Guía de 50 μm.

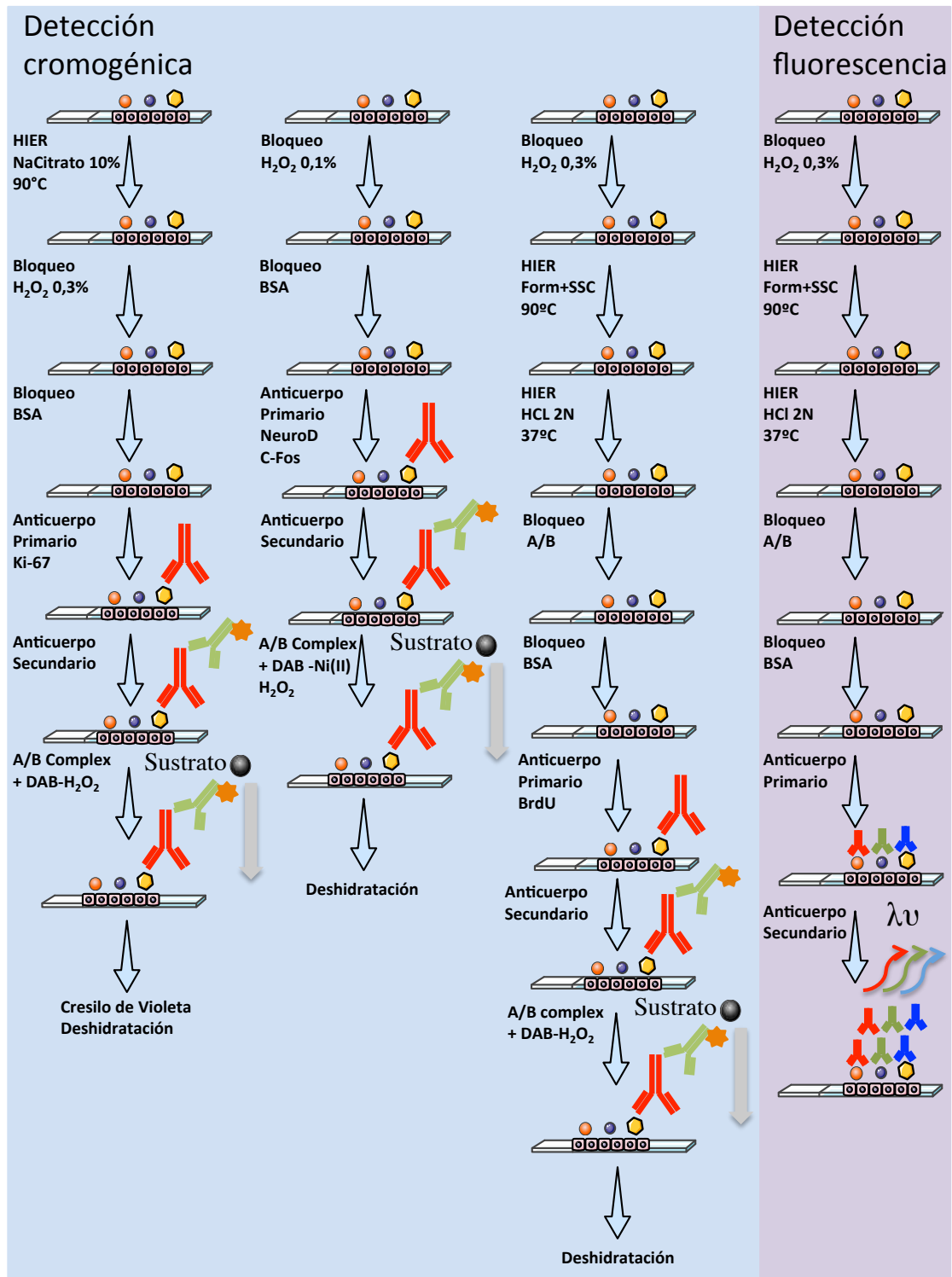


Figura 22. Representación esquemática de los diferentes protocolos utilizados para la realización de la IHC. En el fondo azul, se muestran los diferentes pasos llevados a cabo para la inmunodetección de los diferentes marcadores (Ki-67, NeuroD, c-Fos y BrdU) mediante la detección cromogénica con DAB y NiCl₂. En el fondo lila, se muestran los pasos realizados para poner a punto el método de la detección por IF.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE MONOAMINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A UN DETECTOR ELECTROQUÍMICO (HPLC-ED)

Preparación de muestras para HPLC-ED

Muestras procedentes del hipocampo y estriado de rata fueron pesadas e introducidas en tubos de cristal donde se homogenizaron (Ultra-turrax, TP 18/10) durante 30 segundos en 1 ml de tampón de homogenización enfriado a 4 °C, que contenía 0,4 M de HClO₄, K₂EDTA 0,01 % y 0,1 % Na₂S₂O₂. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 40000x g durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Biocen 22R, rotor 222; Madrid, España), y el sobrenadante se filtró en jeringuillas con un filtro de 0,45 µm de poro (Spartan-3; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.). De los sobrenadantes filtrados, se recogió una alícuota de 30 µl de cada muestra para determinar la cantidad de proteína mediante el método de la BCA como se ha descrito anteriormente. La concentración de proteína para el HPLC-ED se midió para corregir los niveles de monoaminas obtenidos por la cantidad total de proteína cargada para cada muestra. Finalmente, la muestra se congeló a -80 °C hasta su posterior análisis.

Condiciones experimentales del HPLC-ED

La cuantificación de los niveles de neurotransmisores monoamina (dopamina; DA, norepinefrina; NE y serotonina; 5-HT) y los principales metabolitos (ácido homovanílico; HVA, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; DOPAC y ácido 5-hidroxitriptolacético; 5-HIAA) de muestras estriatales e hipocampales de cerebro de rata se determinaron mediante la técnica de HPLC-ED. Los sobrenadantes filtrados obtenidos en el proceso de preparación de muestras para HPLC-ED (10 µl de muestras estriatales y 30 µl de muestras hipocampales) se inyectaron al HPLC-ED en una columna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS1 C18; 3 µm de tamaño de partícula, 4,6 mm x 10 cm; Waters, Barcelona, España) acoplada a una precolumna (Tracer ODS2 C18; 2 a 5 µm de tamaño de partícula; Teknokroma, Barcelona, España). La fase móvil compuesta por 0,1 M KH₂PO₄, 2,1 mM ácido octano-1-sulfónico, 0,1 mM K₂EDTA, 2 mM NaCl y 12 % (v/v) metanol (pH 2,7-2,8 ajustado con 85 % de H₃PO₄) se impulsó a través de la columna con una bomba de doble pistón a un flujo de 0,8 ml/min con un sistema de liberación del solvente (M-510; Waters, Barcelona, España).

Detección y cuantificación de monoaminas y metabolitos

Los compuestos se detectaron electroquímicamente con un electrodo de carbono cristalino, aplicando un potencial oxidativo de +0,75 V frente al electrodo de referencia *in situ* de (Ag/AgCl) (ISAAC; Waters Concorde Electrochemical Detector, CA, EE.UU.). La corriente producida se monitorizó utilizando una interfase (Waters busSAT/IN Module; Waters, IL, EE.UU.) conectada a un ordenador (véase Figura 23).

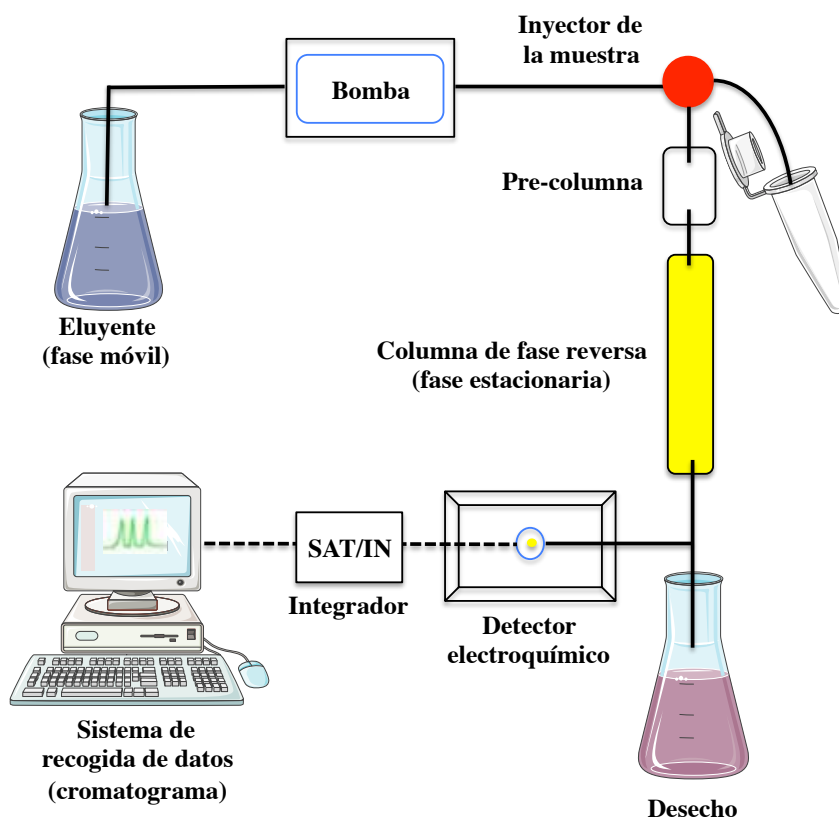


Figura 23. Esquema de los diferentes componentes del equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector electroquímico (HPLC-ED) utilizado en la presente Tesis Doctoral. La muestra es inyectada al paso del eluyente (fase móvil), donde es soluble, y es transportada a través de la columna de fase reversa (fase estacionaria) por el flujo continuo del eluyente impulsado continuamente por la bomba. Los compuestos de la muestra irán separándose según su polaridad al entrar en contacto con la columna variando los tiempos de retención. Los diferentes componentes de la muestra serán oxidados por un detector electroquímico e identificados mediante un procesador de datos que representa la señal en un cromatograma.

La concentración de los compuestos detectados para cada muestra se calculó interpolando la altura de cada uno de los picos correspondientes a una curva estándar mediante la utilización del programa informático Empower Pro (Waters, Barcelona, España) (véase Figura 24 para un ejemplo de visualización de picos). El estándar fue inyectado al HPLC-ED justo antes e inmediatamente después de pasar las muestras y estaba compuesto de patrones externos de las diferentes sustancias que se deseaban

cuantificar. Además, las concentraciones de los compuestos analizados se corrigieron en función del volumen inyectado en el HPLC-ED para las diferentes regiones, la dilución de la muestra y la concentración de proteína presente en la muestra inyectada (cuantificada mediante el método de la BCA). Finalmente, los valores se expresaron en (ng/ μ g de proteína) (véase Artículo VI).

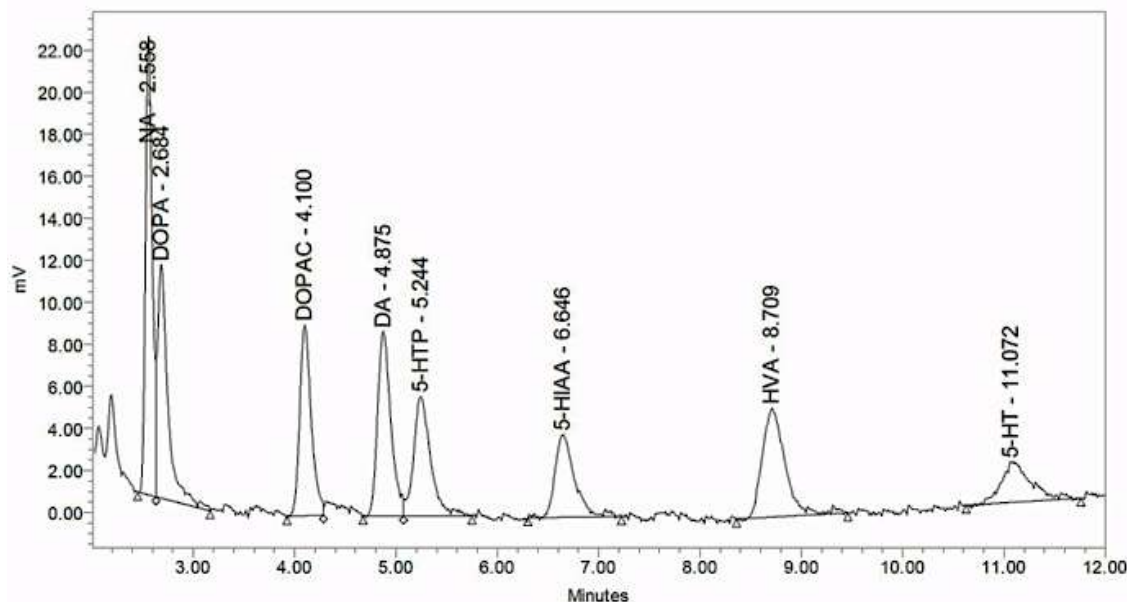


Figura 24. Análisis cromatográfico de un estándar utilizado para cuantificar los diferentes compuestos obtenidos de las muestras de estudio. Se observan los siguientes compuestos según el orden de aparición (dependiente del tiempo de retención en la columna): NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA y 5-HT.

DETECCIÓN DE ARNm MEDIANTE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* (ISH)

La ISH es una técnica utilizada para detectar y localizar secuencias de ADN o ARN específicas a nivel celular o tisular. La detección de dichas secuencias se realiza mediante una reacción de hibridación entre el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN) endógeno con secuencias híbridas complementarias de ARN o ADN monocatenario. Dicha hibridación tiene lugar gracias a la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para aparearse entre si dando lugar a una complementariedad entre las secuencias. La complementariedad otorga la capacidad de detectar la presencia de ADN o expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en células y tejidos. La presencia de dichas secuencias que se desean detectar es reconocida por sondas marcadas con radioisótopos formando híbridos que pueden ser detectados. La detección de las sondas proporciona información sobre la ubicación de dicha secuencia y el nivel

de expresión. A continuación, se detallan los pasos y condiciones utilizados para la detección y cuantificación de diferentes secuencias de esta Tesis Doctoral.

Preparación y marcaje radioactivo de la sonda

Una vez purificado el plásmido, se linearizó la secuencia antisentido para la utilización de los diferentes insertos (5HT1A, 5HT1B, 5HT2A, 5HT2C, SERT, FADD, PEA-15, CKI α 1, β -actina) en la ISH. La secuencia antisentido se lineariza desde la región 5' del inserto y para llevarlo a cabo fue necesario preparar una reacción de linearización (65 % de agua miliQ filtrada, 20 % de ADN purificado proveniente del plásmido, 10 % de buffer de reacción y un 5 % de las enzimas de restricción pertinentes). La reacción de linearización se centrifugaron unos segundos con un rotor de sobremesa (Labnet, Barcelona, España) y se incubó a 37 °C durante 2 horas.

Al finalizar la reacción de linearización, se procedió a la extracción del inserto presente en el vector para poder confirmar el tamaño de las sondas. Para ello es necesario cortar el ADN con las enzimas pertinentes (dependiendo de la secuencia que se desea extraer) a ambos lados del inserto mediante una reacción de digestión denominada *Pop Out*. La mezcla de los diferentes reactivos para la digestión (70 % agua miliQ filtrada, 10 % de ADN linearizado, 10 % de buffer de reacción, 5 % de la enzima de restricción para la región 5' y un 5 % de la enzima de restricción para la región 3') junto con el ADN linearizado se centrifugó con un rotor de sobremesa unos segundos y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Una vez finalizada la reacción de digestión, se procedió a comprobar el tamaño de los insertos extraídos de los vectores o plásmidos realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El gel de agarosa contenía buffer TBE 1X (0,09 M Tris-HCl, 0,6 % de H₃BO₃ y 0,08 % EDTA) y un 1 % agarosa. Inmediatamente fue removido con una varilla y se llevó hasta la ebullición. Se dejó enfriar la solución del gel de agarosa durante unos minutos y el contenido fue vaciado sobre el casete de electroforesis y se colocaron los peines para cargar las muestras con los insertos. Una vez el gel quedó solidificado, fue colocado en el tanque de electroforesis bañado con buffer de electroforesis TBE 1X y bromuro de etidio (Bioron, Mannheim, Alemania). Los peines se retiraron cuidadosamente y se cargaron las muestras con buffer de carga (Blue Loading Dye, Promega, WI, EE.UU.) junto a un marcador (Bioron, Mannheim, Alemania) con bandas que comprendían de los 10000 pb hasta 300 pb. Una vez

cargadas las muestras, se les aplicó una corriente de 60 V durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se extrajo el gel de agarosa del tanque electroforético, fue escaneado (Bio Rad Gel Doc™ XR system, CA, EE.UU.) y se obtuvieron imágenes digitalizadas que posteriormente fueron procesadas con el software Quantity One (véase Figura 25).

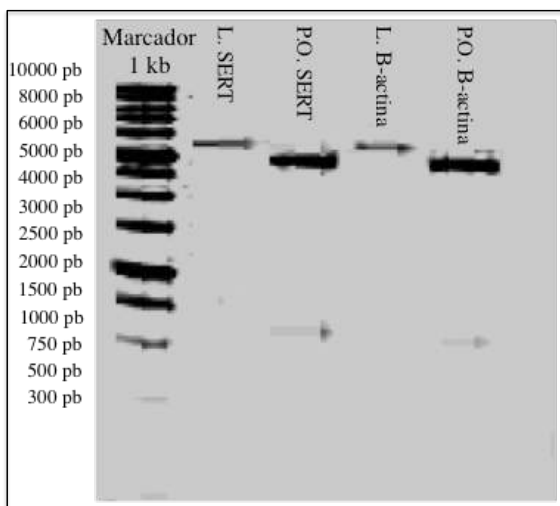


Figura 25. Imagen de un gel de agarosa al 1 % utilizado para comprobar la digestión de los vectores para extraer las sondas utilizadas en la hibridación *in situ*. Para cada sonda fueron cargadas dos muestras, la linearizada constituida por el vector junto a la sonda formando una única banda a una altura de 3800-4000 pb y la digerida o “Pop Out” constituida por el vector y la sonda por separado dando lugar a dos bandas, una a la altura de 3000 pb (vector) y otra a la altura de 1000 pb (sonda).

Al verificar el tamaño de los insertos en el gel, se utilizó el Qiagen Clean Up Kit para purificar las sondas. Para dicha purificación, se añadió a la muestra ya linearizada buffer PB o buffer de unión (contiene guanidina hidroclicorada e isopropanol) en una proporción 5:1. La muestra se filtró en una columna (Qiaquick® Spin Columns; Hilden, Alemania) y se centrifugó a 13000 rpm (Microcentrifuga 5415 R; Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 1 min. El líquido resultante de la filtración fue desechado y cada columna se lavó con 750 µl de buffer PE o buffer de lavado a 13000 rpm durante 1 min. El líquido resultante de la filtración fue desechado de nuevo y la columna volvió a centrifugarse a 13000 rpm durante 1 min para eliminar el etanol residual proveniente del buffer PE. Para la elución de la sonda, se añadieron 30 µl de buffer EB o buffer de elución y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min.

Después de purificar las distintas sondas, se produjo el radiomarcaje del ARN complementario (ARNc) que se unirá al ARNm presente en el tejido. Para realizar este proceso, el ARNc se marcó con nucleótidos marcados radioactivamente utilizando la enzima polimerasa desde extremo 3'. Para incrementar la especificidad, se utilizaron dos nucleótidos marcados radioactivamente (Perkin Elmer, MA, EE.UU.) S³⁵ uridina trifosfato (S³⁵ UTP) y S³⁵ citosina trifosfato (S³⁵ CTP). El marcaje se llevó a cabo realizando una reacción que contenía 1 µl GTP 10 mM, 1 µl ATP 10 mM, 2,5 µl de

trans buffer, 2 μ l de DTT 0,1 M, 4 μ l de S³⁵UTP, 3 μ l de S³⁵CTP, 7,5 μ l de agua miliQ filtrada, 1 μ l de inhibidor ARNasa, 1 μ l de polimerasa y 2 μ l de ADN linearizado. La reacción para el marcaje de la sonda fue incubada a 37 °C durante 1 hora y 30 min. Al finalizar la incubación, se añadieron enzimas ADNasas y ARNasas para detener la reacción de marcaje. Para separar la sonda marcada radioactivamente con S³⁵, fue utilizada una columna de cromatografía (Micro Bio-Spin 6 Chromatography Column, Bio-Rad, CA, EE.UU.) y se centrifugó a 1020x g durante 4 min. Al eluyente filtrado, se le añadió 1 μ l de DTT y posteriormente se determinó la cantidad de radiación emitida por la sonda marcada radioactivamente en un contador de centelleo (LS 1801; Beckman Coulter; CA, EE.UU.). Para conocer la cantidad de sonda marcada, se disolvió 1 μ l de la muestra marcada en 8 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold™; Perkin Elmer, MA, EE.UU.). Para cada marcaje, se obtuvieron sus desintegraciones por minuto (DPM) que son directamente proporcionales a la cantidad de sonda marcada y así se pudo ajustar la cantidad de sonda necesaria para realizar el marcaje.

Condiciones experimentales para la ISH

Las secciones se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 1 hora para inmovilizar el ARNm y fijar las proteínas. Una vez finalizado el proceso de fijación, el tejido se lavó 3 veces durante 5 min con 2X SSC y se incubó en 1 M trietanolamina (TEA: 7,53 M a pH 8,0; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.) con 0,25 % vol/vol anhídrido acético (Panreac, Barcelona, España) durante 10 min. La acetilación producida por el anhídrido acético reduce la tendencia de la sonda a unirse a lugares inespecíficos del tejido. Las secciones fueron lavadas en agua miliQ, deshidratadas en un gradiente de alcoholes (50, 70, 80, 95, 100 %) y secadas al aire libre.

Para llevar a cabo la hibridación, la sonda radioactiva fue disuelta en un 50% de buffer de hibridación (50% formamida, 20% agua miliQ, 15% SSC 20X, 2% Denhardtts 50X, 2% ARNr, 10% 0,5 M Na₂PO₄ y dextran sulfato) para obtener entre 1-2 millones de DPM y finalmente se añadió ditiotretol (DTT; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.) a una concentración final de 10 mM. Una vez disuelta la sonda marcada con el buffer de hibridación se comprobó en el contador de centelleo las DPM, que deben rondar entre los 1 y 3 millones. Seguidamente, las secciones fueron bañadas con la sonda marcada radioactivamente y montadas con un cubreobjetos para incubarlas en una cámara de hibridación humedecida con una solución al 50 % de formamida y agua miliQ para

evitar la desecación de las secciones. Por último, las cámaras de hibridación con las secciones se incubaron en una estufa a 55 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, los cubreobjetos se retiraron cuidadosamente de los portaobjetos con las secciones y se lavaron por triplicado con SSC 2X durante 5 min. Para eliminar las cadenas monocatenarias de ARN y las sondas no hibridadas, las secciones se bañaron en una solución ARNasa (0,01 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl y ARNasa a una concentración de 200 µg/ml) a 37 °C durante 1 hora. Al finalizar la digestión del ARN no hibridado, las secciones fueron lavadas de nuevo con SSC 2X, 1X y 0,5X durante 5 min para finalmente incubarlas en una solución SSC 0,1X entre 60-70 °C durante 1 hora. Finalmente, las secciones se bañaron en agua miliQ, deshidratadas en un gradiente de alcoholes (50, 70, 80, 95, 100%) y se dejaron secar unos minutos al aire libre.

Detección de las sondas marcadas

Para detectar la señal emitida por la sonda marcada hibridada al ARNm que se desea detectar, los portaobjetos con las secciones fueron depositados en casetes de revelado (Hypercassette™; Amersham, BK, Reino Unido) en contacto con un film autorradiográfico (Kodak BioMax MR-1 X-ray film; Sigma-Aldrich, CA, EE.UU.). El tiempo de exposición del film radiográfico puede variar entre horas e inclusive semanas y dependerá de varios factores como la cantidad de sonda marcada y de la expresión del ARNm presente en el tejido. Una vez realizada la exposición, el film se sumergió en un líquido de revelado durante 1 min, lavado con agua, y sumergido en un líquido fijador durante 1 min. Finalmente, se obtuvo un autorradiograma con impresiones radiográficas del tejido presente en los portaobjetos (véase ejemplo en Figura 26). Las áreas de interés fueron analizadas utilizando un densitómetro (GS-800) para obtener imágenes digitalizadas que posteriormente fueron procesadas con el software Quantity One.

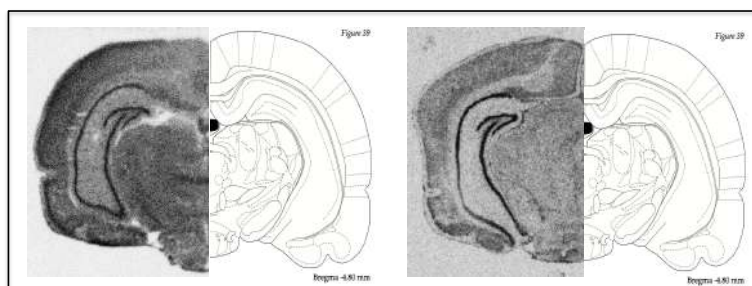


Figura 26. Imágenes representativas en rayos X de la parte posterior del bregma (giro dentado posterior: -4,80 mm) para el ARNm del transportador de serotonina SERT (imagen izquierda) y de la β -actina (imagen derecha).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los análisis estadísticos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 6 (CA, EE.UU.). Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Debido a que la mayoría de las siguientes pruebas estadísticas asumen una distribución normal de la población, los datos fueron sometidos previamente a los test de normalidad antes de realizar cualquier tipo de análisis estadístico.

Para los valores normalizados de los datos bioquímicos y comportamentales se utilizaron o bien el test *t* de Student para comparar dos grupos experimentales, el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o dos vías, dependiendo del número de variables analizadas o el ANOVA de medidas repetidas cuando la misma variable fue medida a distintos tiempos durante el experimento. La presencia de significancia estadística en el ANOVA fue acompañada de tests (*post hoc*) de Bonferroni, Sidak o Tukey (dependiendo del tipo de muestra) para determinar diferencias de forma concreta entre los diferentes grupos experimentales.

Para determinar posibles correlaciones entre dos variables paramétricas X e Y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Además, el análisis de la regresión lineal se utilizó para determinar la línea que predice Y desde X y calcular la pendiente que representa la dependencia entre estas variables.

RESULTADOS

ARTÍCULO I

Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood

García-Cabrerizo R, Keller B and García-Fuster MJ

Neuroscience, 2015; 304: 302-315

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si existía un período de mayor vulnerabilidad a inducir cambios neuroplásticos tras la administración de cocaína durante diferentes etapas de la adolescencia en ratas y si la administración de cocaína durante el período más vulnerable inducía efectos negativos a largo plazo. Los resultados más relevantes pusieron de manifiesto que la adolescencia temprana-media (PND 33-39) es el período más vulnerable para la administración de esta droga, vistos los efectos neurotóxicos inducidos en el hipocampo: incremento de la proteína multifuncional FADD, incremento de los fragmentos proapoptóticos de PARP-1 y una disminución de los niveles de células de nueva proliferación (marcador Ki-67). A pesar de esto, la administración de cocaína durante esta etapa de vulnerabilidad durante la adolescencia (PND 33-39) no indujo cambios negativos a largo plazo sobre los marcadores de neuroplasticidad evaluados (normalización de los efectos neurotóxicos previamente observados) o sobre la sintomatología prodepresiva (desespero conductual en el test de natación forzada) en rata adulta.

HIPPOCAMPAL CELL FATE REGULATION BY CHRONIC COCAINE DURING PERIODS OF ADOLESCENT VULNERABILITY: CONSEQUENCES OF COCAINE EXPOSURE DURING ADOLESCENCE ON BEHAVIORAL DESPAIR IN ADULTHOOD

R. GARCÍA-CABRERIZO, B. KELLER AND M. J. GARCÍA-FUSTER*

Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud–Red de Trastornos Adictivos (RETICS-RTA), ISCIII, Madrid, Spain

Abstract—Given that adolescence represents a critical moment for shaping adult behavior and may predispose to disease vulnerability later in life, the aim of this study was to find a vulnerable period during adolescence in which hippocampal cell fate regulation was altered by cocaine exposure, and to evaluate the long-term consequences of a cocaine experience during adolescence in affecting hippocampal plasticity and behavioral despair in adulthood. **Study I:** Male rats were treated with cocaine (15 mg/kg, i.p.) or saline for 7 consecutive days during adolescence (early post-natal day (PND) 33–39, mid PND 40–46, late PND 47–53). Hippocampal plasticity (i.e., cell fate regulation, cell genesis) was evaluated 24 h after the last treatment dose during the course of adolescence (PND 40, PND 47, PND 54). **Study II:** The consequences of cocaine exposure during adolescence (PND 33–39 or PND 33–46; 7 or 14 days) were measured in adulthood at the behavioral (i.e., forced swim test, PND 62–63) and molecular (hippocampal cell markers, PND 64) levels. Chronic cocaine during early adolescence dysregulated FADD forms only in the hippocampus (HC), as compared to other brain regions, and during mid adolescence, impaired cell proliferation (Ki-67) and increased PARP-1 cleavage (a cell death maker) in the HC. Interestingly, chronic cocaine exposure during adolescence did not alter the time adult rats spent immobile in the forced swim test. These results suggest that this paradigm of chronic cocaine administration during adolescence did not contribute to the later manifestation of behavioral despair

(i.e., one pro-depressive symptom) as measured by the forced swim test in adulthood. © 2015 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: adolescence, cocaine, FADD, hippocampus.

INTRODUCTION

Adolescence is a critical developmental period during the progression from youth to adulthood that is highly conserved across species (Spear, 2000). In rats it is divided into the following stages: early adolescence (post-natal day, PND 21–34), mid-adolescence (PND 34–46) and late adolescence (PND 46–59) (see Burke and Miczek, 2014). The adolescent brain undergoes extensive shaping and remodeling in the central nervous system, particularly in brain regions that control cognition, emotion and executive functions (see Spear, 2000). At the cellular level, these changes correspond to the marked generation of axon and synapses in early adolescence and rapid synaptic pruning in late adolescence (Andersen, 2003), as well as changes in myelination, and neurotransmitter system modification (reviewed in Schepis et al., 2008).

Epidemiological data from human studies (Dawes et al., 2000) and data from animal models (Barr et al., 2004) suggest that the earlier the initiation of drug use, the more likely it is to progress to addiction (Spear, 2000). The adolescent brain seems to be more sensitive to the plastic changes caused by drugs of abuse (Stanis and Andersen, 2014). For example, adolescent rats were more vulnerable to cocaine experience when compared to adult rats (Wong et al., 2013). They were shown to be more sensitive to the rewarding consequences of cocaine (reviewed in Spear, 2011) by exhibiting a delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference (Brenhouse and Andersen, 2008) and by displaying an enhanced motivational salience to cocaine cues (Brenhouse et al., 2008). Moreover, cocaine administration in adolescent rats increased responsiveness to the stimulant effects of cocaine (Black et al., 2006) and decreased negative affect in adulthood (Sullivan et al., 2011). Therefore, adolescence is a vulnerable period of development with a great deal of

*Correspondence to: M. J. García-Fuster, Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain. Tel: +34-971-259992; fax: +34-971-259501.

E-mail address: j.garcia@uib.es (M. J. García-Fuster).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; BSA, bovine serum albumin; Cdk-5, cyclin-dependent kinase-5; DAB, diaminobenzidine; DG, dentate gyrus; DMI, desipramine; FADD, Fas-associated protein with death domain; FST, forced swim test; HC, hippocampus; IHC, immunohistochemistry; i.p., intraperitoneal; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PARP-1, poly (ADP-ribose) polymerase 1; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; p-FADD, phosphorylated Ser191 FADD; PFC, prefrontal cortex; PND, post-natal day; PSD-95, post-synaptic density-95; SEM, standard error of the mean; WB, Western blot.

neuro-remodeling characterized by a unique sensitivity to drug abuse (Kelley et al., 2004).

A disruption in normal brain development during adolescence, such as drug abuse, has also been hypothesized as a risk factor for emerging major psychiatric disorders (Marco et al., 2011). Several models have been proposed to explain the comorbidity relation between substance use and psychiatric disorders (reviewed in Mueser et al., 1998), with one such model postulating that primary substance use may increase vulnerability to depression through behavioral and neurophysiological alterations (Chinet et al., 2006). In this respect, early drug abuse during adolescence has been associated with psychiatric comorbidity (reviewed in Schepis et al., 2008). The literature also suggests that pre-depressive symptoms are known to occur during the initial phase of cocaine withdrawal in humans and adult animal models (Perrine et al., 2008). However, the consequences of cocaine exposure during adolescence on inducing behavioral despair (i.e., a symptom characteristic of depression-like behavior) in adulthood are not clear yet.

Prior studies evaluating the effects of drugs of abuse on the adolescent brain have mainly focused on the prefrontal cortex (PFC) and limbic regions, on dopaminergic systems (e.g., reward system dysregulation) and on other neuronal circuits such as the serotonergic and cannabinoid systems (Spear, 2011). Besides the neural adaptations occurring in the reward pathway (ventral tegmental area/nucleus accumbens/PFC) that likely underlie the long-lasting effects of drugs (e.g., Robinson and Kolb, 2004), the hippocampus (HC) is also highly interconnected with the reward system (Dietz et al., 2009) and can influence the learning component of addiction. In fact, drugs of abuse in general and cocaine in particular, are known to play a role in the remodeling of the HC, such as modulating hippocampal cell plasticity or cell fate regulation (i.e., molecules that balance between cell death and cell proliferation and/or survival). One such molecule, the cell regulator Fas-associated protein with death domain (FADD) is an adaptor protein initially described to mediate cell death (pro-apoptotic FADD form) that has also been well recognized as a mediator of non-apoptotic events, specifically when it is phosphorylated (non-apoptotic phosphorylated Ser191 FADD (p-FADD) form) and translocates to the nucleus (Chen et al., 2005). In fact, the ratio p-FADD/FADD has been considered as an index of neuroplasticity (see review in Ramos-Miguel et al., 2012). The role of FADD adaptor on drug addiction (i.e., opiates, cocaine, cannabinoids) has been well characterized in the adult rodent (i.e., rat and mouse) brain and in postmortem human brain (Ramos-Miguel et al., 2012). In particular, during cocaine withdrawal FADD was increased in the HC in parallel with a decrease in cell proliferation (García-Fuster et al., 2011), suggesting a possible neurotoxic effect of the psychostimulant in this brain region. In this regard, drugs of abuse in general and cocaine in particular, are known to damage the HC by impairing cell genesis during different stages of the addictive cycle in adult rats (García-Fuster et al., 2010, 2011; reviewed at Mandyam and Koob, 2012).

Consequently, given that adolescence represents a critical moment for shaping adult behavior and may set the stage to disease vulnerability later in life, the aim of this study was to find a vulnerable period during adolescence at which hippocampal cell fate regulation (e.g., FADD forms and cell genesis) was altered by cocaine exposure, and to evaluate the long-term consequences of a cocaine experience during adolescence in affecting hippocampal plasticity and behavioral despair in adulthood. A preliminary report of a portion of this work was presented at the 27th European College of Neuropsychopharmacology Congress (García-Fuster and Keller, 2014).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

For this study 86 adolescent male Sprague–Dawley rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France) at weaning (PND 21). Rats were housed in controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle, lights on at 8:00 AM) with *ad libitum* access to a standard diet and tap water throughout the whole experimental design. All animal care and experimental procedures were conducted during the light cycle and according to standard ethical guidelines (U.K. Animals, Scientific Procedures, Act, 1986, and European Communities Council Directive 86/609/EEC), and approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

Study I: Hippocampal cell fate regulation during periods of adolescent vulnerability

For the first study (Fig. 1a) 36 rats were utilized to ascertain the regulation of hippocampal cell fate markers during periods of adolescence vulnerability. Rats were distributed in three age-windows of adolescent vulnerability (see Burke and Miczek, 2014): early- (PND 26), mid- (PND 33) and late-adolescence (PND 40). All rats ($n = 10$ per age) were housed in standard cages (two or three rats per cage) until they reached the developmental age-window of study at which they were pretreated for 3 consecutive days (early: PND 26–28, mid: PND 33–35, late: PND 40–42; see Fig. 1a) with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg, i.p., Calbiochem) twice a day (García-Fuster et al., 2010). Then, rats were either treated with a chronic regimen of cocaine (15 mg/kg, i.p., $n = 5$ per age group) or saline (0.9% NaCl, i.p., $n = 5$ per age group) for 7 consecutive days (early: PND 33–39, mid: PND 40–46, late: PND 47–53). As this paradigm of experimenter-administered cocaine is known to induce environment-paired behavioral sensitization, all rats were transferred to an adjacent room to receive their daily injections (about 10:00 AM) (see García-Fuster et al., 2010). Cocaine treatment did not alter rats' weight gain at any age during adolescence as compared to control-treated rats (data not shown). Rats were killed 24 h after the last injection (early: PND 40, mid: PND 47, late: PND 54, see Fig. 1a). To note that treatment groups (control vs. cocaine) from each window

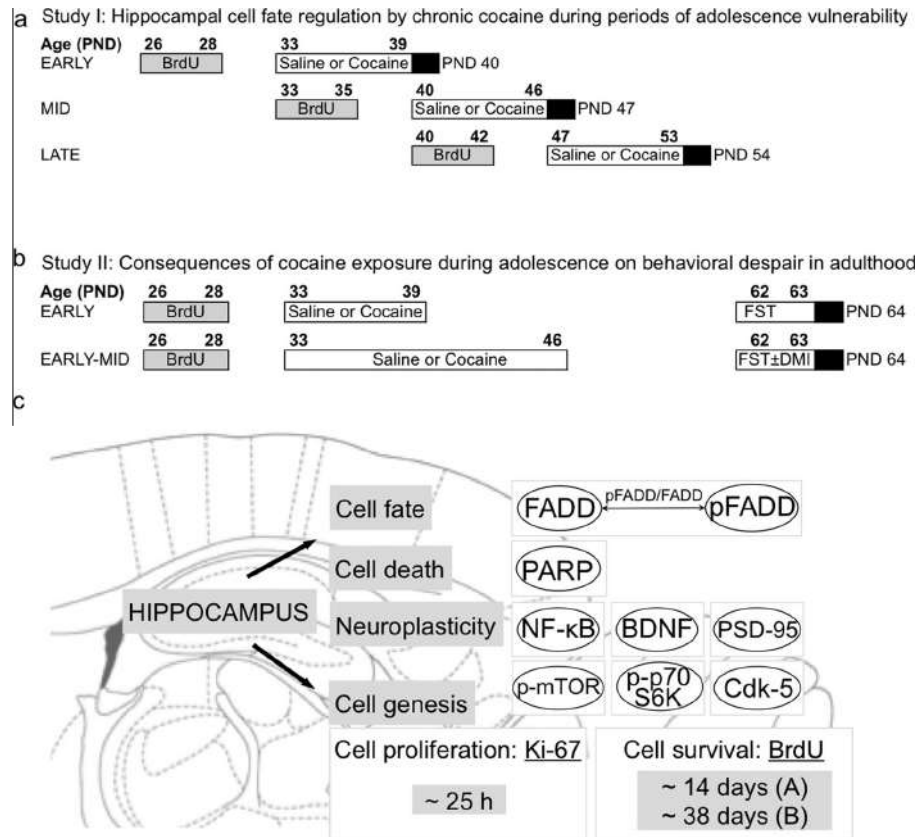


Fig. 1. Experimental design. (a) Study I: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability in rat brain. PND: post-natal day. (b) Study II: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. DMI: desipramine; FST: forced-swim test; PND: post-natal day. (c) Schematic representation of the cell fate markers evaluated in the hippocampus. Figure modified and adapted from [García-Cabrero and García-Fuster \(2015\)](#).

of adolescent vulnerability (PND 40, 47, 54) were killed at different days (i.e., consecutive weeks) as they reached the selected age-window of study.

Study II: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood

For the second study (Fig. 1b) a total of 50 rats were utilized in two separate experiments to evaluate the consequences of a cocaine experience during adolescence on behavioral despair (i.e., symptomatic of depression-like behavior) in adulthood. For both experiments, all rats were pretreated for 3 consecutive days with BrdU (PND 26–28) followed by 7 (PND 33–39, $n = 9$ per group) (based on the changes observed in FADD and p-FADD/FADD protein ratio) or 14 consecutive days (PND 33–46, $n = 8$ per group) (based on the changes observed in FADD, p-FADD/FADD protein ratio, Ki-67 and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) cleavage: combined vulnerability) of cocaine (15 mg/kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl, i.p.) treatment (Fig. 1b). Cocaine treatment did not alter rats' weight gain throughout the experiment as compared to control-treated rats (data not shown). Behavioral despair was

measured in adulthood by the forced swim test (FST) for both experiments as described previously ([García-Fuster et al., 2012](#)). To note that rats were not given cocaine in adulthood in an attempt to avoid the acute effects of the drug on the FST and to evaluate the unchallenged long-term effects of the adolescent cocaine exposure. On the first day of the behavioral experiment (PND 62), rats were forced to swim for 15 min by placing them individually in a tank (41 cm high \times 32 cm diameter) filled with water to a depth of 25 cm, at 25 ± 1 °C. Water was replaced between each test and temperature was monitored constantly. Following the pre-test phase of the FST rats from the first experiment were left undisturbed whereas rats from the second experiment were either treated with vehicle (0.9% NaCl, i.p.) or desipramine (DMI, 20 mg/kg, i.p.) administered 5 min, 18 h, and 23 h after the end of the pre-test phase (see [Kitada et al., 1983](#)). On PND 63, rats were forced to swim for a period of 5 min in which behaviors were videotaped. All rats were killed 24 h later (PND 64). Videos were scored and percent time spent immobile vs. active (climbing, swimming) behaviors were measured with Behavior Tracker software (CA, USA) by an investigator who was blinded to the experimental design.

Tissue collection

Rats were killed by rapid decapitation and their brains removed at the indicated times (Study I: PND 40, 47, and 54, Fig. 1a; Study II: PND 64, Fig. 1b). Brains were processed to allow the investigation of markers in the HC using different approaches (see Fig. 1c). The right half of the brain was used to dissect the HC which was rapidly frozen on liquid nitrogen, and kept at -80°C until use for Western blot (WB) experiments (i.e., protein content of neurotoxicity/neuroplasticity markers, see Fig. 1c). Other brain regions such as the PFC and striatum were also freshly dissected for WB experiments. The left half-brain was quickly frozen in a -30°C isopentane solution and stored at -80°C until further processing. For each animal, $30\ \mu\text{m}$ sections were cryostat cut and slide-mounted throughout the whole septo-temporal extent of the HC (-1.72 to -6.80 mm from Bregma) and kept at -80°C until further analysis. Cell genesis markers (i.e., Ki-67 for cell proliferation and BrdU for cell survival) were analyzed on this tissue by immunohistochemistry (IHC).

Immunoblot assays and quantification of target proteins

Several hippocampal markers involved in the regulation of cell fate were ascertained by WB analysis (see Fig. 1c). The balance between pro-apoptotic FADD and anti-apoptotic p-FADD as measured by the p-FADD/FADD ratio was used as an index of neuroplasticity (i.e., cell fate regulator, see Galluzzi et al., 2012; Ramos-Miguel et al., 2012). The ratio between the fragmented (85 kDa) to native (116 kDa) PARP-1 forms was used as a marker of cell death/plasticity. Interestingly, PARP-1 has been recently shown to not only lead cells to death (DNA damage; Cagnol et al., 2006) but to also enhance behavioral responses to cocaine (Scobie et al., 2014). Moreover, six other proteins involved in regulating hippocampal plasticity and related to cell fate were also evaluated (Fig. 1c): (1) nuclear factor- κB (NF- κB) regulates transcription factors, and was shown to be modulated by p-FADD (see Chen et al., 2005), (2) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is highly expressed in the HC and has a role in cell survival (Murray and Holmes, 2011), (3) post-synaptic density-95 (PSD-95) is a neuronal activation marker essential for synaptic plasticity (El-Husseini et al., 2000), (4) mammalian target of rapamycin (mTOR) is phosphorylated at Ser2448 by (5) p70S6 kinase (p70S6K) to regulate cell growth and survival (Chiang and Abraham, 2005), and (6) cyclin-dependent kinase-5 (Cdk-5) has a role in neurogenesis regulation (Lagace et al., 2008).

Total homogenate of HC and other brain regions (PFC, striatum) was prepared as previously described (García-Fuster et al., 2009). In routine experiments, brain proteins ($40\ \mu\text{g}$ protein) were resolved by electrophoresis on 10–15% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), followed by immunoblotting standard procedures (García-Fuster et al., 2009). Membranes were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the appropriate primary antibody previously validated in

the laboratory with blocking peptides or positive controls (data not shown; see for example García-Fuster et al., 2007, 2008 for FADD and p-FADD characterization). The vendors and conditions of the primary antibodies were the following: (1) Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anti-FADD (H-181) (affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against human FADD C-terminal 28–208 residues; dilution 1:5000; sc-5559), anti-BDNF (N-20) (affinity purified rabbit polyclonal raised against human BDNF; dilution 1:2500; sc-546); (2) Cell Signaling (MA, USA): anti-phospho-Ser191-FADD (affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against residues surrounding p-Ser191 of mouse FADD; dilution 1:750), anti-NF- κB (affinity-purified monoclonal antibody raised against residues surrounding Glu498 of human NF- κB ; dilution 1:1000), anti-phospho-Ser2448-mTOR (affinity purified rabbit polyclonal raised against residues surrounding Ser2448 of human mTOR; dilution 1:1000) and anti-phospho-Thr389-p70 S6 kinase (affinity purified rabbit polyclonal raised against residues around Thr389 of human p70 S6 Kinase; dilution 1:1000); (3) Millipore (CA, USA): anti-PARP-1 (affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against caspase cleavage site in PARP; dilution 1:1000), anti-PSD-95 (affinity purified mouse monoclonal raised against a recombinant rat PSD-95; dilution 1:1000); (4) Lab Vision Corporation (CA, USA): anti-Cdk5 (DC17) (affinity purified mouse monoclonal raised against ascites fluid of mouse Cdk5; dilution 1:1000); and (5) Sigma-Aldrich (MO, USA): anti- β -actin (mouse monoclonal antibody; clone AC-15; dilution 1:10,000).

The secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse IgG, was incubated for 1 h at room temperature (1:5000 dilution; Cell Signaling). Immunoreactivity of target proteins was detected with ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK) and the signal of bound antibody was visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–60 min. Autoradiograms were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad). For the first study (Fig. 1a), the amount of target proteins in brain samples of control rats at different age-windows during adolescence (PND 40, 47 and 54) was calculated in the same gel in comparison to a pool of standard controls (i.e., basal adult control rats, PND 61, $n = 6$). Given that rats were killed at different times, when evaluating cocaine effects at each time-window of adolescence (PND 40, 47 or 54) the amount of target proteins was compared in the same gel with that of its respective control group (Fig. 1a). For the second study (Fig. 1b), the amount of target proteins in hippocampal samples of adult rats with a previous history of cocaine in adolescence was compared in the same gel with that of control rats treated with saline (PND 64). The quantification procedure was assessed 3–6 times in different gels (each gel with different brain samples from control and drug-treated rats). Percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each treated rat in the various gels at every age, and the mean value was used as a final estimate. In all experiments, β -actin was quantitated as a loading control.

IHC analysis

The rate of recent cell proliferation in the HC was determined by performing IHC labeling of Ki-67, an intrinsic marker of ongoing cell proliferation (see Garcia-Fuster et al., 2010). Following a standardized protocol (Garcia-Fuster et al., 2010), hippocampal tissue sections (30 μm) were post-fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and incubated for epitope retrieval (10% sodium citrate pH 6.0 at 90 °C for 1 h). Sections were then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), washed in 0.3% peroxide, blocked with bovine serum albumin (BSA) containing 1% goat serum and 0.05% Triton X-100, and incubated overnight with polyclonal rabbit anti-Ki-67 (1:40,000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stan Watson, University of Michigan, USA). After PBS washes, sections were incubated in biotinylated anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories, CA, USA) followed by Avidin/Biotin complex (Vectastain Elite ABC kit; Vectors Laboratories) and diaminobenzidine (DAB) as chromogen.

The rate of cell survival was determined by labeling of BrdU, a synthetic thymidine analog that was injected prior to any drug treatment. BrdU is incorporated during the S-phase of the cell cycle into newly synthesized DNA strands of actively proliferating cells (Wojtowicz and Kee, 2006) and the number of these new cells that survive throughout the treatment can then be measured at the end of the study. To note that as indicated in Fig. 1c, cells labeled with BrdU in the first experimental design were 14 days old, while cells from the second experimental design were 38 days old at the time of analysis. Tissue was post-fixed in 4% PFA for 1 h, rinsed in PBS and washed in 0.3% peroxide. Sections were then incubated in 50% formamide-2 \times SSC at 65 °C for 2 h followed by rinses in 2 \times SSC. Slides were placed for 30 min in 2 N HCl at 37 °C for DNA denaturation and 10 min in 0.1 M boric acid at room temperature followed by rinsing in PBS and blocking with BSA. Sections were incubated overnight with polyclonal anti-BrdU (1:20,000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stan Watson, University of Michigan, USA) followed by anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories), Avidin/Biotin complex amplification and DAB reaction for visualization of signal.

All sections were counterstained with Cresyl Violet before dehydration through graded alcohols, xylene immersion and coverslipping (Permount[®] mounting medium). To ensure an unbiased count, all slides were randomly coded by a non-experimenter prior to quantification. Codes were broken after all slides were quantified and analyzed. The number of immunostained positive cells was counted in every 8th section throughout the whole septo-temporal extent of the HC (−1.72 to −6.80 mm from Bregma) with a Leica DMR light microscope using a 63 \times objective lens and focusing through the thickness of the section (30 μm). The number of proliferating (Ki-67+) or surviving (BrdU+) cells was expressed in relation to the resident granule cells, as measured by the area (mm²) of the granule cell layer quantified with a densitometer (GS-800 Imaging Calibrated densitometer, Bio-Rad) which represents a normalized cell count (Amrein et al., 2011), specially relevant when comparing rats at different ages.

Data and statistical analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism, Version 6. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). For the statistical evaluation of the basal differences during adolescence (PND 40, 47, 54) a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons was used. Given the effect of environmental conditions on cell fate markers (see Schmidt and Duman, 2007) and given that rats were killed at different time points during adolescence, a two-tailed *t*-test was used to evaluate the effects of cocaine on cell fate markers for each time point studied (PND 40, 47, 54). When evaluating the behavioral results (FST) a two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons was used with treatment (control vs. cocaine experience) and behavior (immobility vs. active) as the independent variables. For the second part of the study (molecular results: WB and IHC) a one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's two-tailed *t*-test were used when appropriate. The level of significance was $p \leq 0.05$.

Drugs and chemicals

Cocaine hydrochloride was obtained from 'Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios' (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Spain) and BrdU was purchased from Calbiochem. Other materials were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Sigma–Aldrich and Vector Laboratories.

RESULTS

Study I: Hippocampal cell fate regulation during periods of adolescent vulnerability

Basal hippocampal cell fate regulation during the course of adolescence. The temporal regulation of hippocampal cell fate/death markers (i.e., FADD forms, PARP-1) was studied during different periods of adolescence by WB analysis in the right HC (total homogenate) and was calculated in each gel in comparison to a pool of standard controls (Std: basal adult control rats, PND 61; Fig. 2). Total FADD was modulated during the course of adolescence ($F_{2,11} = 11.72$, $p < 0.05$) with the highest FADD content observed in early adolescence ($201 \pm 17\%$) followed by a temporal decrease (mid, $142 \pm 14\%$ and late adolescence, $111 \pm 9\%$; Fig. 2a, d). While p-FADD was not regulated during the course of adolescence ($F_{2,11} = 0.42$, n.s.; Fig. 2b, d), the ratio p-FADD/FADD ($F_{2,11} = 3.73$, $p = 0.05$), which is a measure of neural plasticity, showed the lowest content during early adolescence ($57 \pm 6\%$) followed by a temporal increase with the course of adolescence (mid, $72 \pm 4\%$; and late adolescence, $97 \pm 16\%$; Fig. 2c). The ratio of fragmented PARP-1 enzyme (85 kDa) to its native (116 kDa) form is considered to be a measure of cell death (Cagnol et al., 2006) and was modulated in the HC during the course of adolescence ($F_{2,11} = 4.84$,

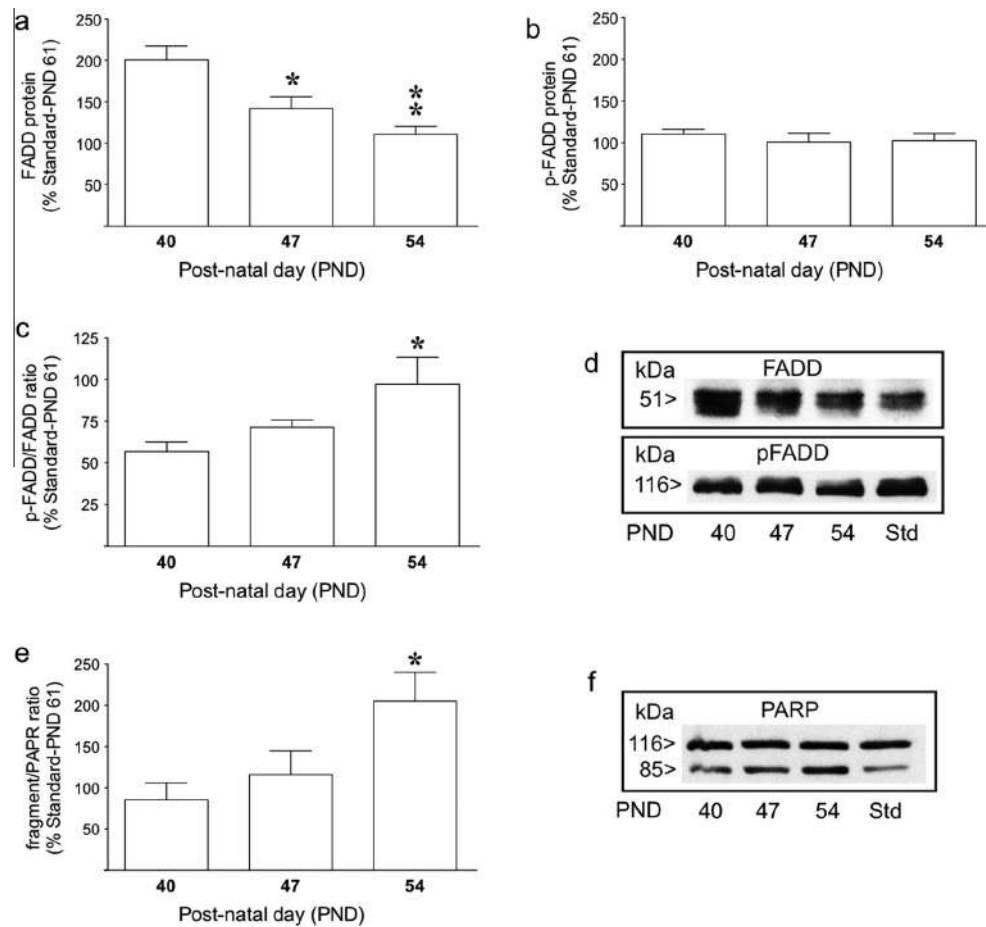


Fig. 2. Hippocampal cell fate regulation during the course of adolescence. (a) FADD protein was modulated during adolescence with the highest FADD protein content observed in early adolescence followed by a temporal decrease in hippocampal total homogenate ($F_{2,11} = 11.72$, $p < 0.05$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared to PND 40 (ANOVA followed by Tukey's test). Columns are mean \pm SEM of n experiments per group and expressed as percentage of a pool of standard controls (Std: basal adult control rats, PND 61 adult control group, $n = 6$). Groups of treatments: PND 40 ($n = 5$), PND 47 ($n = 5$), PND 54 ($n = 5$). (b) p-FADD was not modulated during the course of adolescence ($F_{2,11} = 0.42$, n.s.). (c) p-FADD/FADD protein ratio presented the lowest content in early adolescence followed by a temporal increase with the course of adolescence ($F_{2,11} = 3.73$, $p = 0.05$). * $p < 0.05$ when compared to PND 40 (ANOVA followed by Tukey's test). (d) Representative immunoblots depicting labeling of total FADD and p-FADD. (e) Cell damage/plasticity was observed during adolescence as shown by the time-course increase in PARP-1 fragmentation, expressed as the ratio between cleaved (85 kDa) and basal (116 kDa) PARP-1 protein forms ($F_{2,11} = 4.84$, $p < 0.05$). * $p < 0.05$ when compared to PND 40 (ANOVA followed by Tukey's test). (f) Representative immunoblot depicting labeling of PARP-1 (116 kDa native form and 85 kDa fragment form).

$p < 0.05$) with the highest fragmentation observed in late adolescence ($205 \pm 35\%$) (Fig. 2e, f).

The basal regulation of hippocampal cell genesis markers (cell proliferation and cell survival) was studied during different periods of adolescence by IHC in the left dentate gyrus (DG). Recent cell proliferation (within a cell cycle time of 25 h) as measured by Ki-67+ cells in the DG (Ki-67+ Cells/Area) was regulated in a temporal manner ($F_{2,11} = 7.88$, $p < 0.01$), showing the highest values around mid-adolescence (early: 45 ± 4 ; mid: 69 ± 6 ; late 47 ± 4 Ki-67+ Cells/Area; Fig. 3a). In order to study cell survival, BrdU was administered under basal conditions at the beginning of the experiment (see Fig. 1a). As rats were killed 14 days after BrdU pretreatment, the determination of BrdU+ cells yields a measure of the basal survival of this

population of cells in the DG. The results showed no change in the rate of cell survival during the course of adolescence ($F_{2,11} = 2.50$, n.s.) even though there was a clear decrease in the number of surviving cells with age (early: 105 ± 13 ; mid: 95 ± 7 ; late 76 ± 6 BrdU+ Cells/Area respectively; Fig. 3b).

Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability. Chronic cocaine (15 mg/kg, 7 days) modulated pro-apoptotic FADD protein ($126 \pm 7\%$, $p < 0.05$, Fig. 4a, d), but not p-FADD (Fig. 4b, d), as well as anti-apoptotic p-FADD/FADD ratio ($73 \pm 2\%$, $p < 0.05$, Fig. 4e) in an inverse manner only when administered during the earlier window of adolescence (PND 33–39) and rats were killed at PND 40. In an attempt to ascertain

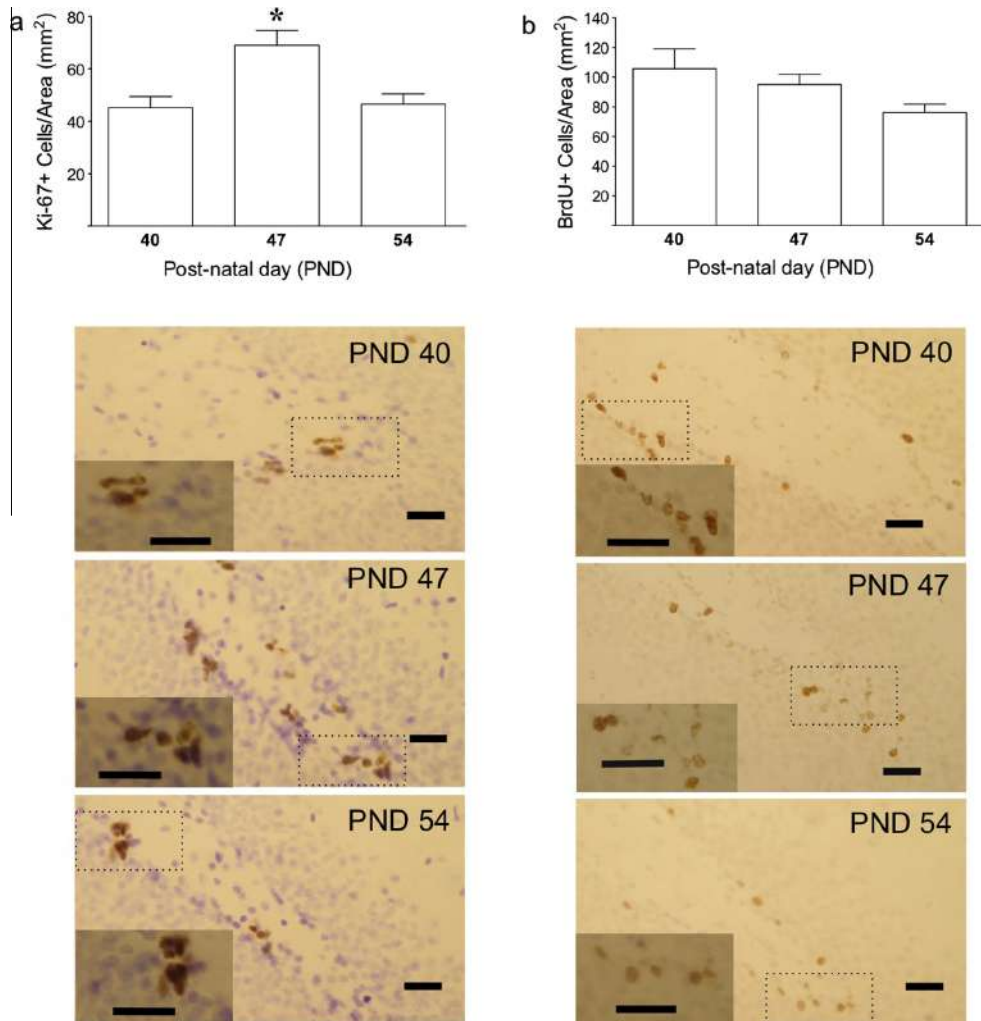


Fig. 3. Hippocampal cell genesis regulation during the course of adolescence. (a) Cell proliferation was modulated during the course of adolescence with the highest rates shown in mid-adolescence as shown by the quantitative analysis of Ki-67+ cells by area (mm²) in the left DG. Columns are mean \pm SEM of the total number of quantified cells by area in the DG. Groups of treatments: PND 40 ($n = 5$), PND 47 ($n = 5$), PND 54 ($n = 5$). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatment ($F_{2,11} = 7.88$, $p < 0.01$). $p < 0.05$ when compared to PND 40 or PND 54 (ANOVA followed by Tukey's test). (b) Cell survival (14 days old cells) was not modulated during the course of adolescence as shown by the quantitative analysis of BrdU+ cells by area (mm²) in the left DG ($F_{2,11} = 2.50$, n.s.). Bottom images: Representative IHC of Ki-67+ (left panels, brown labeling in blue granular layer) and BrdU+ (right panels, dark brown labeling in light brown granular layer) cell labeling during the course of adolescence (PND 40, 47 and 54). The bigger images were taken in a light microscope using a 40 \times objective lens to illustrate the anatomy of the DG. For each image, the left-bottom corner shows a representative IHC image taken using a 63 \times objective lens. Scale bar = 30 μ m. (The color reproduction of this figure is available on the web version of this article.)

whether FADD forms regulation during adolescence and by cocaine was region specific (i.e., HC) or common to other brain regions, FADD, its phosphorylated form and the balance between them, were evaluated in the PFC and striatum. As shown earlier for the HC (see Fig. 2a–d), similar basal changes during the course of adolescence (PND 40, 47, 54) were found in the PFC (FADD: $F_{2,11} = 7.71$, $p < 0.01$; p-FADD: $F_{2,11} = 0.60$, n.s.; p-FADD/FADD ratio: $F_{2,11} = 2.00$, n.s.) and striatum (FADD: $F_{2,11} = 1.54$, n.s.; p-FADD: $F_{2,11} = 0.05$, n.s.; p-FADD/FADD ratio: $F_{2,11} = 0.63$, n.s.), with the highest FADD content and lowest p-FADD/FADD ratio observed in early adolescence (PND 40) followed by a temporal change in mid and late

adolescence (see Table 1). However, and differently to the changes observed in the HC, cocaine administration during early adolescence (PND 40) did not modulate FADD in the PFC (control: 100 ± 2 vs. COC 7 d: 98 ± 10 , n.s.) or striatum (control: 100 ± 7 vs. COC 7 d: 118 ± 12 , n.s.), suggesting a regional role for hippocampal FADD at this window of adolescence following cocaine administration.

The fragment/PARP-1 ratio was increased by chronic cocaine (PND 40–46) as measured on PND 47 ($186 \pm 15\%$, $p < 0.05$) when compared to its control group (Fig. 4e, f). Similarly, the IHC experiments revealed that hippocampal recent cell proliferation (Ki-67+ Cells/Area) was impaired (56 ± 2 Ki-67+

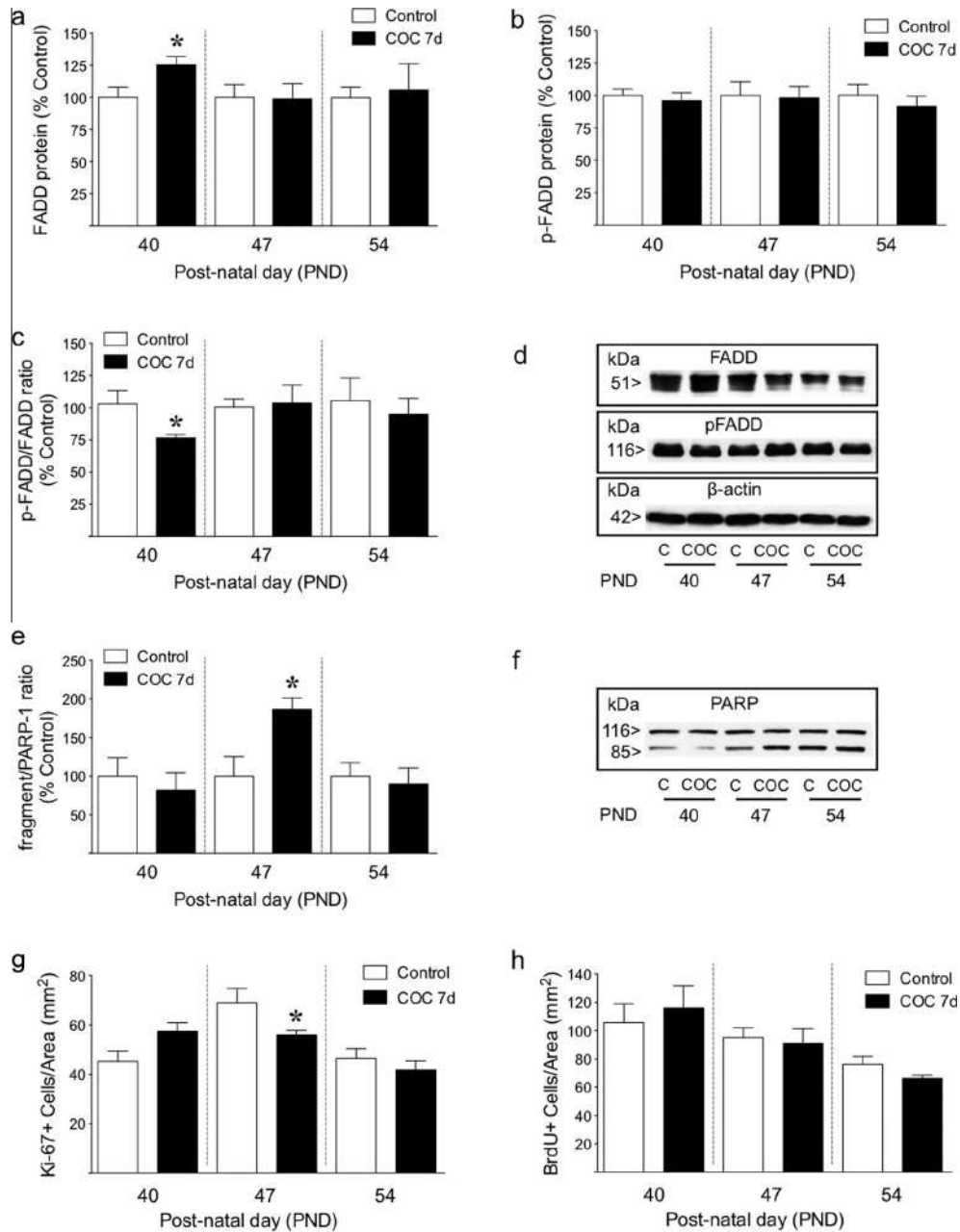


Fig. 4. Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability. (a) Cocaine increased the pro-apoptotic cell adaptor FADD and (c) decreased the anti-apoptotic p-FADD/FADD ratio only when administered during early adolescence (PND 40) while (b) did not modulate p-FADD at any time point during adolescence. Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of the corresponding age control group. **p* < 0.05 when compared with their respective age control group (Student's *t*-test: Control vs. COC 7 d at PND 40). (d) Representative immunoblots depicting labeling of total FADD, p-FADD and the corresponding for β -actin as a loading control. (e) Cocaine increased cell damage/plasticity (increased fragment/PARP-1 ratio) only when administered during mid adolescence (PND 47). Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of the corresponding age control group. **p* < 0.05 when compared with their respective age control group (Student's *t*-test: Control vs. COC 7 d at PND 47). (f) Representative immunoblots depicting labeling of PARP-1 (116 kDa native form and 85 kDa fragment form). (g) Quantitative analysis of cell proliferation (Ki-67+ cells by area) and (h) cell survival (14 days old BrdU+ cells by area) in the left DG by chronic cocaine during adolescence. Columns are mean \pm SEM of the total number of quantified cells by area in the DG. Groups of treatments for each period during adolescence (PND 40, 47, 54): Control (saline-treated rats, *n* = 5) and COC 7 d (15 mg/kg cocaine, i.p., 7 days, *n* = 5). **p* < 0.05 when compared with their respective age control group (Student's *t*-test: Control vs. COC 7 d at PND 47).

Table 1. Basal regulation of FADD and p-FADD protein content during the course of adolescence in rat prefrontal cortex (PFC) and striatum

	PND 40	PND 47	PND 54
<i>PFC</i>			
FADD	238 ± 5	180 ± 19*	174 ± 14*
p-FADD	116 ± 18	129 ± 12	107 ± 10
p-FADD/FADD ratio	49 ± 8	74 ± 10	64 ± 9
β-actin	99 ± 4	96 ± 6	96 ± 4
<i>Striatum</i>			
FADD	219 ± 16	210 ± 38	169 ± 11*
p-FADD	134 ± 28	123 ± 26	128 ± 23
p-FADD/FADD ratio	60 ± 11	59 ± 11	77 ± 15
β-Actin	93 ± 2	96 ± 2	97 ± 3

Groups of treatment: control rats from PND 40, 47 and 54 ($n = 5$ per age). Data represent mean ± SEM of n experiments per group and expressed in comparison to a pool of standard controls (Std: basal adult control rats, PND 61; $n = 6$). There were significant differences between the groups of treatment for FADD in PFC (one-way ANOVA followed by Tukey's test: $F_{2,11} = 7.71$, $p < 0.01$; $^*p < 0.05$ when compared to PND 40) and striatum (Student's t -test: $^*p < 0.05$ when compared to PND 40).

Cells/Area, $p < 0.05$) only when cocaine was administered during PND 40–46 and rats were killed at PND 47 (Fig. 4g), and possibly suggesting an increased cell damage induced by cocaine in the HC at this window of adolescence (PND 47). However, no effect of cocaine was observed on cell survival (14 days old cells labeled by BrdU at birth) at any age-window during adolescence (PND 40, 47 and 54; Fig. 4h).

To further examine cocaine effects on hippocampal plasticity during adolescence other cell markers were studied by WB analysis. As mentioned earlier this included neuroplasticity markers such as NF-κB (p50 subunit), BDNF, PSD-95, p-m-TOR, p-p70S6K and Cdk-5 (see Fig. 1c and Methods section). Remarkably, none of the markers evaluated in the HC were regulated in a basal manner during the course of adolescence (Control: PND 40, 47 and 54) or altered by cocaine experience (Control vs. COC 7 d) (see Table 2).

Study II: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood

The idea behind this study was to ascertain the long-term consequences of a cocaine experience during

adolescence in affecting hippocampal plasticity and behavioral despair (i.e., pro-depressive phenotype) in adulthood. The results showed that two paradigms (7 or 14 consecutive days) of chronic cocaine (15 mg/kg, i.p.) exposure during adolescence (PND 33–39 or PND 33–46) did not induce behavioral despair (i.e., increased immobility) in adult rats (PND 63) as measured by the FST (Fig. 5a). As expected (Kitada et al., 1983), and as a good positive control of the experimental conditions, the antidepressant DMI (20 mg/kg, three doses, i.p.) attenuated depression-like behavior by decreasing immobility and increasing active behaviors (i.e., climbing) (Fig. 5a). A previous history of cocaine (14 days, PND 33–46) during adolescence did not alter the antidepressant-like effects of DMI on the FST (data not shown) further suggesting that cocaine exposure during adolescence did not alter behavioral despair in adulthood.

When evaluating the molecular data, the results indicated that the hippocampal changes induced by cocaine exposure (15 mg/kg, 7 days, PND 33–39) during adolescence on FADD forms (increased FADD, decreased p-FADD/FADD ratio, Fig. 4a–d) as measured 24 h after the last treatment dose (PND 40) were transient and did not endure into adulthood (PND 64: Control vs. COC 7vd, Fig. 5b–e). Moreover, a longer paradigm of cocaine administration (14 days, PND 33–46) during adolescence did not alter FADD forms in adulthood (PND 64: Control vs. COC 14 d, Fig. 5b–e). Interestingly, the antidepressant DMI reduced FADD ($64 ± 4%$, $p < 0.01$, Fig. 5b, e) and increased p-FADD ($147 ± 22%$, n.s., Fig. 5c, e) and p-FADD/FADD ratio ($257 ± 50%$, $p < 0.05$, Fig. 5d) in the HC, as it was previously reported for the cerebral cortex (see García-Sevilla and García-Fuster, 2009), suggesting the induction of anti-apoptotic/neuroplastic effects mediated by the antidepressant drug and in line with the results observed in the FST. Moreover, the results indicated that hippocampal cell genesis (Ki-67 and BrdU) was not modulated in adulthood by a previous experience of cocaine administration (7 or 14 days) during adolescence (Fig. 5f, g).

DISCUSSION

The purpose of the present study was (1) to screen rats at different developmental ages to determine if there were

Table 2. Regulation of neuroplasticity markers by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability (early, mid, late) in rat hippocampus

Hippocampus	PND 40		PND 47		PND 54	
	Control	COC 7 d	Control	COC 7 d	Control	COC 7 d
NF-κB (p50)	100 ± 6	92 ± 11	100 ± 6	90 ± 5	100 ± 3	108 ± 4
proBDNF (32 kDa)	100 ± 7	101 ± 6	100 ± 6	97 ± 6	100 ± 6	106 ± 7
mBDNF (14 kDa)	100 ± 14	100 ± 9	100 ± 9	81 ± 9	100 ± 7	119 ± 5
PSD-95	100 ± 4	106 ± 3	100 ± 4	97 ± 3	100 ± 3	108 ± 6
p-mTOR	100 ± 17	130 ± 18	100 ± 24	72 ± 15	100 ± 20	133 ± 24
p-p70 S6 kinase	100 ± 7	115 ± 9	100 ± 8	97 ± 17	100 ± 20	106 ± 13
Cdk-5	100 ± 6	97 ± 6	100 ± 4	100 ± 7	100 ± 6	104 ± 5

Groups of treatment for each period during adolescence (PND 40, 47, 54): Control (saline-treated rats, i.p., 7 days, $n = 5$) and COC 7 d (15 mg/kg of cocaine, i.p., 7 days, $n = 5$). Data represent mean ± SEM of n experiments per group, and expressed as percentage of the corresponding control group (PND 40, 47 or 54 respectively). Chronic cocaine did not alter the content of any of the neuroplasticity markers analyzed (Student's t -test) at any given age window of adolescence in rat HC.

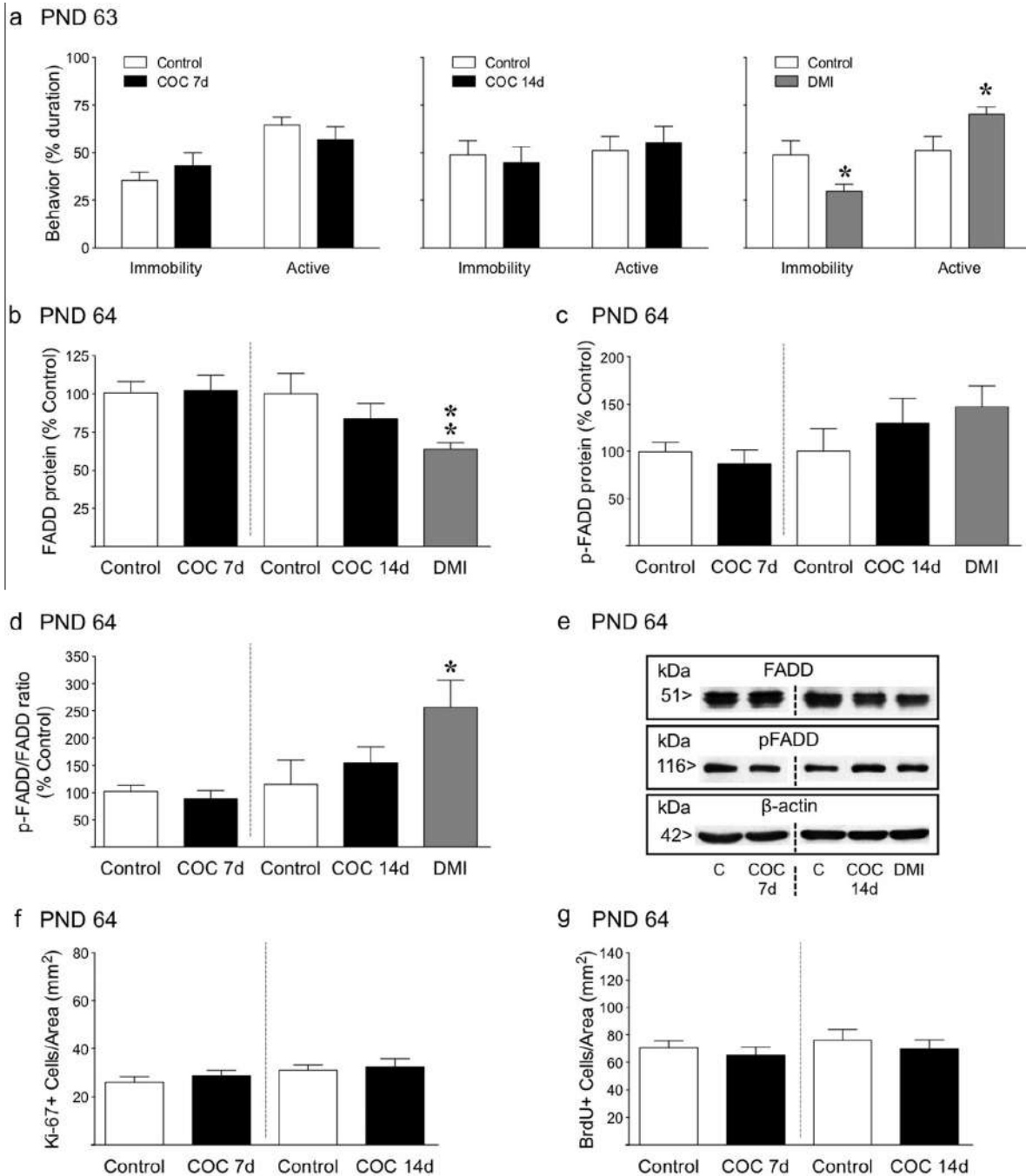


Fig. 5. Consequences of cocaine exposure during adolescence on inducing behavioral despair in adulthood. (a) Behavioral despair (i.e., depressive state) was evaluated by the FST (5-min period, test phase, Day 2, PND 63). Data represent mean \pm SEM of the percent duration being immobile vs. active (climbing + swimming). Groups of treatment: Control (saline-treated rats, PND 33–39), COC 7 d (cocaine-treated rats, PND 33–39); Control (saline-treated rats, PND 33–46 and saline treated during FST, PND 62–63), COC 14 d (cocaine-treated rats, PND 33–46 and saline treated during FST, PND 62–63), DMI (saline-treated rats, PND 33–46 and desipramine-treated rats during FST, PND 62–63). A two-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatment only for DMI comparison (interaction treatment \times behavior: $F_{1,26} = 9.77$, $p < 0.01$). $p < 0.05$ when compared with their respective control group. (b–e) Cocaine exposure (7 or 14 days) administered during adolescence did not modulate FADD or p-FADD/FADD ratio in adulthood (PND 64) while DMI decreased FADD (one-way ANOVA followed by Dunnett's test: $F_{2,27} = 5.32$, $p = 0.01$, ** $p < 0.01$ when compared to 14 d control group) and increased p-FADD/FADD ratio (Student's *t*-test detected significant differences between DMI and 14 d control group, $p < 0.05$) in the HC. Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of their corresponding control group (7 or 14 d). (e) Representative immunoblots depicting labeling of total FADD, p-FADD and the corresponding for β -actin as a loading control. (f, g) Cocaine exposure (7 or 14 days) administered during adolescence did not alter cell proliferation (Ki-67+ cells by area) or cell survival (38 days old BrdU+ cells by area) in the DG of adult rats (PND 64) when compared to their corresponding control group as measured by a *t*-test. Data represent mean \pm SEM of the total quantified cells by area in the left DG.

periods of vulnerability to cocaine-induced brain changes, and (2) to study the long-term effects of cocaine during a vulnerable period such as adolescence on inducing behavioral despair as a measure of depression-like behavior in adult rats. The findings reported here show that early-mid adolescence was a vulnerable period as compared to late adolescence for cocaine to induce hippocampal changes. However, two paradigms of cocaine administration during adolescence did not contribute to alter behavior in adulthood as measured by the FST.

Basal hippocampal cell fate regulation during the course of adolescence

The results demonstrated a dynamic basal modulation of several markers involved in the regulation of cell fate (FADD forms), cell damage/plasticity (PARP-1 fragmentation) and cell genesis (cell proliferation, cell survival) in the HC during the course of adolescence, and suggest a complex pattern of temporal regulation unique to each post-natal age and to the different neuronal populations within the hippocampal formation (total homogenate vs. DG). In particular, and in line with previous results, FADD forms and cell survival (BrdU) changes peaked during early adolescence, recent cell proliferation (Ki-67) showed the highest rates around mid-adolescence (Altman and Das, 1966), while PARP-1 cleavage peaked in late adolescence. Interestingly, similar time-course effects for FADD forms were observed in the PFC and striatum suggesting a broader role for FADD in the brain, as expected given its essential role during embryonic development (Yeh et al., 1998).

Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability

The results identified a period of vulnerability during adolescence (PND 33–39) in which cocaine, specifically in the HC, as compared to the PFC and striatum, increased the pro-apoptotic marker FADD and decreased the anti-apoptotic ratio p-FADD/FADD, suggesting a possible neurotoxic effect that might contribute to susceptibility to alter behavior in adulthood (i.e., addiction, comorbidity with depression). As mentioned earlier, the cell fate adaptor FADD could either modulate pro- or anti-apoptotic actions based on its cellular localization (cytosol vs. nucleus; Föger et al., 2009), its phosphorylation state (non phosphorylated FADD vs. p-FADD; Alappat et al., 2005) and its molecular partners (FLIP-L and p-PEA-15 vs. NF- κ B; Chen et al., 2005; Renganathan et al., 2005; Hwang et al., 2014). Previous data in the adult rat brain showed that FADD was modulated by acute but not by chronic cocaine (non-contingent and contingent administration) (García-Fuster et al., 2009, 2011; Álvaro-Bartolomé et al., 2011) and was increased in the brains of rats with a higher propensity to initiate cocaine use (García-Fuster et al., 2009). Even though FADD and p-FADD have been shown to inversely correlate for some drugs of abuse (i.e., opiate drugs and cannabinoids), this correlation was not

observed following cocaine administration (reviewed in Ramos-Miguel et al., 2012), as it is not observed for the current experiments (i.e., p-FADD not regulated by cocaine). Interestingly, the ratio of p-FADD to FADD, considered as a new index of neuroplasticity (Ramos-Miguel et al., 2012), was down regulated during early adolescence in parallel to the increase observed in pro-apoptotic FADD.

When administered during mid adolescence (PND 40–46) cocaine increased the pro-apoptotic cleavage of PARP-1 in the whole hippocampal brain region (DNA damage; Cagnol et al., 2006) and impaired cell proliferation (Ki-67; exclusively in the DG), further suggesting some degree of neurotoxicity elicited by cocaine in the HC during adolescence. To note that even though these changes are observed in parallel on PND 47, conclusions should be drawn with caution as multiple cell types, distinct anatomic connections and functions are related to total HC as compared to the ones exclusively in the DG. Interestingly, cell proliferation in adult rats was impaired during the course of cocaine withdrawal (García-Fuster et al., 2010, 2011), in parallel with increases in pro-apoptotic FADD mRNA expression also in the DG, while FADD protein was not altered in total hippocampal homogenate (García-Fuster et al., 2011). Similarly, the present results show a different regulation by cocaine for cell proliferation (exclusively in DG) and FADD protein forms (total homogenate of HC). Previous studies in adult rats revealed the effects of different paradigms of cocaine administration on cell proliferation and cell survival with some evidence showing that chronic cocaine diminished cell proliferation without affecting cell survival (Dominguez-Escribá et al., 2006) and other data supporting no effects of chronic cocaine on cell proliferation (Eisch and Harburg, 2006). Interestingly, hippocampal plasticity (i.e., impaired neurogenesis) has been suggested to have a role in determining vulnerability to relapse in rodent models of drug addiction (see Mandyam and Koob, 2012) as its normalization has been recently shown to protect against cocaine-primed relapse (Deschaux et al., 2014).

Other neuroplasticity markers were chosen based on previous literature describing their role on cell fate regulation and therefore were evaluated in the HC following chronic cocaine during adolescence. NF- κ B is known to be regulated by p-FADD (see Chen et al., 2005), which was not regulated by cocaine, while BDNF has a role in cell survival (Murray and Holmes, 2011) and PSD-95 is a neuronal activation marker (El-Husseini et al., 2000). p-mTOR and its target p70S6K are known to regulate cell growth and survival (Chiang and Abraham, 2005) while Cdk-5 has a role in neurogenesis regulation (Lagace et al., 2008). Remarkably, none of these neuroplasticity hippocampal markers were altered by cocaine at any window of adolescence vulnerability. These results presumably reflect adaptive mechanisms set in motion following chronic cocaine exposure. In fact, many of the known acute and chronic cocaine-induced alterations in gene expression and neurotransmitter systems are transient (Nestler, 2004), and are hypothesized to represent compensatory adaptations to maintain

homeostasis by reducing drug-induced effects. Similar results were shown by [Giannotti et al. \(2014\)](#) which recently reported no effects of chronic cocaine (20 mg/kg, s.c.) on proBDNF, mBDNF, p-mTOR and p-S6 kinase on the medial PFC during adolescence (PND 28–42). Remarkably, the present results suggest that the cell fate adaptor FADD, as compared to other neuroplasticity markers, has a key role following chronic cocaine during early adolescence in the HC.

Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood

It is well known that early exposure to certain drugs in humans can lead to neurobiological changes associated with an increased risk of depression (reviewed in [Volkow, 2004](#)). In particular, long-term cocaine use (i.e., abstinence) is commonly associated with a higher incidence of comorbid mental disorders, particularly mood and anxiety disorders ([Filip et al., 2013](#)). Moreover, withdrawal from chronic cocaine has been associated with depressive symptomatology in adult rats ([Markou and Kenny, 2002](#)), but there are no data showing how early exposure to chronic cocaine affects behavioral despair (i.e., one aspect of the emotional affectation in depression-like behavior) as measured by the FST in adulthood. The results revealed that cocaine administration during a vulnerable period such as adolescence did not cause long-term effects on inducing behavioral despair in adulthood. The consequences of cocaine exposure on inducing pro-depressive-like symptoms in the FST have been studied at different time points during life. For example, when cocaine was administered prenatally (15 mg/kg, b.i.d. between gestational ages 1–20) it induced enduring effects on depression-like behavior as measured at PND 120 ([Overstreet et al., 2000](#)). When administered from PND 1 to PND 27 (15 mg/kg, s.c.) cocaine induced depression-like effects as measured on the last day of cocaine administration (PND 27) ([Magalhães et al., 2002](#)). When chronic cocaine was administered during adolescence and measured during early withdrawal still in adolescence, it either showed no effect on depression-like behavior as measured two days after (PND 52–53) the last cocaine administration (15 mg/kg, three times daily, from PND 35–50; [Alves et al., 2008](#)), or it induced a pro-depressive state (i.e., increased immobility) as measured by a single 5-min FST exposure 3 days after (PND 45) the last cocaine injection (PND 28–42, 20 mg/kg, s.c.; [Caffino et al., 2015](#)). In adult rats, early withdrawal from cocaine (15 mg/kg, three times daily at 1 h intervals, 14 days) resulted in increased anxiety- and depression-like (i.e., increased immobility in the FST) symptoms ([Perrine et al., 2008](#)). On the other hand, long-term cocaine (15 mg/kg, 10 days, i.p.) withdrawal did not induce an increase in depression-like behavior as measured by the FST ([Zilkha et al., 2014](#)). Similarly, the current results show that a cocaine experience during adolescence did not affect behavioral despair (i.e., one aspect of depression-like behavior) or altered hippocampal plasticity (cell fate and genesis) in adulthood. In any case, one could not exclude that other aspects of emotional

affectation in the HC or other brain regions involved in emotional control could be changed by this previous history of cocaine experience. It is important to remark that the FST does not model depression *per se*, it is sensitive to manipulations that have antidepressant and pro-depressive effects in humans ([Detke et al., 1995](#)), as confirmed by the observed DMI results, and might be a limitation to the conclusions presented. Also when working with animal models of disorders in humans, other factors need to be considered such as the dose of cocaine employed, the paradigm followed and the fact that drug was administered in a forced passive way as compared to how humans voluntarily take it.

CONCLUSIONS

To conclude the results suggest a neurotoxic effect—increased cell damage (pro-apoptotic FADD and PARP-1 cleavage) and impaired cell proliferation—exerted by cocaine in the HC during adolescence. Moreover, two paradigms of cocaine administration during adolescence did not contribute to the later manifestation of behavioral despair as measured by the FST in adult rats. Whether the action of cocaine in the adolescent developing brain will lead to enduring changes that may compromise addiction liability in adulthood deserves further studies.

Acknowledgments—This work was supported by 'Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad' (grant number: 2012/011) and by 'Fundación Alicia Koplowitz' to M.J.G.-F. The study was also funded by RETICS-RTA (RD12/0028/0011; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER). The authors would like to thank Antonio Crespo for technical assistance. B.K. was supported by a pre-doctoral contract from RETICS-RTA. M.J.G.-F. is a 'Ramón y Cajal' Researcher (MINECO-UIB).

REFERENCES

- Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thoburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tand WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1 α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19:321–332.
- 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.
- Ávaro-Bartolomé M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA (2011) Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience* 196:1–15.
- Alves CJ, Magalhães A, Summavielle T, Melo P, De Sousa L, Tavares MA, Monteiro PRR (2008) Hormonal, neurochemical, and behavioral response to a forced swim test in adolescent rats throughout cocaine withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* 1139:366–373.
- Amrein I, Isler K, Lipp HP (2011) Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci* 34:978–987.
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27:3–18.

- Barr CS, Schwandt ML, Newman TK, Higley JD (2004) The use of adolescent nonhuman primates to model human alcohol intake: neurobiological, genetic, and psychological variables. *Ann N Y Acad Sci* 1021:221–233.
- Black YD, Maclaren FR, Naydenov AV, Carlezon Jr WA, Baxter MG, Konradi C (2006) Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. *J Neurosci* 20:9656–9665.
- Brenhouse HC, Andersen SL (2008) Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. *Behav Neurosci* 122:460–465.
- Brenhouse HC, Sonntag KC, Andersen SL (2008) Transient D1 Dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. *J Neurosci* 28:2375–2382.
- Burke AR, Miczek KA (2014) Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF and HPA axis. *Psychopharmacology* 231:1557–1580.
- Caffino L, Calabrese F, Giannotti G, Barbon A, Verheij MMM, Racagni G, Fumagalli F (2015) Stress rapidly dysregulates the glutamatergic synapse in the prefrontal cortex of cocaine-withdrawn adolescent rats. *Addict Biol* 20:158–169.
- Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC (2006) Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 11:337–346.
- Chen G, Bhojani MS, Heaford AC, Chang DC, Laxman B, Thomas DG, Griffin LB, Yu J, Coppola JM, Giordano TJ, Lin L, Adams D, Orringer MB, Ross BD, Beer DG, Rehemtulla A (2005) Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, perturbs cell cycle, and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12507–12512.
- Chiang GG, Abraham RT (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280:25485–25490.
- Chinet L, Plancherel B, Bolognini M, Bernard M, Laget J, Daniele G, Halfon O (2006) Substance use and depression. Comparative course in adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15:149–155.
- Dawes MA, Antelman SM, Vanyukow MM, Giancola P, Tarter RE, Susman EJ, Mezzich A, Clark DB (2000) Developmental sources of variation in liability to adolescent substance use disorders. *Drug Alcohol Depend* 61:3–14.
- 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.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121:66–72.
- Dietz DM, Dietz KC, Nestler EJ, Russo RJ (2009) Molecular mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Pharmacopsychiatry(Suppl. 1):S69–78*. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1202847>.
- Dominguez-Escribá L, Hernández-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ (2006) Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 24:586–594.
- Eisch AJ, Harburg GC (2006) Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16:271–286.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS (2000) PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290:1364–1368.
- Filip M, Frankowska M, Jastrzebska J, Wydra K, Przegalinski E (2013) Preclinical studies on comorbidity between depression and psychostimulant addiction. *Pharmacol Rep* 65:1529–1534.
- Föger N, Bulfone-Paus S, Chan AC, Lee KH (2009) Subcellular compartmentalization of FADD as a new level of regulation in death receptor signaling. *FEBS J* 276:4256–4265.
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G (2012) Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep* 13:322–330.
- García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ (2015) Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: down-regulation of apoptotic markers. *Neurotoxicology* 49:104–113.
- García-Fuster MJ, Keller B (2014) Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during early adolescence: implications for depression-like behavior in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 24(Suppl. 2):S679.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399–411.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2008) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: functional interactions with casein kinase I, Gi proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55:886–899.
- García-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2009) Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 34:1123–1134.
- García-Fuster MJ, Perez JA, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2010) Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *Eur J Neurosci* 31:79–89.
- García-Fuster MJ, Flagel 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.
- García-Fuster MJ, Parks GS, Clinton SM, Watson SJ, Akil H, Civelli O (2012) The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:607–613.
- García-Sevilla JA, García-Fuster MJ (2009) Acute and chronic antidepressants modulate Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) in rat brain: involvement of monoamine receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(Suppl. 3):S431.
- Giannotti G, Caffino L, Calabrese F, Racagni G, Riva MA, Fumagalli F (2014) Prolonged abstinence from developmental cocaine exposure dysregulates BDNF and its signaling network in the medial prefrontal cortex of adult rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:625–634.
- Hwang EY, Jeong MS, Park SY, Jang SB (2014) Evidence of complex formation between FADD and c-FLIP death effector domains for the death inducing signaling complex. *BMB Rep* 47:488–493.
- 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.
- Kitada Y, Miyauchi T, Kanazawa Y, Nakamichi H, Satoh S (1983) Involvement of alpha- and beta 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology* 22:1055–1060.
- Lagace DC, Benavides DR, Kansy JW, Mapelli M, Greengard P, Bibb JA, Eisch AJ (2008) Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18567–18571.
- Magalhães A, Tavares MA, de Sousa L (2002) Postnatal cocaine exposure: effects on behavior of rats in forced swim test. *Ann N Y Acad Sci* 965:529–534.
- 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.
- Marco EM, Macri S, Laviola G (2011) Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res* 19:286–307.

- Markou A, Kenny PJ (2002) Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories. *Neurotox Res* 4:297–313.
- Mueser KT, Drake RE, Wallach MA (1998) Dual diagnosis: a review of etiological theories. *Addict Behav* 23:717–734.
- Murray PS, Holmes PV (2011) An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. *Int J Pept* 2011:654085.
- Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47:24–32.
- Overstreet DH, Moy SS, Lubin DA, Gause LR, Lieberman JA, Johns JM (2000) Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats. *Physiol Behav* 70:149–156.
- Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu CA, Schroeder JA, Unterwald EM (2008) Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology* 54:355–364.
- Ramos-Miguel A, Álvaro-Bartolomé M, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2012) Role of multifunctional FADD (Fas-Associated Death Domain) adaptor in drug addiction. In: Belin David, editor. *Addictions-from pathophysiology to treatment*. InTech Open. p. 201–226. ISBN: 978-953-51-0783-5.
- Renganathan H, Valdyanathan H, Knapinska A, Ramos JW (2005) Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J* 390:729–735.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47:33–46.
- Schepis TS, Adinoff B, Rao U (2008) Neurobiological processes in adolescent addictive disorders. *Am J Addict* 17:6–23.
- 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.
- Scobie KN, Damez-Werno D, Sun H, Shao N, Gancarz A, Panganiban CH, Dias C, Koo J, Caiafa P, Kaufman L, Neve RL, Dietz DM, Shen L, Nestler EJ (2014) Essential role of poly(ADP-ribosylation) in cocaine action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2005–2010.
- Sullivan SE, Black YD, Naydenov AV, Vassoler FR, Hanlin RP, Konradi C (2011) Binge cocaine in adolescent rats affects amygdalar gene expression patterns and alters anxiety-related behavior in adulthood. *Biol Psychiatry* 70:583–592.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463.
- Spear LP (2011) Rewards, aversions and affect in adolescence: emerging convergences across laboratory animal and human data. *Dev Cogn Neurosci* 1:390–403.
- Stanis JJ, Andersen SL (2014) Reducing substance abuse during adolescence: a translational framework for prevention. *Psychopharmacology* 231:1437–1453.
- Volkow ND (2004) The reality of comorbidity: depression and drug abuse. *Biol Psychiatry* 56:714–717.
- Wojtowicz JM, Kee N (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 1:1399–1405.
- Wong WC, Ford KA, Pagels NE, McCutcheon JE, Marinelli M (2013) Adolescents are more vulnerable to cocaine addiction: behavioral and electrophysiological evidence. *J Neurosci* 33:4913–4922.
- Yeh WC, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279:1954–1958.
- Zilkha N, Feigin E, Barnea-Ygael N, Zangen A (2014) Induction of depressive-like effects by subchronic exposure to cocaine or heroin in laboratory rats. *J Neurochem* 130:575–582.

(Accepted 13 July 2015)
(Available online 26 July 2015)

ARTÍCULO II

Opposite regulation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during adolescence

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

Neuroscience Letters, 2016; 615: 60-65

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue cuantificar los niveles proteicos de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ en varias regiones cerebrales en ratas expuestas a cocaína durante distintas etapas de la adolescencia, ya que el sistema endocannabinoide juega un papel muy importante en la adicción a esta droga. Los resultados obtenidos identificaron la adolescencia temprana-media (PND 33-39) como el período de mayor vulnerabilidad tras la administración de cocaína debido a una desregulación de los receptores CB (incremento de los niveles del receptor CB₁ y una disminución de CB₂ en la corteza prefrontal). Además, los cambios inducidos por la cocaína durante la adolescencia temprana-media sobre estos receptores fueron temporales ya que no perduraron hasta la etapa adulta. Estos resultados sugieren, junto con los datos previamente obtenidos (véase Artículo I), que cuanto antes se inicia la exposición a cocaína en rata (ventana de vulnerabilidad, PND 33-39), peores son los efectos neurotóxicos inmediatos inducidos en el cerebro.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research paper

Opposite regulation of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during adolescence

Rubén García-Cabrerizo^{a,b}, M. Julia García-Fuster^{a,b,*}^a Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain^b Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud-Red de Trastornos Adictivos (RETICS-RTA), ISCIII, Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- There is a period of vulnerability during adolescence to cocaine effects in rat brain.
- Chronic cocaine oppositely regulates CB₁ and CB₂ receptors in PFC.
- These changes are transient, as they did not endure into adulthood.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2015

Received in revised form

21 December 2015

Accepted 13 January 2016

Available online 18 January 2016

Keywords:

Adolescence

Cocaine

Cannabinoid receptors

Prefrontal cortex

Hippocampus

ABSTRACT

The endocannabinoid system is implicated in the neurobiology of cocaine addiction, although it is not clear how cocaine regulates brain CB₁ and CB₂ receptors, especially during adolescence, a critical moment for shaping adult response to drug use. This study evaluated CB₁ and CB₂ protein levels in prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) by western blot analysis with specific and validated antibodies: (1) basally during adolescence (post-natal day PND 40, PND 47, PND 54), (2) by a sensitizing regimen of cocaine (15 mg/kg, 7 days, i.p.) during different windows of adolescence vulnerability (PND 33–39, PND 40–46, PND 47–53), and (3) following repeated cocaine administration during adolescence (PND 33–39) in adulthood (PND 64). The results demonstrated a dynamic and opposite basal modulation of CB₁ and CB₂ receptors in PFC and HC during adolescence. CB₁ receptor levels were increased while CB₂ receptors were decreased as compared to adulthood with asymptotes values around mid adolescence (PND 47) both in PFC (CB₁: +45 ± 22, $p < 0.05$; CB₂: –24 ± 6%, $p < 0.05$) and HC (CB₁: +53 ± 23, $p < 0.05$; CB₂: –20 ± 8%, $p < 0.05$). Interestingly, cocaine only altered CB₁ (+55 ± 10%, $p < 0.05$) and CB₂ (–25 ± 10%, $p < 0.05$) receptors when administered during early adolescence and only in PFC. However, the changes observed in PFC by repeated cocaine administration in adolescence were transient and did not endure into adulthood. These results identified a period of vulnerability during adolescence at which cocaine dysregulated the content of CB receptors in PFC, suggesting an opposite role for these receptors in the effects mediated by cocaine.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The endocannabinoids function as retrograde lipid messengers through the activation of inhibitory G-protein coupled cannabinoid (CB) receptors. At least two CB receptors, type 1 (CB₁) and type 2 (CB₂) have been described with regard to their primary structure, and their ligand binding and signal transduction properties

(reviewed in Ref. [1]). CB₁ receptors are predominantly localized in the brain and are highly expressed in cerebral cortex and other limbic areas [1], and in the reward circuitry including prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC) [2]. On the other hand, considerable functional and anatomical evidence now suggests that CB₂ receptors, which are mainly found in peripheral cells [1], are expressed in the nervous system, certainly in activated microglia (reviewed in Ref. [3]) and very likely in some neurons (e.g., [4–6]).

Although the endocannabinoid system has been implicated in some of the underlying neurobiology of cocaine addiction [7], the literature shows variable results in the changes elicited by repeated cocaine exposure in regulating CB₁ (e.g., [8–10]) and CB₂ [11,12] receptors in the brain. Interestingly these studies have focused on

* Corresponding author at: Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain. Fax: +34 971 259501.

E-mail address: j.garcia@uib.es (M.J. García-Fuster).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.018>

0304-3940/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

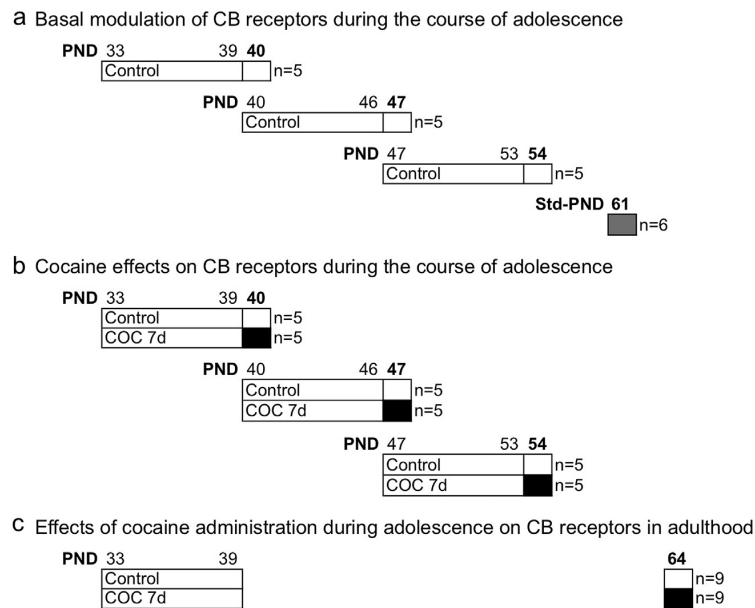


Fig. 1. Experimental design. (a) Basal modulation of CB₁ and CB₂ receptors during the course of adolescence. PND: post-natal day. Groups of treatments: control rats at PND 40 ($n=5$), PND 47 ($n=5$), PND 54 ($n=5$) and a pool of standard controls (Std-PND 61, $n=6$). (b) Cocaine effects on CB₁ and CB₂ receptors during the course of adolescence. Groups of treatments: PND 40 control ($n=5$) and COC 7 days ($n=5$), PND 47 control ($n=5$) and COC 7 days ($n=5$), PND 54 control ($n=5$) and COC 7 days ($n=5$). (c) Effects of cocaine administration during adolescence on CB₁ and CB₂ receptors in adulthood. Groups of treatments: Control ($n=9$), COC 7 days ($n=9$).

the effects of cocaine in adulthood as compared to adolescence, which is a critical period during development in which the brain undergoes widespread shaping and remodeling (see Ref. [13]), including the endocannabinoid system (e.g., see review [14]). In fact, CB receptors expression emerge early in the rat brain during prenatal development showing a transient distribution in atypical and key regions as compared to adulthood [15,16]. Adolescence is highly conserved across species [13] and it is divided into early (post-natal day, PND 21–34), mid (PND 34–46) and late adolescence (PND 46–59) in rats (see Ref. [17]). Given the described greater sensitivity of the adolescent brain to the plastic changes caused by several drugs of abuse [18] and by cocaine in particular (e.g., [19,20]; see revision, [21]) this study evaluated the regulation of CB₁ and CB₂ receptor protein expression basally (age effect) and by repeated cocaine administration at different windows of adolescence vulnerability in rat brain (PFC and HC). These two key brain regions in the reward circuitry were mainly chosen based on their known role in mediating cocaine responses [7–12] as well as their role during development in controlling normal and maladaptive behavior [13]. Moreover, the effects of cocaine administration during adolescence on the long-term regulation of brain CB₁ and CB₂ receptors were evaluated in adulthood.

2. Materials and methods

2.1. Animals

For this study 54 adolescent male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France) at weaning (PND 21). Rats were housed in standard cages (2 or 3 rats per cage) in controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle, lights on at 8:00 AM) with *ad libitum* access to a standard diet and tap water. All animal care and experimental procedures were conducted during the light cycle and according to standard ethical guidelines (U.K. Animals, Scientific Procedures, Act, 1986, and European Communities Council Direc-

tive 86/609/EEC), and approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

2.2. Experimental design and drug administration

Thirty-six rats were utilized to determine the basal modulation of CB₁ and CB₂ receptors with age as well as the effect of cocaine during the course of adolescence in PFC and HC. Rats were housed until they reached the developmental age-window [17] of study. The basal regulation of CB₁ and CB₂ receptors during the course of adolescence (PND 40, PND 47, PND 54) was evaluated in control rats ($n=5$ per group) as compared to a group of standard adult control rats (Std, $n=6$, PND 61) (Fig. 1a). The regulation of CB₁ and CB₂ receptors by a sensitizing regimen of cocaine (obtained from 'Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios', Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Spain) (15 mg/kg, i.p., $n=5$ per age group, for 7 consecutive days; paradigm previously behaviorally characterized in terms of inducing psychomotor sensitization [22]) was ascertained during different windows of adolescent vulnerability (PND 33–39, PND 40–46, PND 47–53) (Fig. 1b). Control rats received saline (0.9% NaCl, i.p., $n=5$ per age group) for 7 consecutive days at the indicated windows of adolescence. To note that control rats are the same animals used to evaluate the basal modulation of CB receptors during adolescence and in comparison with a standard adult control (Fig. 1a and b). Rats were transferred to an adjacent room to receive their daily injections (about 10:00 AM), as this paradigm of experimenter-administered cocaine induces environment-paired behavioral sensitization (see Ref. [22]). Rats were killed 24 h after the last injection (PND 40, PND 47, PND 54). To note that treatment groups (control vs. cocaine) from each window of adolescence vulnerability were killed at different days (i.e., consecutive weeks; PND 40, 47, 54) as they reached the selected age-window of study.

A total of 18 rats were utilized to evaluate the consequences of a cocaine experience during adolescence on the long-term regulation

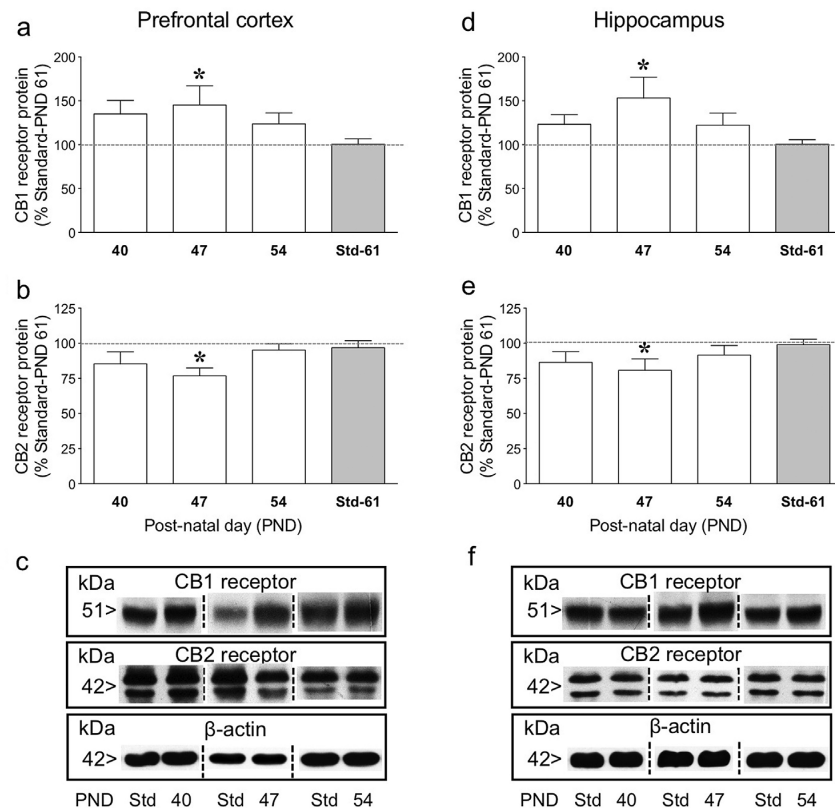


Fig. 2. Dynamic and opposite basal modulation of CB₁ and CB₂ receptors during the course of adolescence in rat brain. CB₁ and CB₂ receptor protein content in PFC (a–b) and HC (d–e) during the course of adolescence (PND 40, 47 and 54). Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of a pool of standard controls (Std-61: basal adult control rats, PND 61 adult control group, *n* = 6). Groups of treatments: PND 40 (*n* = 5), PND 47 (*n* = 5), PND 54 (*n* = 5). **p* < 0.05 when comparing PND 47 vs. Std-PND 61 (Student's *t*-test). Representative immunoblots depicting labeling of CB₁ and CB₂ as well as β -actin (loading control) content in PFC (c) and HC (f) for each time window of adolescence (PND 40, 47 and 54) in comparison to a Std-PND 61 (note that separate experiments are delimited by a line).

of brain CB₁ and CB₂ receptors in adulthood (Fig. 1c). Rats were treated daily with cocaine (15 mg/kg, i.p., *n* = 9) or saline (0.9% NaCl, i.p., *n* = 9) for 7 days (PND 33–39) and then killed in adulthood (PND 64).

2.3. Tissue preparation and Western blot analysis

Rats were killed by rapid decapitation and their brains removed at the indicated times. PFC and HC were dissected from the right half of the brain and rapidly frozen on liquid nitrogen, and kept at -80°C until use for western blot (WB) experiments. Total tissue homogenates from PFC and HC were prepared and CB₁ and CB₂ protein expression was evaluated by WB analysis as described earlier [23] using specific previously validated primary antibodies: anti-cannabinoid receptor 1 (CB₁, dilution 1:200, Abcam, Cat No. 23703, Cambridge, UK; see Ref. [10]) and anti-cannabinoid receptor 2 (CB₂, dilution 1:1000, Cayman Chemical, Cat No. 101550, Ann Arbor, Michigan, USA; see Refs. [5,10]). The quantification procedure was assessed 3–6 times in different gels (each gel with different brain samples from control and drug-treated rats). Percent changes in immunoreactivity with respect to standard or control samples (100%) were calculated for each treated rat in the various gels at every age, and the mean value was used as a final estimate. In all experiments, β -actin was quantitated as a loading control (data not shown except for representative immunoblots).

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Student's *t*-test analysis was used to evaluate statistical differences between groups. The level of significance was *p* \leq 0.05. Data analysis and graphs were performed with GraphPad Prism, Version 6 (La Jolla, CA, USA).

3. Results and discussion

CB receptors are known to be expressed and functional from the very early developmental stages [15,16] such that its activity can modulate a broad array of developmental processes (reviewed in Ref. [14]). Interestingly, in neural cells CB₁ and CB₂ receptors show opposite patterns of expression, with CB₁ increasing and CB₂ decreasing along neuronal differentiation (see review, [24]). Similarly, the present results demonstrated a dynamic and opposite basal modulation for CB₁ and CB₂ receptors at different age-windows during adolescence (PND 40, 47 and 54) as calculated in each gel in comparison to a pool of standard adult controls (Std, PND 61) in rat brain (Fig. 2). In particular, CB₁ receptor levels were increased while CB₂ receptors were decreased in adolescence as compared to adulthood with asymptotes values around mid adolescence (PND 47) both in PFC (CB₁: $+45 \pm 22$, *p* < 0.05; CB₂: $-24 \pm 6\%$, *p* < 0.05; Fig. 2a–c) and HC (CB₁: $+53 \pm 23$, *p* < 0.05; CB₂: $-20 \pm 8\%$, *p* < 0.05; Fig. 2d–f). A significant inverse correlation between CB₁ and CB₂ receptor protein expression was observed

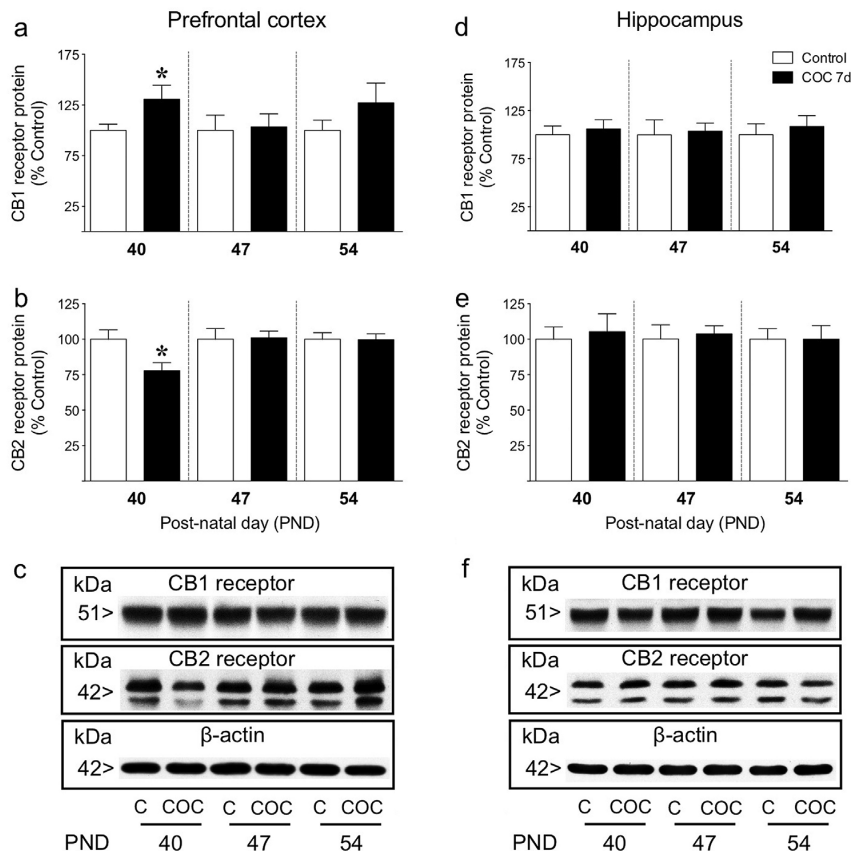


Fig. 3. Repeated cocaine regulated CB₁ and CB₂ receptors when administered during early adolescence only in PFC. CB₁ and CB₂ receptor protein content in PFC (a–b) and HC (d–e) by cocaine during periods of adolescence vulnerability (PND 40, 47, 54). Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of the corresponding age control group. Groups of treatments: PND 40 control (*n* = 5) and COC 7 days (*n* = 5), PND 47 control (*n* = 5) and COC 7 days (*n* = 5), PND 54 control (*n* = 5) and COC 7 days (*n* = 5). **p* < 0.05 when comparing Control vs. COC 7 days at PND 40 (Student's *t*-test). Representative immunoblots depicting labeling of CB₁ and CB₂ as well as β -actin (loading control) content in PFC (c) and HC (f).

in HC ($r = -0.624$, $n = 15$, $p < 0.05$) but not in PFC ($r = -0.301$, $n = 15$, $p > 0.05$) during adolescence (PND 40, 47 and 54).

Few studies have evaluated the changes in CB receptors expression in brain regions following cocaine administration in adulthood. At the level of gene expression, repeated exposure to cocaine either decreased CB₁ receptor in rat brain cortex [8] and in mouse nucleus accumbens [12] or increased it in mouse PFC [25] while showed no change in HC [8]. CB₂ receptor gene expression was increased by repeated cocaine administration in mouse brain preparations [11]. At the level of protein expression, CB₁ receptor was either increased in mouse PFC [25] or reduced in the PFC of cocaine addicts and in the cortex of adult rodents treated repetitively with cocaine while CB₂ receptor was not altered [10]. When evaluating the number of CB₁ agonist binding sites cocaine was reported to either not change [8] or increase [9] brain receptor density. The discrepancies between these studies might relate to differences in the species (rat, mouse, human) or in the experimental design such the dosing paradigm of cocaine administration as well as the extent of withdrawal following drug exposure. Interestingly, and as far as the authors are aware, there is no data in the literature analyzing the immediate effects of repeated cocaine exposure during different windows of adolescence on CB receptors protein expression. Thus, the current results identified a period of vulnerability during adolescence (PND 33–39) at which cocaine (15 mg/kg, 7 days) dysregulated the content of CB receptors by increasing CB₁ (+31 \pm 14, $p < 0.05$; Fig. 3a and c) and

decreasing CB₂ (-22 ± 6 , $p < 0.05$; Fig. 3b and c) receptor proteins only in PFC as compared to HC (CB₁: +6 \pm 10, n.s.; CB₂: +5 \pm 13%, n.s.; Fig. 3d–f). When cocaine was administered repeatedly at later time points during adolescence (PND 40–46 or PND 47–53) and rats were killed on PND 47 or PND 54 the results showed no modulation of CB receptors in PFC or HC (Fig. 3). Moreover, the changes induced in PFC by cocaine exposure (15 mg/kg, 7 days, PND 33–39) during adolescence on CB receptors (increased CB₁, decreased CB₂, Fig. 3a–c) as measured 24 h after the last treatment dose (PND 40) were transient and did not endure into adulthood (PND 64: Control vs. COC 7 days, Fig. 4a–c). A recent study evaluated, among other things, the long-term consequences of cocaine exposure during adolescence in adult rats [26]. Their results showed that rats exposed to cocaine during adolescence exhibited changes in adulthood in CB receptors density and functionality in a region-specific manner, displaying, in relation to the brain areas of the current studies, reduced CB₁ receptor density in PFC and increased CB₁ receptor functionality within HC [26]. Again, the differences between all the above previously discussed data for adult rats and the present study might relate to differences in the age of drug exposure (adolescence vs. adulthood) as well as the timing of analysis (immediate vs. long-term effects).

In terms of the functional role of CB regulation (increased CB₁ and decreased CB₂) by cocaine at this particular vulnerable window of adolescence, it was previously shown that over-activation of CB₁ receptors decreased brain network activity [27]. Interest-

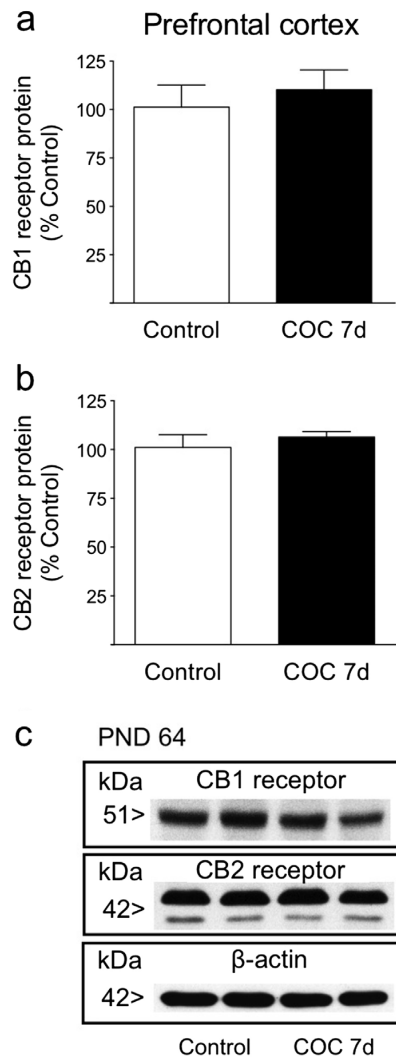


Fig. 4. Repeated cocaine administered during adolescence did not alter CB₁ and CB₂ receptors in adulthood. CB₁ (a) and CB₂ (b) receptor protein content in adult (PND 64) PFC following cocaine exposure during adolescence (15 mg/kg, i.p., 7 days, PND 33–39). Columns are mean \pm SEM of *n* experiments per group and expressed as percentage of its control group. Groups of treatments: Control (*n* = 9), COC 7 days (*n* = 9). Representative immunoblots depicting labeling of CB₁ and CB₂ as well as β -actin (loading control) content in PFC at PND 64 (c).

ingly, early and mid-adolescence constitute a critical period during which repeated CB₁ receptor stimulation is sufficient to elicit an enduring state of PFC network disinhibition resulting from a development impairment of the maturation of GABA function in PFC [28]. In terms of counteracting an increased CB₁ receptor and associated signaling, antagonism of CB₁ receptors have been shown in adulthood to attenuate cocaine's rewarding effects when administered systemically [29] and when injected in the medial PFC with the concomitant extinction behavior procedure to impair consolidation and facilitated extinction of cocaine-associated memories [30]. On the other hand, considerable functional evidence now suggests that CB₂ receptors have a role in the brain (reviewed in Ref. [3]). Some recent examples have shown that CB₂ receptors are located in tyrosine hydroxylase-containing neurons in the human substantia nigra

[6]. Moreover, CB₂ genes and receptors are expressed in mid-brain dopamine neurons and functionally modulate dopamine excitability and dopamine-related behavior in mouse brain [31]. In particular, activation of CB₂ receptors inhibited dopamine neuronal firing and cocaine self-administration [31]. Interestingly, transgenic mice overexpressing CB₂ receptors showed a decreased response to cocaine effects both in terms of motor sensitization and in self-administration [12]. Therefore, the opposite basal modulation of CB receptors (increased CB₁ and decreased CB₂) in PFC during adolescence and following repeated cocaine exposure may suggest potential compensatory mechanisms between both receptors. This type of opposite compensatory regulation between CB receptors has an important role in neuronal differentiation during cortical development [24]. Remarkably, cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ form functional heteromers in rat brain showing a bidirectional cross-antagonism phenomenon by which CB₂ receptors can negatively modulate CB₁ receptor function [32]. Interestingly the changes in CB receptors are observed exclusively in PFC as compared to HC. In contrast, a recent study from our research group [23] showed that repeated exposure to cocaine during adolescence dysregulated cell fate markers (balance between cell survival and cell death) specifically in HC, which proposes key regional roles for different molecular players in mediating cocaine effects during adolescence. The study of other brain areas mediating the reinforcing actions of cocaine such as the nucleus accumbens or ventral tegmental area would add valuable information to the possible role of CB receptors in the vulnerability to develop cocaine dependence and therefore deserves future studies.

4. Conclusions

In summary, the results demonstrated a dynamic and opposite basal modulation of CB receptors during the course of adolescence with increased CB₁ and decreased CB₂ receptor in PFC and HC. Moreover, the results identified one window of vulnerability during adolescence (PND 33–39) at which cocaine increased CB₁ and decreased CB₂ receptor protein specifically in PFC. However, the changes observed in PFC by repeated cocaine administration during adolescence were transient and did not endure into adulthood. The opposite role for CB₁ and CB₂ receptors in the effects mediated by cocaine in early adolescence may contribute to adaptations in neuroplasticity and/or maturation processes in PFC that might compromise how the brain would later respond to cocaine in adulthood in terms of addiction liability.

Conflict of interest

The authors declare the absence of any competing financial interests concerning the content of this document.

Acknowledgments

This work was supported by 'Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad' (Spain, grant number: 2012/011) and by 'Fundación Alicia Koplowitz' to M.J.G.-F. The study was also funded by RETICS-RTA (RD12/0028/0011; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER, Spain). M.J.G.-F. is a 'Ramón y Cajal' Researcher (MINECO-UIB).

References

- [1] R.G. Pertwee, Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, *Pharmacol. Ther.* 74 (1997) 129–180.
- [2] E.L. Gardner, Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81 (2005) 263–284.

- [3] B.K. Atwood, K. Mackie, CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 467–479.
- [4] J.P. Gong, E.S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.R. Liu, P.A. Tagliaferro, A. Brusco, G.R. Uhl, Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain, *Brain Res.* 1071 (2006) 10–23.
- [5] M.S. García-Gutiérrez, J.M. Pérez-Ortiz, A. Gutiérrez-Adán, J. Manzanares, Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 1773–1784.
- [6] M.C. García, V. Cinquina, C. Palomo-Garo, A. Rábano, J. Fernández-Ruiz, Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 587 (2015) 1–4.
- [7] R. Maldonado, O. Valverde, F. Berrendero, Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction, *Trends Neurosci.* 29 (2006) 225–232.
- [8] S. González, J. Fernández-Ruiz, V. Sparpaglione, D. Parolaro, J.A. Ramos, Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels, *Drug Alcohol Depend.* 66 (2002) 77–84.
- [9] P. Adamczyk, A. Faron-Górecka, M. Kusmider, M. Dziedzicka-Wasylewska, M. Papp, M. Filip, Long-lasting increase in [³H]CP55,940 binding to CB1 receptors following cocaine self-administration and its withdrawal in rats, *Brain Res.* 1451 (2012) 34–43.
- [10] M. Álvaro-Bartolomé, J.A. García-Sevilla, Dysregulation of cannabinoid CB1 receptor and associated signaling networks in brains of cocaine addicts and cocaine-treated rodents, *Neuroscience* 247 (2013) 294–308.
- [11] E.S. Onaivi, H. Ishiguro, J.P. Gong, S. Patel, P.A. Meozzi, L. Myers, A. Perchuk, Z. Mora, P.A. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B.E. Akinshola, B. Hope, J. Lujilde, T. Inada, S. Iwasaki, D. Macharia, L. Teasentz, T. Arinami, G.R. Uhl, Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects, *PLoS One* 3 (2008) e1640.
- [12] A. Aracil-Fernández, J.M. Trigo, M.S. García-Gutiérrez, A. Ortega-Álvarez, A. Ternianov, D. Navarro, P. Robledo, P. Berbel, R. Maldonado, J. Manzanares, Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB receptors, *Neuropsychopharmacology* 37 (2012) 1749–1763.
- [13] L.P. Spear, The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24 (2000) 417–463.
- [14] T. Harkany, M. Guzmán, I. Galve-Roperh, P. Berghuis, L.A. Devi, K. Mackie, The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 83–92.
- [15] F. Berrendero, N. Sepe, J.A. Ramos, V. Di Marzo, J.J. Fernández-Ruiz, Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period, *Synapse* 33 (1999) 181–191.
- [16] J. Fernández-Ruiz, F. Berrendero, M.L. Hernández, J.A. Ramos, The endogenous cannabinoid system and brain development, *Trends Neurosci.* 23 (2000) 14–20.
- [17] A.R. Burke, K.A. Miczek, Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF and HPA axis, *Psychopharmacology* 231 (2014) 1557–1580.
- [18] J.J. Stanis, S.L. Andersen, Reducing substance abuse during adolescence: a translational framework for prevention, *Psychopharmacology* 231 (2014) 1437–1453.
- [19] H.C. Brenhouse, K.C. Sonntag, S.L. Andersen, Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: relationship to enhanced motivational salience of drugs cues in adolescence, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2375–2382.
- [20] W.C. Wong, K.A. Ford, N.E. Pagels, J.E. McCutcheon, M. Marinelli, Adolescents are more vulnerable to cocaine addiction: behavioral and electrophysiological evidence, *J. Neurosci.* 33 (2013) 4913–4922.
- [21] L.P. Spear, Rewards, aversions and affect in adolescence: emerging convergences across laboratory animal and human data, *Dev. Cognit. Neurosci.* 1 (2011) 390–403.
- [22] M.J. García-Fuster, J.A. Perez, S.M. Clinton, S.J. Watson, H. Akil, Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse, *Eur. J. Neurosci.* 32 (2010) 79–89.
- [23] R. García-Cabrerizo, B. Keller, M.J. García-Fuster, Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability: consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood, *Neuroscience* 304 (2015) 302–315.
- [24] I. Galve-Roperh, V. Chiurchiù, J. Díaz-Alonso, M. Baria, M. Guzmán, M. Maccarrone, Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 633–650.
- [25] E. Blanco, F.J. Pavón, A. Palomino, M.J. Luque-Rojas, A. Serrano, P. Rivera, A. Bilbao, F. Alen, M. Vida, J. Suárez, F. Rodríguez de Fonseca, Cocaine-induced behavioral sensitization is associated with changes in the expression of endocannabinoid and glutamatergic signaling systems in the mouse prefrontal cortex, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18 (2014) 1–10.
- [26] A. Llorente-Berzal, M.A. Assis, T. Rubino, E. Zamberletti, E.M. Marco, D. Parolaro, E. Ambrosio, M.P. Viveros, Sex-dependent changes in brain CB1R expression and functionality and immune CB2R expression as a consequence of maternal deprivation and adolescent cocaine exposure, *Pharmacol. Res.* 74 (2013) 23–33.
- [27] C. Bernard, M. Milh, Y.M. Morozov, Y. Ben-Ari, T.F. Freund, H. Gozlan, Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 9388–9393.
- [28] D.K. Cass, E. Flores-Barrera, D.R. Thomases, W.F. Vital, A. Caballero, K.Y. Tseng, CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex, *Mol. Psychiatry* 19 (2014) 536–543.
- [29] Z.X. Xi, K. Spiller, A.C. Pak, J. Gilbert, C. Dillon, X. Li, X.Q. Peng, E.L. Gardner, Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 1735–1745.
- [30] S.S. Hu, Y.W. Liu, L. Yu, Medial prefrontal cannabinoid CB1 receptors modulate consolidation and extinction of cocaine-associated memory in mice, *Psychopharmacology* 232 (2015) 1802–1815.
- [31] H.-Y. Zhang, M. Gao, Q.-R. Liu, G.-H. Bi, X. Li, H.-J. Yang, E.L. Gardner, J. Wu, Z.-X. Xi, Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E5007–E5015.
- [32] L. Callén, E. Moreno, P. Barroso-Chinea, D. Moreno-Delgado, A. Cortés, J. Mallol, V. Casadó, J.L. Lanciego, R. Franco, C. Lluis, E.I. Canela, P.J. McCormick, Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 20851–20865.

ARTÍCULO III

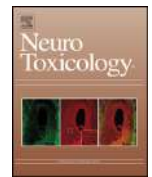
Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: Down-regulation of apoptotic markers

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

NeuroToxicology, 2015; 49: 104-113

Resumen

El objetivo del presente estudio fue comparar los efectos neuroquímicos inducidos por el MDMA en el hipocampo de ratas durante la adolescencia temprana y tardía. Los resultados más relevantes mostraron efectos neurotóxicos tras la administración de MDMA reduciendo tanto la señalización serotoninérgica (receptores postsinápticos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) como la GABAérgica (enzima GAD2), así como una disminución de la tasa basal de los neurofilamentos (NF-H, NF-M y NF-L). Por otro lado, se observó una disminución de los marcadores de la vía apoptótica extrínseca (disminución de FADD) e intrínseca (disminución de Bax y citocromo C) asociada posiblemente a los déficits proteicos inducidos por el MDMA. Los datos mostrados indican que el MDMA es igual de neurotóxico cuando se administra en la adolescencia temprana (PND 33-36) o tardía (PND 54-57), lo que indica periodos de igual vulnerabilidad durante el desarrollo. Además, el hecho de que la administración repetida de MDMA inhiba marcadores de la vía apoptótica en el hipocampo de rata sugiere la puesta en marcha de mecanismos contrarregulatorios posiblemente para intentar disminuir los efectos neurotóxicos.



Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: Down-regulation of apoptotic markers



Rubén García-Cabrerizo^{a,b}, M. Julia García-Fuster^{a,b,*}

^a Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

^b Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud-Red de Trastornos Adictivos (RETICS-RTA), ISCIII, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form 5 June 2015

Accepted 5 June 2015

Available online 9 June 2015

Keywords:

Adolescence

MDMA

Hippocampus

Neuroplasticity

FADD

ABSTRACT

While hippocampus is a brain region particularly susceptible to the effects of MDMA, the cellular and molecular changes induced by MDMA are still to be fully elucidated, being the dosage regimen, the species and the developmental stage under study great variables. This study compared the effects of one and four days of MDMA administration following a binge paradigm (3×5 mg/kg, i.p., every 2 h) on inducing hippocampal neurochemical changes in adolescent (PND 37) and young adult (PND 58) rats. The results showed that chronic MDMA caused hippocampal protein deficits in adolescent and young adult rats at different levels: (1) impaired serotonergic (5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} post-synaptic receptors) and GABAergic (GAD2 enzyme) signaling, and (2) decreased structural cytoskeletal neurofilament proteins (NF-H, NF-M and NF-L). Interestingly, these effects were not accompanied by an increase in apoptotic markers. In fact, chronic MDMA inhibited proteins of the apoptotic pathway (i.e., pro-apoptotic FADD, Bax and cytochrome c) leading to an inhibition of cell death markers (i.e., p-JNK1/2, cleavage of PARP-1) and suggesting regulatory mechanisms in response to the neurochemical changes caused by the drug. The data, together with the observed lack of GFAP activation, support the view that chronic MDMA effects, regardless of the rat developmental age, extends beyond neurotransmitter systems to impair other hippocampal structural cell markers. Interestingly, inhibitory changes in proteins from the apoptotic pathway might be taking place to overcome the protein deficits caused by MDMA.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Adolescence is a period of great vulnerability to the neurochemical effects of specific drugs of abuse (Spear, 2007), even though some reports agree that during adolescence animals are less susceptible than in adulthood to the effects of amphetamines (reviewed at Teixeira-Gomes et al., 2015). Interestingly, the amphetamine derivative 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) is one of the most commonly abused drugs among adolescents and young adults (SAMHSA, 2002). There is a large body of evidence showing that MDMA produces degeneration of 5-hydroxytryptamine (5-HT) nerve endings in multiple brain regions, including hippocampus (HC), in experimental animals and humans (for review, see Green et al., 2003). Remarkably, the 5-HT

system undergoes substantial maturational change during adolescence (Chen et al., 1997), such as differential expression of 5-HT receptors with age (Li et al., 2004), which may contribute to the sensitivity on how adolescents respond to MDMA. In fact, the literature supports the notion that the long-lasting behavioral and neurochemical effects promoted by MDMA are dependent on the developmental age of drug exposure (see review, Teixeira-Gomes et al., 2015).

The cellular and molecular mechanisms by which MDMA induces neurochemical changes are still to be fully elucidated, being the dosage regimen and the species under study a great variable (Green et al., 2003). Besides MDMA inducing deficits in 5-HT markers, which may or may not reflect neuronal loss or axonal degeneration (Capela et al., 2009; Biezonski and Meyer, 2011), it also induces a broader neuronal damage (see for example the modulation of other gene markers in HC, Weber et al., 2014) suggesting MDMA effects in the brain are complex and deserve further exploration. Especially, the neural adaptations taking place in HC, which is a brain region known to be critical for learning and memory and particularly susceptible to MDMA effects (Steinkellner et al., 2011).

* Corresponding author at: IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain. Tel.: +34 971 259992; fax: +34 971 259501.

E-mail address: j.garcia@uib.es (M.J. García-Fuster).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.06.001>

0161-813X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Therefore, this study is a direct comparison of the neurochemical alterations in HC following the same MDMA dosing regimen at different developmental stages (early adolescence vs. young adulthood). Neurotransmitter systems beyond 5-HT axon terminals, such as 5-HT post-synaptic receptors (i.e., 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) and GABA neuronal markers (i.e., glutamate decarboxylase enzymes, GAD1 and GAD2) were evaluated to corroborate MDMA deficits on neurotransmitter systems. The main goal of the study was to evaluate MDMA effects on structural proteins such as neurofilament (NF) proteins (NF-H, NF-M, and NF-L for high, medium and low molecular weights), known to play a crucial role in neuronal shape organization and function and modulated by drugs of abuse (Beitner-Johnson et al., 1992). Moreover, enolase-2, an enzyme found in mature neurons which is a marker of neuronal damage (Hatfield and McKerman, 1992), and glial fibrillary acidic protein (GFAP), an indicative of brain toxicity shown to be either increased (Green et al., 2003) or unaltered by MDMA in HC (Wang et al., 2004) were also evaluated. Finally, to better understand MDMA effects on structural proteins and given that prior studies reported increased apoptotic cell death markers in cultured hippocampal neurons *in vitro* by MDMA (Capela et al., 2013), the last goal of the study evaluated MDMA effects on cell death markers. In particular, c-Jun N-terminal kinase (p-JNK1/2) which initiates cell death signaling (Dhanasekaran and Reddy, 2008) by regulating proteins from both the extrinsic (i.e., cell fate adaptor Fas-associated death domain, FADD) and intrinsic (i.e., Bax, cytochrome c) apoptotic pathways leading to poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) cleavage (i.e., cell death/plasticity) were evaluated. A preliminary report of a portion of this work was presented at the 27th European College of Neuropsychopharmacology Congress (García-Cabrerizo and García-Fuster, 2014).

2. Materials and methods

2.1. Rats

For this study 35 adolescent male Sprague–Dawley rats were purchased from Charles River (L'Ambresle, France) at weaning (PND 21, $n=18$) or mid-late adolescence (PND 42, $n=17$) (see Teixeira-Gomes et al., 2015 for rat characterization of

developmental stages). Rats were housed with *ad libitum* access to a standard diet and tap water in controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle). Prior to any experimental procedure, rats were habituated to the experimenter by being handled daily for two days. All animal care and experimental procedures were conducted according to standard ethical guidelines (UK Animals, Scientific Procedures, Act, 1986 and European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

2.2. Drug treatment and tissue collection

Rats were weighted prior to any drug treatment (PND 27–29 and PND 48–50, see Fig. 1a) and also daily throughout the whole experiment (PND 33–36 and PND 54–57). Rats were treated following a binge paradigm for 4 consecutive days (3 pulses per day, every 2 h) with either saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.) or MDMA (5 mg/kg, i.p.; kindly provided by 'Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad', Spain). Control rats received saline during all treatment days (PND 33–36 or PND 54–57). Acute MDMA rats received 3 days of saline (PND 33–35 or PND 54–56) and 1 day of MDMA (PND 36 or PND 57; a total of 15 mg/kg of MDMA). Chronic MDMA rats received 4 days of MDMA (PND 33–36 or PND 54–57; a total of 60 mg/kg of MDMA). Doses were chosen based on previous studies in which MDMA was shown to induce changes in brain neurochemistry (Weber et al., 2014) in comparison to higher doses (20 mg/kg or more for several days, for a total of 160 mg/kg) which are required in Sprague–Dawley rats to produce neurotoxic damage (i.e., long-term 5-HT deficits) in several brain regions (see reviewed in Green et al., 2003). Core body temperature was recorded under normal room temperature conditions (22 °C) immediately before the first MDMA or saline injection on PND 33 or PND 54 (baseline temperature) and also daily 30 min after the last MDMA or saline pulse (PND 33–36 or PND 54–57; see Fig. 1a) by a rectal probe connected to a digital thermometer (Compact LCD display thermometer, SA880-1M, RS, Corby, UK). Rats were killed by decapitation without anesthesia 24 h after the last treatment

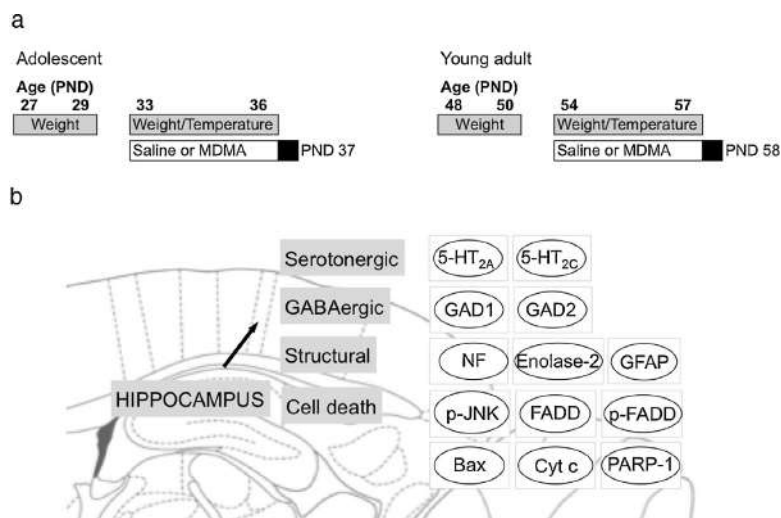


Fig. 1. Experimental design. (a) Adolescent and young adult rats were manipulated (i.e., weight-, rectal temperature) and treated at the indicated post-natal days (PND). Control rats received saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, every 2 h, i.p., for 4 days) while other rats received either 1 day (acute) or 4 days (chronic) of MDMA (3 × 5 mg/kg, every 2 h, i.p.) (PND 33–36 or PND 54–57). Rats were sacrificed 24 h after the last dose (PND 37 or PND 58). (b) Schematic representation of the molecular markers evaluated in HC by Western blot (WB) analysis.

dose (PND 37 or PND 58) (Weber et al., 2014), and their brains removed and processed to allow the investigation of hippocampal markers by western blot (WB) analysis (see Fig. 1b).

2.3. Western blot (WB) analysis

Total homogenate of rat HC was prepared for immunoblotting standard procedures (García-Fuster et al., 2009) and brain proteins (40 µg protein) were resolved by electrophoresis on 10–15% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated with appropriate primary antibody whose vendors and dilution conditions were the following: (1) Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anti-5-HT_{2C} (D-12) (1:500), anti-FADD (H-181) (1:5000), anti-Bax (N-20) (1:1000); (2) Cell Signaling (MA, USA): anti-GAD1 (#5305) (1:1000), anti-GAD2 (#3988) (1:1000), anti-enolase-2 (D20H2) (1:1000), anti-phospho-Ser191 FADD (1:750), anti-PARP-1 (#9542) (1:1000), anti-phospho-Thr183/Tyr185 JNK1/2 (1:2000); (3) BD Biosciences (CA, USA): anti-cytochrome c (1:5000); (4) Neuromics (MN, USA): anti-5HT_{2A} (RA24288) (1:666); (5) Covance (CA, USA): anti-NF-H and M (clone SMI-32) (1:1000); (6) Novocastra-Leica (NCL, UK): anti-GFAP (1:1000); and (7) Sigma-Aldrich (MO, USA): anti-NF-L (N5139) (1:1000), anti-β-actin (clone AC-15) (1:10000), anti-α-tubulin (clone B-5-1-2) (1:2000). The secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse IgG linked to horseradish peroxidase) was incubated for 1 h at room temperature (1:5000 dilution; Cell Signaling). Immunoreactivity of target proteins was detected with ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK) and signal of bound antibody was visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–60 min, which was quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad). For each developmental stage (PND 37 or PND 58), the amount of target proteins in hippocampal brain samples of rats under different treatment groups (acute and chronic MDMA) was compared in the same gel with that of their respective age control rats. Percent changes in immunoreactivity (MDMA-treated rats) with respect to control samples (100%) at each age time-point (PND 37 or PND 58) were calculated for each treated rat in various gels, and the mean value was used as a final estimate. As the content of β-actin was slightly decreased by chronic MDMA in HC of adolescent rats (PND 37: 11 ± 2%, $p < 0.05$), α-tubulin was quantitated and used as a loading control as it was not altered by any treatment conditions (data not shown).

2.4. Data and statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism, Version 6. Results are expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM). Each developmental age (PND 37 and PND 58) was evaluated in separate WB experiments and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (control, acute, chronic) or Student's *t*-test (control vs. chronic) analysis were used to ascertain statistical differences. This was done to avoid signal saturation in WB experiments given the basal differences observed in FADD protein content with age (i.e., increased FADD in early adolescence as compared to later adolescence or adulthood; unpublished data from our group; also see FADD immunoblot results, Fig. 6b). The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of MDMA treatment on body weight and core body temperature in adolescent and young adult rats

As shown in Fig. 2, rat's weight gain did not change throughout the duration of the experimental treatment by

MDMA administration (acute or chronic) when compared to control treated rats as measured by a two-way ANOVA in adolescent (effect of PND: $F_{6,105} = 63.12$, $p < 0.001$; effect of treatment: $F_{2,105} = 0.82$, $p > 0.05$; interaction PND × treatment: $F_{12,105} = 0.22$, $p > 0.05$) or young adult rats (effect of PND: $F_{6,102} = 73.73$, $p < 0.001$; effect of treatment: $F_{2,105} = 11.18$, $p < 0.001$; interaction PND × treatment: $F_{12,105} = 0.65$, $p > 0.05$) (see Fig. 2a).

When analyzing the effect of MDMA on rat's rectal temperature, a two-way ANOVA detected a significant interaction between age (PND) and treatment (control, acute and chronic MDMA) for both adolescent ($F_{6,60} = 4.981$, $p < 0.001$) and young adult ($F_{6,57} = 23.84$, $p < 0.001$) treated rats. Post hoc analysis revealed that acute exposure to MDMA induced hyperthermia in adolescent and young adult rats (see PND 36 and PND 57 for acute MDMA groups and PND 54 for first day of chronic MDMA treatment). However, chronic exposure to MDMA in adolescent and young adult rats showed tolerance (PND 36 and PND 57 for chronic groups, black circles; Fig. 2b) to the acute induced hyperthermia (see Piper et al., 2005 for similar results; see Green et al., 2003 for revision).

3.2. Chronic MDMA induces hippocampal neurochemical changes in adolescent and young adult rats

3.2.1. Neurotransmitter systems

The effect of MDMA on proteins regulating neurotransmitter systems (i.e., serotonergic and GABAergic, see Fig. 1b) was studied in HC by WB analysis. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors were evaluated as serotonergic markers. Chronic MDMA, but not acute, reduced hippocampal 5-HT_{2A} receptor in adolescent rats (PND 37: $F_{2,15} = 6.06$, $p < 0.05$) (acute MDMA: 36 ± 12% decrease, $p > 0.05$; chronic MDMA: 59 ± 13% decrease, $p < 0.01$) but did not reach statistical significance in young adult rats (PND 58: $F_{2,12} = 0.80$, $p > 0.05$) (acute MDMA: 18 ± 14% decrease; chronic MDMA: 23 ± 11% decrease) (Fig. 3a). Contrarily, chronic MDMA administration had no effect on hippocampal 5-HT_{2C} receptor in adolescent rats (PND 37: $F_{2,15} = 0.37$, $p > 0.05$) (chronic MDMA: 11 ± 22%) but decreased its content in young adult rats (PND 58: $F_{2,14} = 4.04$, $p < 0.05$) (chronic MDMA: 57 ± 7%, $p < 0.05$) (Fig. 3b).

GAD1 and GAD2 enzymes were evaluated as GABAergic markers in the HC as they regulate the conversion of glutamate to GABA and are thought to be involved in synaptic transmission. Acute and chronic treatments with MDMA did not modulate GAD1 in HC of adolescent (PND 37: $F_{2,15} = 0.98$, $p > 0.05$) (acute MDMA: 3 ± 3% decrease; chronic MDMA: 8 ± 2% decrease) or young adult (PND 58: $F_{2,14} = 0.37$, $p > 0.05$) (acute MDMA: 8 ± 7% decrease; chronic MDMA: 13 ± 10% decrease) rats (Fig. 3c). However, chronic, but not acute, treatments with MDMA reduced GAD2 in HC of adolescent (PND 37: $F_{2,15} = 3.61$, $p = 0.05$) (24 ± 6%, $p < 0.05$) and young adult (PND 58: $F_{2,14} = 3.64$, $p = 0.05$) (16 ± 2%, $p < 0.05$) rats (Fig. 3d). These results suggest that chronic MDMA induces, both in adolescent and young adult rats, a neurochemical effect in HC by decreasing the content of serotonergic (i.e., 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C}) and GABAergic (i.e., GAD2) neurotransmitter markers.

3.2.2. Structural proteins

The effect of MDMA on structural proteins (see Fig. 1b) was studied in HC by WB analysis. NF proteins (NF-H, NF-M, and NF-L for high, medium and low molecular weights) play a crucial role in neuronal shape organization and function and were therefore evaluated as neuronal cytoskeleton markers. One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for NF proteins in HC of adolescent (PND 37: NF-H, $F_{2,15} = 3.49$, $p = 0.05$; NF-M, $F_{2,15} = 4.52$, $p < 0.05$; NF-L, $F_{2,15} = 2.19$, $p > 0.05$) and young adult (PND 58: NF-H, $F_{2,14} = 2.63$, $p > 0.05$; NF-M, $F_{2,14} = 4.69$, $p < 0.05$; NF-L, $F_{2,14} = 10.20$, $p < 0.01$) rats. In particular, chronic MDMA reduced the content of all NF proteins in HC of

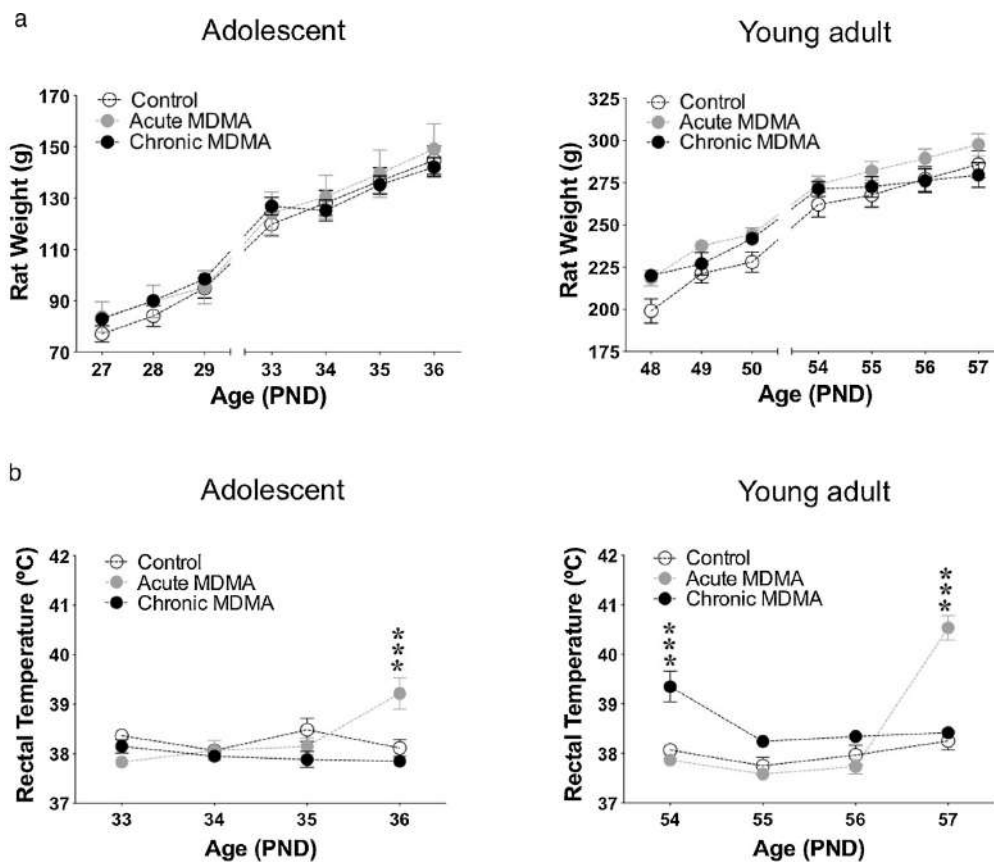


Fig. 2. Effect of MDMA treatment on rat body weight (a) and rectal temperature (b) in adolescent and young adult rats. (a) Rat weight (g) was similar for all experimental groups prior to any drug treatment (PND 27–29 or PND 48–50) and following MDMA administration (PND 33–36 or PND 54–57). (b) Acute MDMA induced the expected increase in body temperature (PND 36 and PND 57) while chronic MDMA led to tachyphylaxis to the hyperthermic response. Two-way ANOVA detected a significant interaction between age (PND) and treatment (control, acute and chronic MDMA) for both adolescent ($F_{6,60} = 4.981$, $p < 0.001$) and young adult ($F_{6,57} = 23.84$, $p < 0.001$) treated rats. *** $p < 0.001$ when compared with the corresponding age-control group.

adolescent (PND 37) (NF-H: $31 \pm 9\%$, $p < 0.05$; NF-M: $45 \pm 5\%$, $p < 0.05$; NF-L: $12 \pm 3\%$, $p < 0.05$, Student's *t*-test when compared to control group) and young adult (PND 58) (NF-H: $24 \pm 3\%$, $p < 0.05$, Student's *t*-test when compared to control group; NF-M: $34 \pm 6\%$, $p < 0.05$; NF-L: $12 \pm 1\%$, $p < 0.01$) rats (Fig. 4a–d). However, acute MDMA only reduced NF-M ($30 \pm 11\%$, $p < 0.05$) and NF-L ($9 \pm 3\%$, $p < 0.01$) in HC of young adult (PND 58) rats (Fig. 4b–d).

Two other structural proteins were also evaluated, enolase-2 as a neuronal marker, and GFAP as a glial and neurotoxic marker. Remarkably, acute and chronic MDMA did not modulate enolase-2 (Fig. 5a) or GFAP (Fig. 5b) in HC of adolescent (PND 37: enolase-2, $F_{2,15} = 0.94$, $p > 0.05$; GFAP, $F_{2,15} = 0.62$, $p > 0.05$) and young adult (PND 58: enolase-2, $F_{2,14} = 1.50$, $p > 0.05$; GFAP, $F_{2,14} = 1.07$, $p > 0.05$) rats. These results suggest that chronic MDMA induces, both in adolescent and young adult rats, a neurochemical effect in HC by decreasing the content of structural NF proteins independently of GFAP toxicity.

3.3. Chronic MDMA dampens hippocampal pro-apoptotic proteins in adolescent and young adult rats

The effect of MDMA on cell death markers (see Fig. 1b) was studied in HC by WB analysis. As mentioned earlier, p-JNK1/2 plays a critical role in cell death as it can engage the activation of both the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways (Dhanasekaran and

Reddy, 2008). Interestingly, acute and chronic treatments with MDMA did not modulate p-JNK1/2 in HC of adolescent (PND 37: $F_{2,14} = 0.83$, $p > 0.05$) or young adult (PND 58: $F_{2,14} = 2.45$, $p > 0.05$) rats (Fig. 6a). The overall effects observed for p-JNK1/2 are a sum of the effects observed for p-JNK1 and p-JNK2 separately (data not shown). From the extrinsic apoptotic pathway, FADD adaptor forms (i.e., pro-apoptotic FADD; anti-apoptotic p-FADD, and the index of neuroplasticity p-FADD/FADD) were evaluated. Chronic MDMA, but not acute, reduced pro-apoptotic FADD in HC of adolescent (PND 37: $F_{2,15} = 3.80$, $p < 0.05$) ($31 \pm 10\%$, $p < 0.05$) and young adult (PND 58: $F_{2,14} = 2.80$, $p > 0.05$) ($31 \pm 5\%$, $p < 0.05$, Student's *t*-test when compared to control group) rats (Fig. 6b), without altering anti-apoptotic p-FADD content (PND 37: $F_{2,15} = 0.66$, $p > 0.05$; PND 58: $F_{2,14} = 0.17$, $p > 0.05$) (Fig. 6c). The index of neuroplasticity p-FADD/FADD (see Ramos-Miguel et al., 2012) resulted in non-statistically significant increases at both ages (PND 37: $F_{2,15} = 2.05$, $p > 0.05$) (2.19-fold) (PND 58: $F_{2,14} = 1.08$, $p > 0.05$) (1.18-fold). Moreover, two pro-apoptotic markers from the intrinsic apoptotic pathway (Bax, cytochrome c) were also decreased by chronic MDMA administration: Bax (PND 37: $F_{2,15} = 5.24$, $p < 0.05$) ($26 \pm 4\%$, $p < 0.05$) (PND 58: $F_{2,14} = 3.04$, $p > 0.05$) ($16 \pm 2\%$, $p < 0.05$, Student's *t*-test when compared to control group; Fig. 6d) and cytochrome c (PND 37: $F_{2,13} = 17.57$, $p < 0.001$) ($42 \pm 2\%$, $p < 0.001$) (PND 58: $F_{2,14} = 3.77$, $p < 0.05$) ($20 \pm 3\%$, $p < 0.05$; Fig. 6e). The fragment/PARP-1 ratio (i.e., a hallmark of apoptosis and/or altered

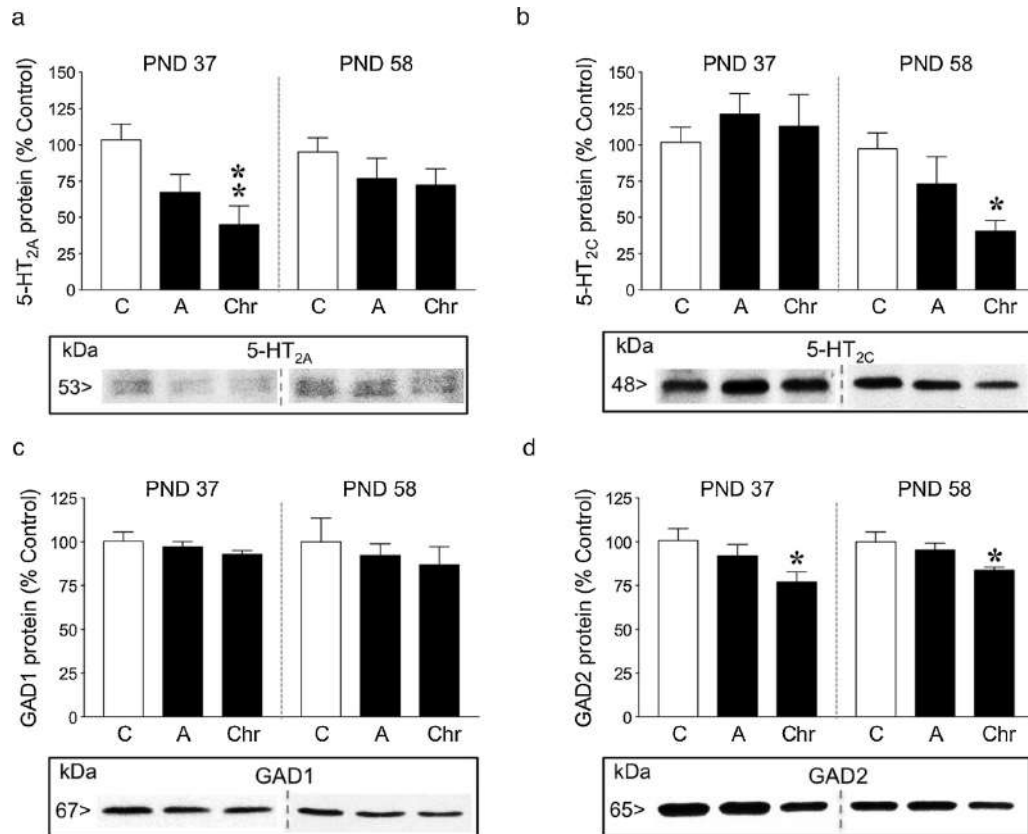


Fig. 3. Acute and chronic effects of MDMA on (a) 5-HT_{2A}, (b) 5-HT_{2C}, (c) GAD1 and (d) GAD2 protein content in rat HC of adolescent (PND 37) and young adult (PND 58) rats. Groups of treatment: control (C, $n = 6$), acute MDMA (A, $n = 6$), chronic MDMA (Chr, $n = 6-5$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of control (C)-treated rats for each age of study (PND 37 or PND 58). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for 5-HT_{2A} (PND 37: $F_{2,15} = 6.06$, $p < 0.05$), 5-HT_{2C} (PND 58: $F_{2,14} = 4.04$, $p < 0.05$) and GAD2 (PND 37: $F_{2,15} = 3.61$, $p = 0.05$; PND 58: $F_{2,14} = 3.64$, $p = 0.05$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the corresponding age-control group (ANOVA followed by Dunnett's test). Bottom panels: representative immunoblots depicting labeling of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, GAD1 and GAD2 are shown for each set of experiments.

plasticity), which is calculated dividing the immunodensity of the cleaved fragment band (85 kDa) by its native form (116 kDa) for each rat, was altered by MDMA (PND 37: $F_{2,11} = 2.66$, $p > 0.05$; PND 58: $F_{2,14} = 21.01$, $p < 0.001$). Remarkably, the fragment/PARP-1 ratio was decreased by chronic MDMA at PND 37 (0.44-fold, $p < 0.05$, Student's t -test when compared to control group) and by acute and chronic MDMA at PND 58 (acute: 0.53-fold, $p < 0.001$; chronic: 0.51-fold, $p < 0.001$; Fig. 6f). These results suggest that chronic MDMA induces, both in adolescent and young adult rats, a neurochemical effect in HC by inhibiting apoptotic markers (i.e., pro-apoptotic FADD, Bax and cytochrome c, as well as decreased cleavage of PARP-1).

4. Discussion

Taken together the results suggest that chronic MDMA induces neurochemical changes in HC of both adolescent and young adult rats at different biochemical levels (i.e., neurotransmitter systems and NF structural proteins) while inhibiting the apoptotic cell death machinery possibly as an adaptive mechanism to the drug induced-deficits.

The current results suggest a role for 5-HT_{2A} receptors in the neurochemical effects mediated by chronic MDMA in HC of adolescent rats while associates 5-HT_{2C} receptors with its effects in young adult rats. Little is known about MDMA effects on post-synaptic 5-HT receptors (i.e., 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) in rat brain. For

example, chronic MDMA induced a transient down-regulation of 5-HT_{2A} receptors in several brain regions including HC (Scheffel et al., 1992) and cortex (Reneman et al., 2002), while another study found hippocampal 5-HT_{2A} unaltered by MDMA (Yau et al., 1997). More recently, chronic MDMA reduced 5-HT_{2A} receptor mRNA in cortex while increased 5-HT_{2C} receptor in cortex and hypothalamus (Kindlundh-Högberg et al., 2006). Similarly, acute MDMA decreased 5-HT_{2C} mRNA levels in specific hippocampal subfields (Yau et al., 1997) while chronic MDMA increased 5-HT_{2C} expression in CA3 pyramidal neurons (Yau et al., 1994). As mentioned earlier, the 5-HT system is known to undergo substantial development during adolescence (Chen et al., 1997) such as 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor expression patterns in brain change in a regionally specific manner with age (Li et al., 2004). The functional difference between these receptor subtypes, together with the fact that 5-HT_{2C} receptors are present at higher densities than 5-HT_{2A} in adult HC (reviewed in Berumen et al., 2012) could contribute to the differential results observed for adolescent and young adult rats in this study. There is little evidence that MDMA produces deficits in other neurotransmitter systems in rat beyond the serotonergic system. For instance, chronic MDMA in HC reduced not only 5-HT but also GABA levels 7 days after last drug injection (Perrine et al., 2010), damaged GABAergic terminals (Armstrong and Noguchi, 2004), and decreased the number of parvalbumin-positive GABA cells in the DG (Anneken et al., 2013).

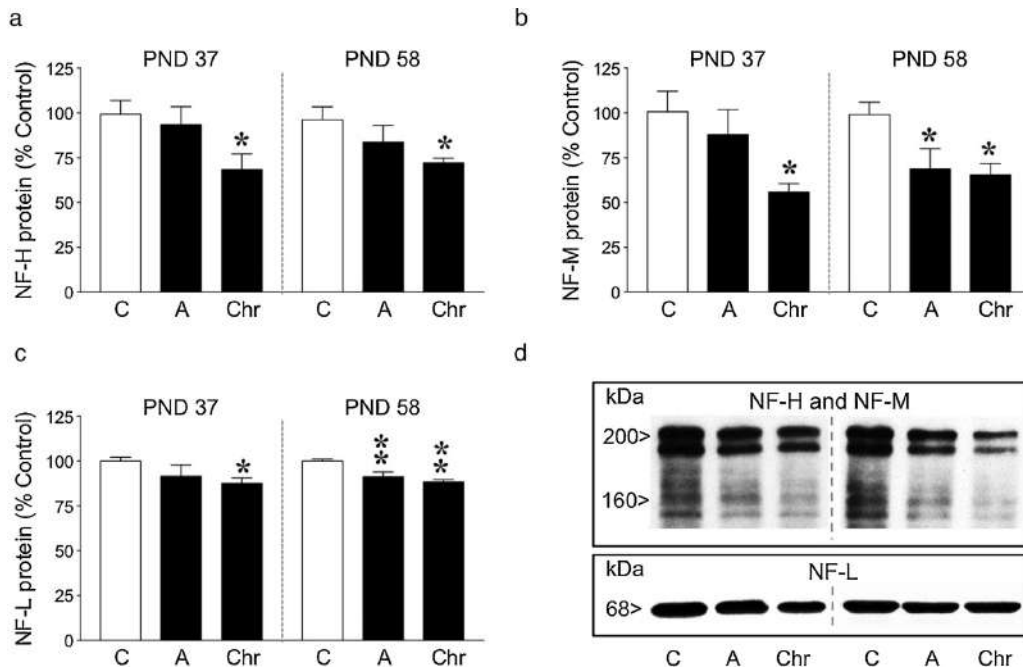


Fig. 4. Acute and chronic effects of MDMA on (a) NF-H, (b) NF-M, and (c) NF-L protein content in rat HC of adolescent (PND 37) and young adult (PND 58) rats. Groups of treatment: control (C, $n = 6$), acute MDMA (A, $n = 6$), chronic MDMA (Chr, $n = 6-5$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of control (C)-treated rats for each age of study (PND 37 or PND 58). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for NF-H (PND 37: $F_{2,15} = 3.49$, $p = 0.05$), NF-M (PND 37: $F_{2,15} = 4.52$, $p < 0.05$; PND 58: $F_{2,14} = 4.69$, $p < 0.05$) and NF-L (PND 58: $F_{2,14} = 10.20$, $p < 0.01$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the corresponding age-control group (ANOVA followed by Dunnett's test). Student's t -test detected significant differences (at least * $p < 0.05$) between chronic MDMA and control groups for NF-H (PND 58) and NF-L (PND 37). (d) Representative immunoblots depicting labeling of NF-H and NF-M as well as NF-L are shown for each set of experiments.

Interestingly, in the present study, the GABAergic neuronal marker GAD2 is shown to be reduced by chronic MDMA in HC of both adolescent and young adult rats, suggesting and confirming together with the observed decreases in 5-HT post-synaptic receptors (5-HT_{2A} and 5-HT_{2C}), that this binge paradigm of repeated treatment with MDMA decreases neurotransmitter neuronal markers.

Besides MDMA producing deficits in neurotransmitter markers, the cellular and molecular changes induced by MDMA need to be

elucidated (Green et al., 2003), especially in a brain region particularly vulnerable to MDMA effects and critical for learning and memory such as HC (Steinkellner et al., 2011). In this regard, NF proteins are intermediate filaments that compose the cytoskeleton in mature neurons and provide integrity and associated functions (e.g., axonal transport, axonal plasticity and neuronal morphology) (e.g., Hoffman and Lasek, 1975; Lee and Cleveland, 1996). A number of studies had examined drug-induced effects on NF proteins in brain areas relevant to drug reward. For

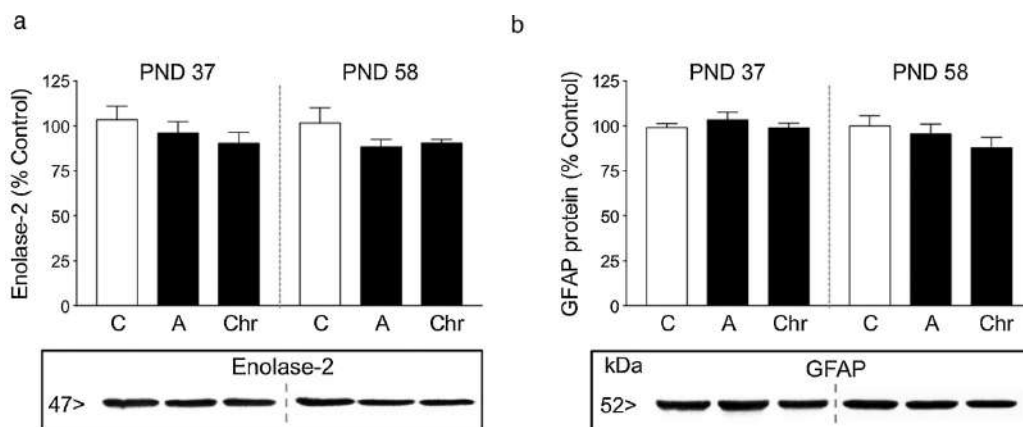


Fig. 5. Acute and chronic effects of MDMA on (a) enolase-2 and (b) GFAP protein content in rat HC of adolescent (PND 37) and young adult (PND 58) rats. Groups of treatment: control (C, $n = 6$), acute MDMA (A, $n = 6$), chronic MDMA (Chr, $n = 6-5$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of control (C)-treated rats for each age of study (PND 37 or PND 58). One-way ANOVA did not detect significant differences between the groups of treatments. Bottom panels: representative immunoblots depicting labeling of enolase-2 and GFAP are shown for each set of experiments.

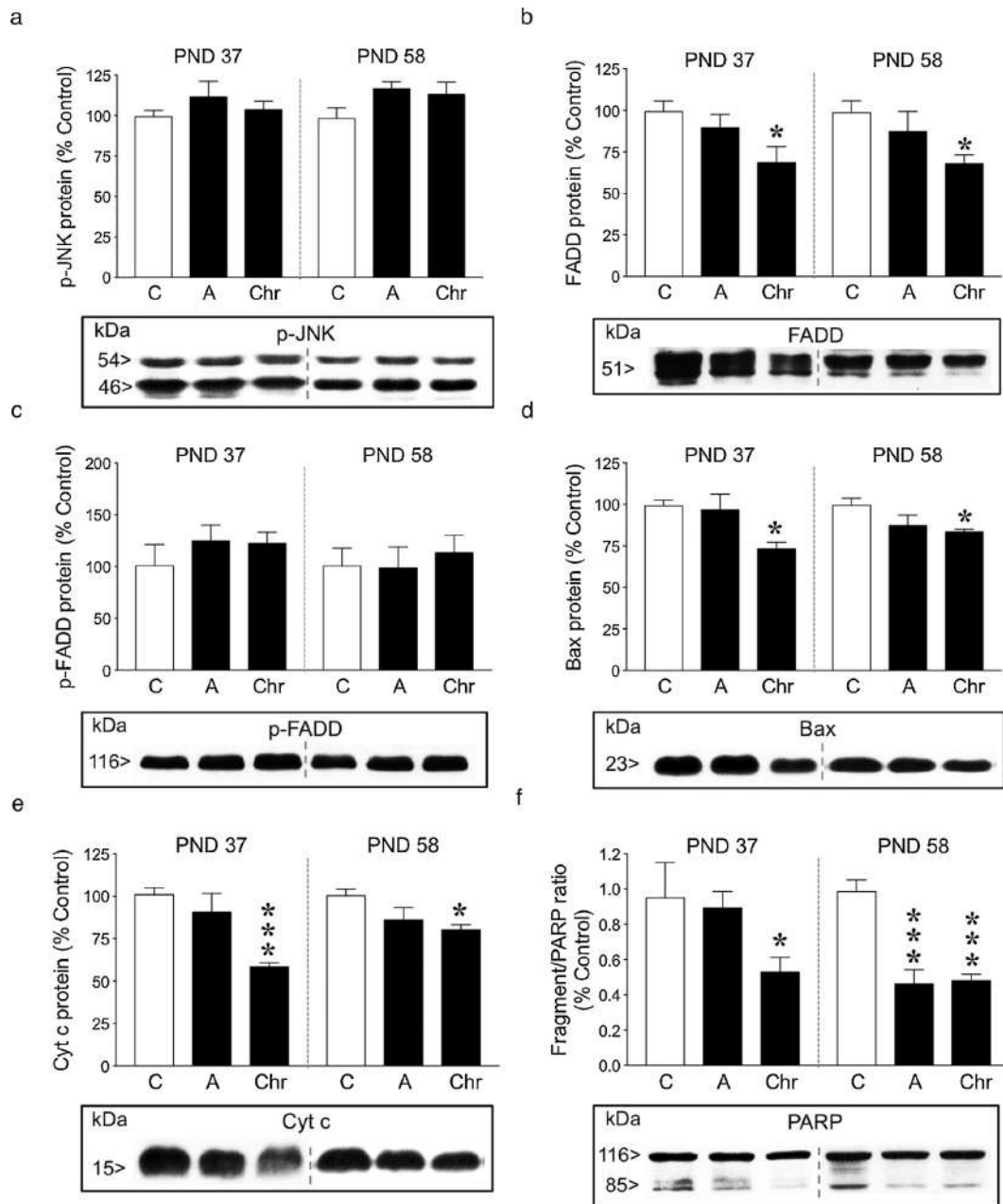


Fig. 6. Acute and chronic effects of MDMA on (a) p-JNK1/2, (b) FADD, (c) p-FADD, (d) Bax, (e) cytochrome c (Cyt c) and (e) fragment/PARP-1 ratio (85 kDa cleaved fragment divided by 116 kDa native PARP-1) protein content in rat HC of adolescent (PND 37) and young adult (PND 58) rats. Groups of treatment: control (C, $n = 6$), acute MDMA (A, $n = 6$), chronic MDMA (Chr, $n = 6-5$). Columns are means \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of control (C)-treated rats for each age of study (PND 37 or PND 58). One-way ANOVA detected significant differences between the groups of treatments for FADD (PND 37: $F_{2,15} = 3.80$, $p < 0.05$), Bax (PND 37: $F_{2,15} = 5.24$, $p < 0.05$), cytochrome c (PND 37: $F_{2,13} = 17.57$, $p < 0.001$; PND 58: $F_{2,14} = 3.77$, $p < 0.05$) and fragment/PARP-1 ratio (PND 58: $F_{2,14} = 21.01$, $p < 0.001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when compared with the corresponding age-control group (ANOVA followed by Dunnett's test). Student's t -test detected significant differences (at least * $p < 0.05$) between chronic MDMA and control groups for FADD (PND 58), Bax (PND 58) and fragment/PARP-1 ratio (PND 37). Bottom panels: representative immunoblots depicting labeling of p-JNK1/2 (p-JNK1: 54 kDa, p-JNK2: 46 kDa), FADD, p-FADD, Bax, cytochrome c and PARP-1 (native PARP-1: 116 kDa and fragment: 85 kDa) are shown for each set of experiments.

example, chronic administration of either morphine or cocaine decreased the levels of NF-L, NF-M and NF-H in rat ventral tegmental area (Beitner-Johnson et al., 1992). Seven days after methamphetamine administration NF-L was reduced in mice striatum (Sanchez et al., 2003). Moreover, chronic nicotine treatment decreased NF-M and NF-H immunoreactivity in rat

brain (Bunnemann et al., 2000). Interestingly, marked reductions in total NF proteins were observed in the prefrontal cortex of chronic opioid addicts (García-Sevilla et al., 1997; Ferrer-Alcón et al., 2000). However, to the best of our knowledge, this is the first study to examine MDMA effects on NF proteins in rat brain, and in particular in HC. Similarly to the effects already described for other

drugs of abuse, the present results showed decreased NF protein levels (NF-H, NF-M and NF-L) in HC in response to chronic MDMA, giving further evidence for a common substrate following an addictive drug exposure in different brain regions (see also [Beitner-Johnson et al., 1992](#)). Interestingly, acute MDMA also decreased NF proteins (NF-M and NF-L) but only in HC of young adult (PND 58) rats, in line with previous reports showing that adolescent animals are less susceptible than adults to the neurochemical changes induced by MDMA (see review, [Teixeira-Gomes et al., 2015](#)), as observed in the current experiment where a chronic treatment was needed to promote the observed neurochemical changes in adolescent rats. The difference observed in the magnitude of change caused by MDMA for NF-H (up to 31%) and NF-M (up to 45%) as compared to NF-L (up to 12%) may relate to differences in assembly states and ratios of NF subunits that could be regulated by the local concentration and phosphorylation of individual subunits. While the triplet proteins are co-assembled in vivo, NF-L appears to be an indispensable polypeptide for the formation of these intermediate filaments ([Lee et al., 1987](#)). Distinctive ratios of the three proteins are found in different tissues and their expressions, which are not fixed, vary during growth and differentiation ([Nixon and Shea, 1992](#)). Moreover, all NF polypeptides are phosphorylated in vivo in a proportion relative to their mass, which determines important biochemical properties of each subunit ([Julien and Mushynski, 1998](#)). For example, the phosphorylation of NF-H appears to be a relevant mechanism in the induction of cross-bridges between NF, which could be essential for the maintenance of the neuronal cytoskeletal structure ([Shaw et al., 1986](#)). Therefore, MDMA might be differentially affecting this complex hetero-polymeric structure as well as the dynamically changing phosphate topography of NF proteins in HC of adolescent and young adult rats. Interestingly, the regulation of NF proteins by MDMA could play a role in modifying neuronal morphology such as the ability to reorganize patterns of synaptic connectivity (i.e., morphology of dendrites and dendritic spines) in brain regions altered following repeated exposure to psychostimulants ([Robinson and Kolb, 1999](#)). In fact, a binge administration of MDMA reduced spine density in CA1 region of HC in adolescent rats ([Abad et al., 2014](#)). Moreover, changes in cytoskeletal proteins may be part of the mechanism participating in drug-induced neurotransmitter changes. In fact, eliminating NF proteins from the CNS profoundly disrupted synaptic plasticity without altering the structural integrity of synapses, suggesting additional roles for NF proteins beyond static structural support of axon caliber, and therefore proposing NF proteins as integral components of synapses and as modulators of in vivo neurotransmission ([Yuan et al., 2015](#)).

Remarkably, no other structural proteins analyzed (i.e., enolase-2 and GFAP) were altered by MDMA treatments. The content of enolase-2, an enzyme found in mature neurons which is a marker of neuronal damage ([Hatfield and McKerman, 1992](#)), was not altered by MDMA exposure in HC of adolescent and young adult rats. There is no previous data on MDMA effects on this marker, yet, similar negative results were observed in cortical samples of cocaine addicts ([Álvaro-Bartolomé and García-Sevilla, 2013](#)). Astrocyte hypertrophy can occur as a result of neuronal injury leading to increases in GFAP expression. Several studies have shown increased GFAP content following MDMA administration in mice and rats ([Green et al., 2003](#)). However, and similar to the current results, MDMA-pretreated rats which showed the expected impaired in serotonergic function did not report changes in hippocampal GFAP ([Wang et al., 2004](#)). An absence of glial activation suggests that the use of indirect methods (i.e., relied on quantifying protein expression) for detecting selective neurotoxicity may have limitations and therefore proposes that the current paradigm of chronic MDMA administration (low dose of MDMA,

one point of analysis at 24 h) induces neurochemical changes in protein content (e.g., neurotransmitter systems, NF proteins) rather than neurotoxicity (discussed in [Green et al., 2003](#); [Steinkellner et al., 2011](#); [Biezonski and Meyer, 2011](#)) in HC. In any case, the administration of higher doses of MDMA in Sprague-Dawley rats and the evaluation of molecular changes at later time points following injections (e.g., 7 days) where 5-HT deficits are still present ([Green et al., 2003](#)) might allow to observe neural damage.

As disruption of cytoskeletal elements can induce apoptotic cell death (e.g., [Kothakota et al., 1997](#)), the observed decrease in hippocampal NF proteins by chronic MDMA may reflect some form of neural injury (i.e., increased apoptosis). In fact, prior studies reported that MDMA increased apoptotic cell death markers in cultured hippocampal neurons in vitro by the stimulation of post-synaptic 5-HT_{2A} receptors ([Capela et al., 2013](#)). Moreover, in rat HC, a single dose of MDMA increased cell death by TUNEL staining ([Riezzo et al., 2010](#)), while chronic MDMA increased pro-apoptotic Bax and decreased anti-apoptotic Bcl-2 mRNA levels as measured 7 days after the last MDMA administration ([Soleimani Asl et al., 2012](#)). On the contrary, and unexpectedly, the present results showed that chronic MDMA did not modulate p-JNK1/2, which initiates cell death signaling by up-regulating pro-apoptotic markers from the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways ([Dhanasekaran and Reddy, 2008](#)). In fact, chronic MDMA reduced the extrinsic pro-apoptotic marker FADD as well as the intrinsic pro-apoptotic markers Bax and cytochrome c in HC of adolescent and young adult rats as measured 24 h after the last MDMA administration. The discrepancy in apoptotic markers regulation (e.g., increased Bax in [Soleimani Asl et al., 2012](#) vs. decreased Bax in the present results) could be related to the dosage regimen of MDMA administered (number of days: 7 days vs. 4 days for the present study; daily MDMA dose: up to 40 mg/kg vs. 15 mg/kg for the present study) and to the time point of analysis following MDMA administration (7 days vs. 24 h for the present study). These methodological differences allowed the evaluation of neurotoxicity markers (increased apoptotic markers; [Soleimani Asl et al., 2012](#)) vs. neurochemical changes (decreased apoptotic protein markers; current study) induced by MDMA administration. Interestingly, the same time point of analysis following MDMA administration (24 h) was shown to modulate several genes (e.g., decreased expression of genes related to axon sheaths and tissue remodeling) in HC ([Weber et al., 2014](#)), which together with the protein deficits observed in the current study, suggest early neurochemical adaptations (mRNA and protein level) in this brain region following MDMA administration. Moreover, the current results showed that chronic MDMA decreased PARP-1 cleavage suggesting the inhibition of apoptotic mechanisms in response to the neurochemical deficits caused by MDMA. In this context, multiple apoptosis-regulatory proteins also mediate a wide range of non-apoptotic functions ([Galluzzi et al., 2012](#)). In particular, the neuroplasticity role of the cell fate adaptor FADD on other drugs of abuse (i.e., opiates, cocaine, cannabinoids) has been greatly studied in rat, mouse and postmortem human brain (see review, [Ramos-Miguel et al., 2012](#)). Moreover, PARP-1 has been recently shown to not only lead cells to death (DNA damage; [Cagnol et al., 2006](#)) but to also enhance behavioral responses to cocaine ([Scobie et al., 2014](#)). Moreover, the present results showed decreases in 5-HT_{2A} receptors following chronic MDMA and therefore one would expect decreases in the apoptotic signals mediated by this receptor ([Capela et al., 2013](#)). Interestingly, the reduction of NF proteins did not seem to depend on loss of neurons, since there was no activation of enolase-2 or GFAP and apoptosis was down-regulated and therefore suggesting either the induction of neural plasticity or repair mechanisms to a prior drug insult.

5. Conclusions

The results from this study, together with the lack of GFAP activation, support the view that chronic MDMA effects, regardless of the rat developmental stage, extend beyond 5-HT axon terminals to impair other hippocampal cell markers (i.e., GABAergic system, and NF proteins). Interestingly, inhibitory changes in proteins from the apoptotic pathway might be taking place to overcome the protein deficits caused by MDMA.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

This study was supported by project 2012/011 from Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad) and by Fundación Alicia Koplowitz to MJG-F. The study was also funded by RETICS-RTA (RD12/0028/0011; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER). The authors would like to thank Antonio Crespo for skillful technical assistance. MJG-F is a 'Ramón y Cajal' Researcher (MINECO-UIB).

References

- Abad, S., Fole, A., del Olmo, N., Pubill, D., Pallàs, M., Junyent, F., Camarasa, J., Camins, A., Escubedo, E., 2014. MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density. *Psychopharmacology (Berl)* 23, 863–874.
- Álvarez-Bartolomé, M., García-Sevilla, J.A., 2013. Dysregulation of cannabinoid CB1 receptor and associated signaling networks in brains of cocaine addicts and cocaine-treated rodents. *Neuroscience* 247, 294–308.
- Anneken, J.H., Cunningham, J.L., Collins, S.A., Yamamoto, B.K., Gudelsky, G.A., 2013. MDMA increases glutamate release and reduces parvalbumin-positive GABAergic cells in the dorsal hippocampus of the rat: role of cyclooxygenase. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 58–65.
- Armstrong, B.D., Noguchi, K.K., 2004. The neurotoxic effects of 3,4-methylene dioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: an in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology* 25, 905–914.
- Beitner-Johnson, D., Guitart, X., Nestler, E.J., 1992. Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 12, 2165–2176.
- Berumen, L.C., Rodríguez, A., Miledi, R., García-Alcocer, G., 2012. Serotonin receptors in the hippocampus. *Sci. World J.* 15 pages, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/823493>.
- Biezonski, D.K., Meyer, J.S., 2011. The nature of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonergic dysfunction: Evidence for and against the neurodegenerative hypothesis. *Curr. Neuropharmacol.* 9, 84–90.
- Bunemann, B., Terron, A., Zantedeschi, V., Pich, E.M., Chiamulera, C., 2000. Chronic nicotine treatment decreases neurofilament immunoreactivity in the rat ventral tegmental area. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 249–253.
- Cagnol, S., Van Obberghen-Schilling, E., Chambard, J.C., 2006. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 11, 337–346.
- Capela, J.P., Carmo, H., Remião, F., Bastos, M.L., Meisel, A., Carvalho, F., 2009. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. *Mol. Neurobiol.* 39, 210–271.
- Capela, J.P., de Costa Araújo, S., Costa, V.M., Ruscher, K., Fernandes, E., Bastos, M., de, L., Dirnagl, U., Meisel, A., Carvalho, F., 2013. The neurotoxicity of hallucinogenic amphetamines in primary cultures of hippocampal neurons. *Neurotoxicology* 34, 254–263.
- Chen, J.C., Turiak, G., Galler, J., Volicic, L., 1997. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 257–263.
- Dhanasekaran, D.N., Reddy, E.P., 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251.
- Ferrer-Alcón, M., García-Sevilla, J.A., Jaquet, P.E., La Harpe, R., Riederer, B.M., Walzer, C., Guimón, J., 2000. Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J. Neurosci. Res.* 61, 338–349.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., Kroemer, G., 2012. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep.* 13, 322–330.
- García-Cabrerizo, R., García-Fuster, M.J., 2014. Acute and chronic effects of MDMA on hippocampal cell fate markers in adolescent and adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24 (Suppl. 2), S682.
- García-Fuster, M.J., Clinton, S.M., Watson, S.J., Akil, H., 2009. Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 34, 1123–1134.
- García-Sevilla, J.A., Ventayol, P., Busquets, X., La Harpe, R., Walzer, C., Guimón, J., 1997. Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *Neuro Rep.* 8, 1561–1570.
- Green, A.R., Mehan, A.O., Elliott, J.M., O'Shea, E., Colado, M.I., 2003. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* 55, 463–508.
- Hatfield, R.H., McKerman, R.M., 1992. CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. *Brain Res.* 577, 249–252.
- Hoffman, P.N., Lasek, R.J., 1975. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J. Cell Biol.* 66, 351–366.
- Julien, J.P., Mushynski, W.E., 1998. Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucl. Acid Res.* 12, 1–23.
- Kindlundh-Högberg, A.M.S., Svenningsson, P., Schiöth, H.B., 2006. Quantitative mapping shows that serotonin rather than dopamine receptor mRNA expressions are affected after repeated intermittent administration of MDMA in rat brain. *Neuropharmacology* 51, 838–847.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kothe, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294–298.
- Lee, V.M., Carden, M.J., Schlaepfer, W.W., Trojanowski, J.Q., 1987. Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. *J. Neurosci.* 7, 3474–3488.
- Lee, M.K., Cleveland, D.W., 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 187–217.
- Li, Q., Nakadate, K., Tanaka-Nakadate, S., Nakatsuka, D., Cui, Y., Watanabe, Y., 2004. Unique expression patterns of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *J. Comp. Neurol.* 469, 128–140.
- Nixon, R.A., Shea, T.B., 1992. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental study. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 22, 81–91.
- Perrine, S.A., Ghodoussi, F., Michaels, M.S., Hyde, E.M., Kuhn, D.M., Galloway, M.P., 2010. MDMA administration decreases serotonin but not N-acetylsparatate in the rat brain. *Neurotoxicology* 31, 654–661.
- Piper, B.J., Fraiman, J.B., Meyer, J.S., 2005. Repeated MDMA ("ecstasy") exposure in adolescent male rats alters temperature regulation, spontaneous motor activity, attention, and serotonin transporter binding. *Dev. Psychobiol.* 47, 145–157.
- Ramos-Miguel, A., Álvarez-Bartolomé, M., García-Fuster, M.J., García-Sevilla, J.A., 2012. Role of multifunctional FADD (Fas-associated death domain) adaptor in drug addiction. In: David, B. (Ed.), *Addictions - From Pathophysiology to Treatment*. InTech Open, ISBN: 978-953-51-0783-5 pp. 201–226.
- Reneman, L., Ender, E., de Bruin, K., et al., 2002. The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT2A receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* 26, 387–396.
- Riezzo, I., Cerretani, D., Fiore, C., Bello, S., Centinín, F., D'Errico, S., Fiaschi, A.I., Giorgi, G., Neri, M., Pomara, C., Turillazzi, E., Fineschi, V., 2010. Enzymatic-nonenzymatic cellular antioxidant defense systems response and immunohistochemical detection of MDMA, VMAT2, HSP70, and apoptosis as biomarkers for MDMA (Ecstasy) neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 88, 905–916.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 1999. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1598–1604.
- SAMHSA, 2002. Results from the 2001 national household survey on drug abuse: volume 1. In: NHSDA (Eds.), *Summary of National Findings. Series H-17*. Office of Applied Studies, Rockville, MD.
- Sanchez, V., Zeini, M., Camarero, J., O'Shea, E., Bosca, L., Green, A.R., Colado, M.I., 2003. The nNOS inhibitor, AR-R17477AR, prevents the loss of NF68 immunoreactivity induced by methamphetamine in the mouse striatum. *J. Neurochem.* 85, 515–524.
- Scheffel, U., Lever, J.R., Stathis, M., Ricaurte, G.A., 1992. Repeated administration of MDMA causes transient down-regulation of serotonin 5-HT2 receptors. *Neuropharmacology* 31, 881–893.
- Scobie, K.N., Damez-Werno, D., Sun, H., Shao, N., Gancarz, A., Panganiban, C.H., Dias, C., Koo, J., Caiafa, P., Kaufman, L., Neve, R.L., Dietz, D.M., Shen, L., Nestler, E.J., 2014. Essential role of poly(ADP-ribosylation) in cocaine action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2005–2010.

- Shaw, G., Osborn, M., Weber, K., 1986. Reactivity of a panel of neurofilament antibodies on phosphorylated and dephosphorylated neurofilaments. *Eur. J. Cell Biol.* 42, 1–9.
- Soleimani Asl, S., Farhadi, M.H., Moosavizadeh, K., Samadi Kuchak Saraei, A., Soleimani, M., Jamei, J.B., Joghataei, M.T., Samzadeh-Kermani, A., Hashemi-Nasl, H., Mehdizadeh, M., 2012. Evaluation of Bcl-2 family gene expression in hippocampus of 3,4-methylenedioxymethamphetamine treated rats. *Cell J.* 13, 275–280.
- Spear, L.P., 2007. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 1–9.
- Steinkellner, T., Freissmuth, M., Sitte, H.H., Montgomery, T., 2011. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and *D*-amphetamine. *Biol. Chem.* 392, 103–115.
- Teixeira-Gomes, A., Costa, V.M., Feio-Azevedo, R., Bastos, M.L., Carvalho, F., Capela, J.P., 2015. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int. J. Dev. Neurosci.* 41, 44–62.
- Wang, X., Baumann, M.H., Xu, H., Rothman, R.B., 2004. 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse* 53, 240–248.
- Weber, G.F., Johnson, B.N., Yamamoto, B.K., Gudelsky, G.A., 2014. Effects of stress and MDMA on hippocampal gene expression. *Biomed. Res. Int.* 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/141396>.
- Yau, J.L.W., Kelly, P.A., Sharkey, J., Seckl, J.R., 1994. Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration decreases glucocorticoid and mineralocorticoid receptor, but increases 5-hydroxytryptamine 1C receptor gene expression in the rat hippocampus. *Neuroscience* 61, 31–40.
- Yau, J.L.W., Noble, J., Seckl, J.R., 1997. Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience* 78, 111–121.
- Yuan, A., Sershen, H., Veeranna, Basavarajappa, B.S., Kumar, A., Hashim, A., Berg, M., Lee, J.H., Sato, Y., Rao, M.V., Mohan, P.S., Dyakin, V., Julien, J.P., Lee, V.M., Nixon, R.A., 2015. Neurofilament subunits are integral components of synapses and modulate neurotransmission and behavior in vivo. *Mol. Psychiatry*, <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2015.45>.

ARTÍCULO IV

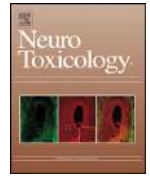
Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

NeuroToxicology, 2016; 56: 29-39

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo determinar si existía un período de mayor vulnerabilidad durante la adolescencia en el cual la administración de diversos derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y D-anfetamina) inducía una mayor neurotoxicidad. Los resultados más relevantes demostraron que los efectos nocivos inducidos sobre el hipocampo por las anfetaminas dependen de la edad de administración. En concreto, la administración repetida de MDMA y metanfetamina inhibieron la proliferación (Ki-67) y la supervivencia celular (BrdU) en el hipocampo durante la etapa más tardía de la adolescencia evaluada (PND 54-57). Además, se observó una regulación en paralelo del marcador neurotrófico (forma madura de BDNF) con la supervivencia celular y los niveles del receptor 5-HT_{2c} tras la administración de las diferentes anfetaminas. Los datos mostrados, a diferencia de los efectos observados para el psicoestimulante cocaína (véanse Artículos I y II), y a favor de datos previos de la literatura, ponen de manifiesto un cierto grado de insensibilidad a los efectos negativos de estos derivados anfetamínicos durante la adolescencia más temprana y una mayor vulnerabilidad durante la adolescencia más tardía (ventana de vulnerabilidad, PND 54-57) induciendo daños a nivel del hipocampo.



Full length article

Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages



Rubén García-Cabrerizo, M. Julia García-Fuster*

Neurobiology of Drug Abuse Group, IUNICS/IdISPa, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2016

Received in revised form 28 June 2016

Accepted 28 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

Adolescence

MDMA

Methamphetamine

D-Amphetamine

Hippocampus

Neurogenesis

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effects of amphetamine-like psychostimulant drugs (i.e., MDMA, methamphetamine, D-amphetamine) on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages (i.e., early adolescence vs. young adulthood) to determine if there were periods of vulnerability to drug-induced brain changes. Although adolescence is a period of great vulnerability to the neurochemical effects of specific drugs of abuse, several reports suggest that adult rats are more susceptible than adolescents to the negative effects of these drugs. The main results suggest that the effects of these amphetamine drugs on cell genesis depend on the rat's developmental age, with the young adult period being more sensitive than the early adolescent one. In particular, MDMA and methamphetamine, but not D-amphetamine impaired hippocampal cell genesis (i.e., cell proliferation and cell survival) in young adult rats. These effects were dependent on the accumulative dose administered, as they were only observed with the highest dose tested (12 pulses of 5 mg/kg over 4 days: 60 mg/kg total). The present results extend previous reports on adolescent insensitivity (i.e., better adaptation) to amphetamine-drugs and suggest for young adult rats certain degree of hippocampal damage that may mediate some of the addiction-like behaviors that depend on this brain region. Moreover, the present results, in line with previous data, suggest a possible role for the neuroplasticity marker BDNF and serotonin in regulating cell survival, as mBDNF protein regulation paralleled hippocampal cell survival and 5-HT_{2C}-receptor content in young adult rats treated with these psychostimulant drugs.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Amphetamine-like psychostimulants, including 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and D-amphetamine are widely abused drugs (UNODC, 2014) for their stimulant and euphoric effects. Typical recreational use is often characterized by a binge administration (i.e., repeated frequent administration during a short period of time). In contrast to MDMA, methamphetamine and D-amphetamine are also available under medical prescription and are used in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder, narcolepsy and weight control (reviewed in Steinkellner et al., 2011). As these drugs are commonly abused by adolescents and young adults (SAMHSA, 2002) but are known to affect their brain function and behavior differently, the age of drug exposure will be crucial for the neurotoxic outcome (Vorhees et al., 2005; Teixeira-Gomes et al.,

2015). Although adolescence is a period of great vulnerability to the neurochemical effects of specific drugs of abuse (Spear, 2007), several reports suggest, in fact, that adult rats are more susceptible than adolescents to the negative effects of these drugs (Brunell and Spear, 2006; Teixeira-Gomes et al., 2015).

Amphetamine-like psychostimulants interact in the central nervous system with monoamine transporter sites with different affinities: MDMA shows greater affinity for norepinephrine and serotonin transporter over dopamine transporter while methamphetamine and D-amphetamine have more potent actions on norepinephrine and dopamine release than serotonin (reviewed in Teixeira-Gomes et al., 2015). Previous work have ascertained numerous interacting mechanisms and neural consequences that might contribute to the known damage produced by these amphetamine-like psychostimulants (reviewed in Steinkellner et al., 2011; Teixeira-Gomes et al., 2015), such as monoaminergic terminal damage, excitotoxicity, oxidative stress and metabolic compromise, that in the long term could affect mental health and well-being. However, much work still needs to be done to fully elucidate the neurochemical changes induced by these drugs in

* Corresponding author at: IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Spain.

E-mail address: j.garcia@uib.es (M. J. García-Fuster).

precise brain regions, with the dosage regimen and the species under study being major variables (e.g., Green et al., 2003).

In particular, the hippocampus is highly sensitive to drug abuse during the developmental period (e.g., Izenwasser, 2005) as it continues to undergo structural and functional changes throughout adolescence and into adulthood, which are vital for its maturation and neuronal function. Different drugs of abuse, including amphetamines, are known to induce hippocampal toxicity by impairing neurogenesis in adult rats (i.e., diminish cell genesis at different stages of the addictive cycle; reviewed in Canales, 2010; Mandyam and Koob, 2012). Interestingly, only a few studies have evaluated hippocampal cell genesis during adolescence and have proven critical windows of vulnerability to certain drugs such as cocaine (García-Cabrerizo et al., 2015) and alcohol (Crews et al., 2006) as compared to other age periods. Therefore, this study is a direct comparison of the effects of MDMA, methamphetamine and D-amphetamine on cell genesis (i.e., cell proliferation and cell survival) in the hippocampus following the same dosing regimen at different developmental ages (early adolescence vs. young adulthood) to determine if they were periods of vulnerability to drug-induced brain changes. Previous data supports a critical role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and serotonin in the survival and preservation of neurons in the brain (Mattson et al., 2004; Foltran and Diaz, 2016). Thus, the possible regulation of this neuroplasticity marker and that of 5-HT_{2C} receptor, a serotonin receptor subtype present at higher densities in the hippocampus (Berumen et al., 2012) and with a known role in promoting neurogenesis (Klempin et al., 2010), will also be evaluated following the administration of these psychostimulant drugs.

2. Materials and methods

2.1. Rats

Male Sprague-Dawley rats (n = 108; from Charles River, L'Arbresle, France) were purchased at weaning (post-natal day, PND 21, n = 54) or mid-late adolescence (PND 42, n = 54) (see Teixeira-Gomes et al., 2015 for rat characterization of developmental ages). Each

psychostimulant drug treatment (1 or 4 days of MDMA, methamphetamine, D-amphetamine) was performed at different points in time in separate experiments and therefore using different colonies of rats (n = 36 rats per drug; n = 18 per age) from the same vendor. Every drug-treated group was randomly allocated and paired with controls at any given developmental time of study. Rats were housed in standard cages in controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle, lights on at 8:00 a.m.) with ad libitum access to a standard diet and tap water. Prior to any experimental procedure, rats were habituated to the experimenter by being handled daily for two days. All animal care and experimental procedures were comply with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010) and were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

2.2. Drug treatment and tissue collection

As depicted in Fig. 1a, groups of randomly allocated rats from two different developmental ages were pretreated for 3 consecutive days (PND 27–29 or PND 48–50) with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 2 × 50 mg/kg, i.p.; Calbiochem, USA) delivered at 12-h intervals as previously described (García-Fuster et al., 2010; García-Cabrerizo et al., 2015). Then, rats received a binge paradigm (5 mg/kg, every 2–3 h, 3 times per day, i.p.) during 1 (PND 36 or PND 57: 3 pulses, total dose of 15 mg/kg) or 4 consecutive days (PND 33–36 or PND 54–57: 12 pulses, total dose of 60 mg/kg; see Fig. 1a) with the amphetamine derivatives MDMA (kindly provided by 'Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad', Spain), (+)-methamphetamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, MO, USA) or D-amphetamine sulfate (Sigma-Aldrich, MO, USA). As shown in Fig. 1a rats exposed to the 1 day psychostimulant regimen received saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, every 2–3 h, 3 times per day, i.p.) for 3 days followed by one day of amphetamine drug treatment on PND 36 or PND 57. Notably, one rat from the 4 days MDMA treatment group died following the first day of treatment (PND 54).

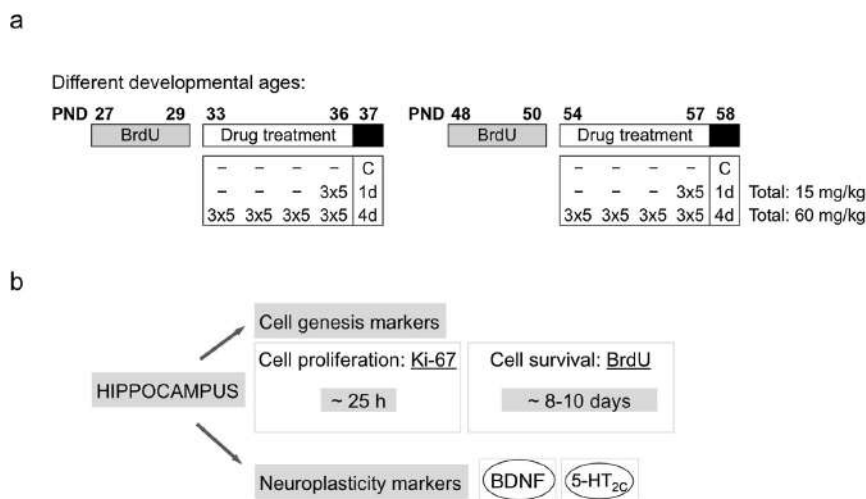


Fig. 1. Experimental design. (a) Adolescent and young adult rats were treated at the indicated post-natal days (PND, n = 36 rats per drug; n = 18 per age; n = 6 per treatment group). Initially, rats were treated with BrdU (2 pulses × 50 mg/kg, i.p., for 3 days). Then, control rats received saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, every 2–3 h, i.p., for 4 days) while other rats received amphetamine-like psychostimulants (3 × 5 mg/kg, every 2–3 h, i.p.) for 1 or 4 days. Rats were sacrificed 24 h after the last dose (PND 37 or PND 58). (b) Schematic representation of the molecular markers evaluated in the hippocampus by immunohistochemistry or western blot analysis.

The comparative individual (5 mg/kg, 3 vs. 12 pulses) and accumulative doses (15 vs. 60 mg/kg) were selected on a mg/kg basis (e.g., Schaefer et al., 2008), so inferences about relative magnitude of effect among drugs could be made. Another possibility would have been to match the doses by initial hyperthermia, although this has proven difficult, as core body temperature did not remain comparable throughout the course of methamphetamine and D-amphetamine treatments (Vorhees et al., 2011). Additionally, doses were chosen based on previous studies in which these amphetamines derivatives were shown to induce changes in brain neurochemistry and/or neurotoxicity in Sprague-Dawley rats (see review, Green et al., 2003; Teixeira-Gomes et al., 2015) and not taking into account the high accumulative dose selection in comparison to human exposure. In any case, based on pharmacokinetic/dynamic data and studies on dose translation from animal to humans (Reagan-Shaw et al., 2008), an approximate four-fold higher dose is required in rats to produce a similar peak blood plasma exposure to that seen in humans (Green et al., 2009), therefore justifying the doses of amphetamine-like drugs used in the present study (i.e. 5 mg/kg per injection) as compared to the typical dose consumed by humans (average of 1–2 mg/kg). Control rats received saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, every 2–3 h, 3 times per day, i.p.) during all treatment days.

Rats were weighted the days of BrdU administration (PND 27–29 or PND 48–50) and throughout drug treatment (PND 33–36 or PND 54–57). All rats (a total of 107) were killed at the appropriate times for each amphetamine-like drug (35–36 rats for each drug paired with controls) by decapitation without anesthesia 24 h after the last treatment dose (PND 37 or PND 58). All the extracted brains were cut sagittally to separate both hemispheres. The left half-brain was quickly frozen in -30°C isopentane and stored at -80°C until further processing. For each animal, 30 μm sections were cryostat cut and slide-mounted throughout the entire hippocampal extent (-1.72 to -6.80 mm from Bregma) and kept at -80°C until cell genesis markers (i.e., Ki-67 for cell proliferation and BrdU for the survival of 8–10 days old cells; García-Fuster et al., 2010) were analyzed by immunohistochemistry (see Fig. 1b). The hippocampus was freshly dissected from the right half-brain, rapidly frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until the neuroplasticity markers BDNF and 5-HT_{2C} receptors (see Fig. 1b) were analyzed by western blot experiments.

2.3. Immunohistochemistry analysis

Ki-67 was used to determine the rate of recent cell proliferation (all dividing cells within a cell cycle time of 25 h; Cameron and McKay, 2001) in hippocampal tissue sections (30 μm) that were post-fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich, USA). Antigen retrieval (10% sodium citrate pH 6.0, 90°C , 1 h) was followed by blocking sections in peroxidase solution (0.3%, 30 min) and bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, USA) containing 1% goat serum (Sigma-Aldrich, USA) and 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA; see García-Fuster et al., 2010; García-Cabrerizo et al., 2015). Sections were then incubated overnight with polyclonal rabbit anti-Ki-67 (1:40000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson, University of Michigan) followed by incubation in biotinylated anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Bound antibody was detected with Avidin/Biotin complex (Vectastain Elite ABC kit; Vectors Laboratories, USA) and the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich, USA).

BrdU is a synthetic thymidine analog incorporated into newly synthesized DNA strands of actively proliferating cells (Wojtowicz and Kee, 2006). Therefore, the age of the BrdU labeled

cells at the time of euthanasia determines the developmental stage of the newly born cell (i.e., proliferation, differentiation, maturation). In our experimental design, pretreatment of rats with BrdU allowed to study drug effects on the survival of 8–10 days old cells. Tissue was post-fixed in 4% PFA for 1 h, rinsed with in-lab prepared phosphate buffered saline (PBS) and washed in 0.3% peroxide (García-Fuster et al., 2010). Sections were then placed in 50% formamide-2X saline sodium citrate (SSC) at 65°C for 2 h, rinsed in 2X SSC and exposed to 2 N HCl at 37°C during 30 min for DNA denaturation. Afterwards they were incubated for 10 min in 0.1 M boric acid at room temperature followed by rinsing in PBS, blocking with BSA and overnight incubation with polyclonal rabbit anti-BrdU (1:20000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson, University of Michigan). Finally, sections were incubated with anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories), followed by Avidin/Biotin complex amplification and DAB reaction for visualization of signal.

All sections were counterstained with cresyl violet (Sigma-Aldrich, USA), dehydrated through graded alcohols, immersed in xylene and coverslipped (Permount[®] mounting medium; Fisher Scientific, USA). The number of immunostained positive cells was evaluated under blinded conditions in every 8th section throughout the extent of the hippocampus (-1.72 to -6.80 mm from Bregma) with a Leica DMR light microscope using a 63 \times objective lens and focusing through the thickness of the section (30 μm). Table 1 summarizes the number of tissue sections as well as the area of the dentate gyrus (mm^2) analyzed for each cell marker (Ki-67, BrdU), at each developmental age (PND 37, PND 58) and treatment group. The number of proliferating (Ki-67+) or surviving (BrdU+) cells in the dentate gyrus was expressed in relation to the overall quantified area (mm^2), which was measured with a densitometer (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, BioRad). This quantification method allows the comparison among groups of treatment with different areas of analysis (García-Cabrerizo et al., 2015), which is particularly relevant when comparing different developmental ages (PND 37 and PND 58) or different cell markers (Ki-67 and BrdU labeling).

2.4. Western blot analysis

Total brain proteins (40 μg) from rat hippocampus homogenates were resolved by electrophoresis on 10–12% SDS-PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and then transferred to nitrocellulose membranes that were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the appropriate primary antibody (García-Cabrerizo and García-Fuster, 2015) whose vendors and dilution conditions were the following: (1) Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anti-BDNF (N-20) (1:2500), anti-5-HT_{2C} (D-12) (1:500); and (2) Sigma-Aldrich (MO, USA): anti- β -actin (clone AC-15) (1:10000), anti- α -tubuline (clone B-5-1-2) (1:2000). The secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse IgG linked to horseradish peroxidase) was incubated for 1 h at room temperature (1:5000 dilution; Cell Signaling). Immunoreactivity of target proteins was detected with ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK) and signal of bound antibody was visualized by exposure to autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–60 min, which was quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad). The amount of target proteins for each psychostimulant treatment group (MDMA, methamphetamine or D-amphetamine) was compared in the same gel with that of its respective control rats for each developmental age (PND 37 or PND 58). The quantification procedure was assessed 3–6 times in different gels (each gel with different brain samples from control and psychostimulant-treated rats). Percent changes in

Table 1Number of sections analyzed and area (mm²) quantified in the dentate gyrus region of the hippocampus for each treatment group. Data are means \pm SEM of n rats per group.

Age	Treatment group	Number of rats	Ki-67		BrdU	
			Sections analyzed	Area (mm ²)	Sections analyzed	Area (mm ²)
PND 37	Control	6	17 \pm 1.1	8.4 \pm 0.5	13 \pm 1.6	6.8 \pm 0.5
	MDMA-1d	6	15 \pm 0.4	8.7 \pm 0.8	15 \pm 1.0	7.2 \pm 0.6
	MDMA-4d	5	15 \pm 0.9	9.2 \pm 0.5	14 \pm 1.2	8.0 \pm 0.6
	Control	6	18 \pm 0.5	10.2 \pm 0.8	15 \pm 0.8	8.0 \pm 0.6
	METH-1d	6	18 \pm 0.4	10.9 \pm 0.4	16 \pm 0.4	8.9 \pm 0.7
	METH-4d	6	18 \pm 0.9	10.1 \pm 0.5	14 \pm 0.5	7.6 \pm 0.4
	Control	6	17 \pm 0.6	10.4 \pm 0.5	15 \pm 0.7	8.4 \pm 0.4
	D-AMPH-1d	6	15 \pm 1.0	8.4 \pm 1.1	14 \pm 0.7	7.6 \pm 0.8
	D-AMPH-4d	6	18 \pm 0.8	10.8 \pm 0.8	15 \pm 0.7	8.3 \pm 0.3
			17 \pm 0.3	9.7 \pm 0.2	14 \pm 0.3	7.9 \pm 0.2
PND 58	Control	6	17 \pm 0.5	9.5 \pm 0.5	15 \pm 1.2	8.0 \pm 0.9
	MDMA-1d	6	17 \pm 1.0	10.8 \pm 0.3	15 \pm 1.2	8.0 \pm 0.8
	MDMA-4d	6	19 \pm 0.6	10.1 \pm 1.1	15 \pm 1.1	9.4 \pm 0.9
	Control	6	18 \pm 0.7	9.6 \pm 0.6	16 \pm 1.0	8.4 \pm 0.8
	METH-1d	6	17 \pm 0.7	10.1 \pm 0.5	11 \pm 1.4	6.4 \pm 0.5
	METH-4d	6	18 \pm 0.8	10.7 \pm 0.5	14 \pm 1.3	8.0 \pm 0.6
	Control	6	18 \pm 0.6	11.1 \pm 0.9	14 \pm 1.1	7.3 \pm 0.8
	D-AMPH-1d	6	16 \pm 1.0	10.9 \pm 1.2	13 \pm 1.1	7.6 \pm 0.8
	D-AMPH-4d	6	14 \pm 2.0	9.7 \pm 1.2	11 \pm 1.2	7.0 \pm 0.6
			17 \pm 0.3	10.3 \pm 0.3	14 \pm 0.4	7.7 \pm 0.3

immunoreactivity with respect to control samples (100%) at each age time-point (PND 37 or PND 58) were calculated for each treated rat in various gels, and the mean value was used as a final estimate. As the content of β -actin was slightly decreased by chronic MDMA in the hippocampus at PND 37 (11 \pm 2%, $p < 0.05$), α -tubulin was evaluated and quantified as a loading control as its content was not altered by any treatment conditions.

2.5. Data and statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism, Version 6. Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Each psychostimulant drug (MDMA, methamphetamine, D-amphetamine) and each developmental age (PND 37 and PND 58) were evaluated separately, as different colonies of rats were used at different points in time for each experiment. The effects of each drug on body weight were evaluated using two-way

repeated measures ANOVAs, in which Treatment (control vs. drug) and Day of Treatment (PND 27–36 or PND 48–57) were treated as independent variables, followed by Bonferroni's multiple comparison tests when appropriate. For the immunohistochemistry and western blot data analysis, two-tail Student's t -tests were used to ascertain statistical differences between groups: PND 37 vs. PND 58 when comparing basal cell genesis at different developmental ages; and control vs. drug treatment for ascertaining percent differences between each drug treatment and its respective PND control group. Finally, as the main effects on cell genesis markers were observed when rats were treated in adulthood with the highest accumulative dose tested (12 pulses of 5 mg/kg over 4 days: 60 mg/kg) of psychostimulant drugs, Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible association between variables. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on body weight at different developmental ages

As shown in Fig. 2a, rat's weight gain did not change throughout the duration of BrdU administration (PND 27–29) and during the experimental treatment with MDMA (see also García-Cabrero and García-Fuster, 2015), methamphetamine or D-amphetamine (1 or 4 days) when compared to control treated rats during adolescence (PND 33–36) as evaluated using two-way repeated measures ANOVAs. However, when these drugs were administered at a later developmental age such as young adulthood (PND 48–50 and PND 54–57), the administration of methamphetamine or D-amphetamine, but not MDMA (see also García-Cabrero and García-Fuster, 2015), reduced rat's weight gain (Fig. 2b) as demonstrated by a Treatment x Day of Treatment interaction (METH: $F_{12,90} = 4.97$, $p < 0.001$; D-AMPH: $F_{12,90} = 11.74$, $p < 0.001$). Post-hoc analysis revealed reduced weight gain during the repeated exposure to 4 days of methamphetamine (PND 57, $p < 0.05$) or D-amphetamine (from PND 55–57, $p < 0.05$) when compared to control treated rats. These results support the previously described anorexigenic role of methamphetamine and D-amphetamine (e.g., Carvalho et al., 2012; Steinkellner

et al., 2011), while extending the findings to show that these effects occurred only in young adult, as compared to adolescent rats, and were dependent on the accumulative dose (i.e., number of pulses) administered.

3.2. Basal hippocampal cell genesis at different developmental ages

Basal hippocampal cell genesis differences were observed between PND 37 and PND 58 when combining and comparing all control groups (C-MDMA, C-METH, C-D-AMPH; Fig. 3). The overall quantification of Ki-67+ and BrdU+ cells by area (mm^2) revealed higher rates of recent cell proliferation (+39%, Fig. 3a) and higher survival of 8–10 days old cells (+45%, Fig. 3b) at the earlier time point in adolescence (PND 37) as compared to young adult (PND 58) rats. These age-related differences in cell genesis were observed for all control groups separately, even though there were significant differences in the number of both Ki-67+ and BrdU+ cells among them (i.e., see individual boxes within Fig. 3). Given these basal differences in cell genesis among supposedly identical treated control groups, from now on and for comparative purposes, the effect of each psychostimulant drug will be compared to its respective PND control group (% change).

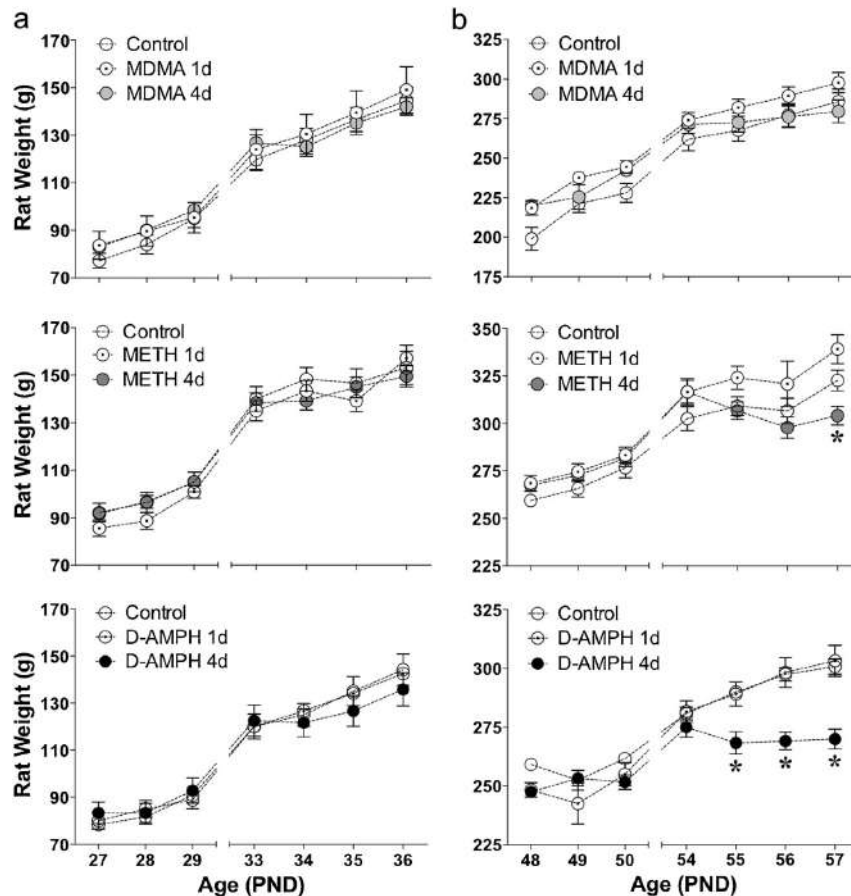


Fig. 2. Comparative effects of 1 and 4 days of amphetamine-like psychostimulants (MDMA, methamphetamine: METH, D-amphetamine: D-AMPH) (accumulative dose of 15 vs. 60 mg/kg; $n = 6$ per age and treatment group) on rat body weight during (a) adolescence and (b) young adulthood. Notably, MDMA results have been adapted from published data (García-Cabrero and García-Fuster, 2015). PND: post-natal day.

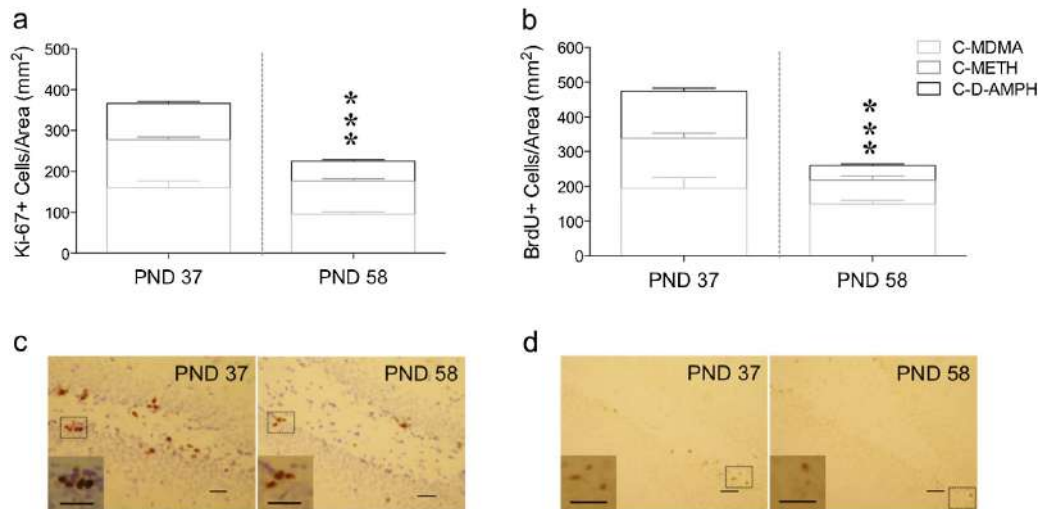


Fig. 3. Hippocampal cell genesis at different developmental ages. The highest rates of (a) cell proliferation and (b) cell survival (8–10 days old cells) were observed during adolescence as shown by the quantitative analysis of Ki-67+ cells or BrdU+ cells per area (mm^2) in the left dentate gyrus. Columns are means \pm SEM of the total number of quantified cells by area in the dentate gyrus for each control group at each age of study (PND 37 and PND 58, $n = 6$ per age and control group). *** $p < 0.001$ when compared to PND 58 (Student's t -test). Representative immunohistochemistry images of (c) Ki-67+ and (d) BrdU+ cells at PND 37 and PND 58. The bigger images were taken in a light microscope using a $40\times$ objective lens to illustrate the anatomy of the dentate gyrus. To observe particular labeled cells, the left-bottom corner of each example show a representative image taken using a $63\times$ objective lens. Scale bar = $30\ \mu\text{m}$. C-MDMA: control-MDMA group; C-METH: control-methamphetamine group; C-D-AMPH: control-D-amphetamine group.

3.3. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on hippocampal cell genesis at different developmental ages

When evaluating recent cell proliferation, the results showed that an accumulative dose of $15\ \text{mg/kg}$ (3 pulses of $5\ \text{mg/kg}$ over 1 day) of MDMA, methamphetamine or D-amphetamine was not sufficient to induce changes in the number of Ki-67+ cells/area in the hippocampus of adolescent (PND 37) or young adult (PND 58) rats (Fig. 4a). However, an accumulative dose of $60\ \text{mg/kg}$ (12 pulses of $5\ \text{mg/kg}$) over the course of 4 days of either MDMA or methamphetamine, but not D-amphetamine, reduced the number of Ki-67+ cells/area in the hippocampus of adolescent (PND 37: MDMA, $-25 \pm 6\%$, $p < 0.05$) and young adult (PND 58: MDMA, $-21 \pm 4\%$, $p < 0.05$; METH, $-26 \pm 4\%$, $p < 0.01$) rats (Fig. 4b). When evaluating the survival of cells that were labeled with BrdU prior to any psychostimulant drug treatment (i.e., 8–10 days old cells at the time of analysis), an accumulative dose of 15 or $60\ \text{mg/kg}$ of MDMA, methamphetamine or D-amphetamine did not induce changes in the hippocampus of adolescent rats (PND 37; Fig. 4c and d). However, the number of BrdU+ surviving cells was altered when these psychostimulant drugs were administered during young adulthood (PND 58; see Fig. 4c and d). In particular, MDMA reduced cell survival following $60\ \text{mg/kg}$ (MDMA, $-23 \pm 5\%$, $p < 0.05$) of drug administration (Fig. 4c and d).

3.4. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on hippocampal BDNF content at different developmental ages

Since BDNF is initially synthesized as a precursor protein (proBDNF), and then proteolytically processed into mature BDNF (mBDNF) (Lu, 2003), both protein forms were measured in this study. An accumulative dose of $15\ \text{mg/kg}$ of MDMA, methamphetamine or D-amphetamine was not sufficient to induce changes in the content of proBDNF and mBDNF in the hippocampus of adolescent (PND 37) or young adult (PND 58) rats (Fig. 5a–c). However, an accumulative dose of $60\ \text{mg/kg}$ over the course of 4 days of MDMA, methamphetamine or D-amphetamine, altered

hippocampal BDNF (Fig. 5d–f). In particular, MDMA reduced hippocampal proBDNF (PND 37: $-20 \pm 2\%$, $p < 0.05$; PND 58: $-21 \pm 5\%$, $p < 0.05$) and mBDNF (PND 37: $-24 \pm 3\%$, $p < 0.05$; PND 58: $-23 \pm 4\%$, $p = 0.08$). On the contrary, methamphetamine and D-amphetamine increased hippocampal proBDNF (METH: $+22 \pm 4\%$, $p < 0.05$; D-AMPH: $+35 \pm 12\%$, $p < 0.05$) and mBDNF (METH: $+27 \pm 12\%$, $p = 0.07$; D-AMPH: $+43 \pm 10\%$, $p < 0.05$) but only at PND 58 (Fig. 5d–f).

3.5. Hippocampal cell survival correlates with mBDNF content in young adult rats treated 4 days with amphetamine-like psychostimulants: possible role of 5-HT_{2C} receptors

As the main effects for all amphetamine-like drugs on cell genesis markers were observed at PND 58 following treatment with the highest accumulative dose (12 pulses of $5\ \text{mg/kg}$ over the course of 4 days: $60\ \text{mg/kg}$), Pearson's correlation coefficients were calculated for all drug-treated rats to test for possible association between variables (i.e., Ki-67, BrdU, proBDNF, mBDNF, 5-HT_{2C}). Only two pairs of associations came out statistically significant. The number of surviving cells (i.e., BrdU+ cells/area) paralleled the contents of mBDNF in the hippocampus of young adult rats (PND 58) that received the highest dose ($60\ \text{mg/kg}$) of amphetamine drugs ($r = 0.492$, $n = 15$, $p < 0.05$; Fig. 6a). Interestingly, in the same rats the contents of mBDNF positively correlated with that of 5-HT_{2C}-receptor ($r = 0.713$, $n = 16$, $p < 0.01$; Fig. 6b). In fact, an accumulative dose of $60\ \text{mg/kg}$ in young adult rats (from PND 54–57) altered 5-HT_{2C}-receptor in the hippocampus for MDMA ($-60 \pm 7\%$, $n = 5$, $p < 0.05$; see García-Cabrerizo and García-Fuster, 2015), and methamphetamine ($+34 \pm 10\%$, $n = 6$, $p < 0.05$, one tail t -test), but not for D-amphetamine ($+25 \pm 12\%$, $n = 6$, $p > 0.05$).

4. Discussion

The main results of this study suggest that the effects of amphetamine-like drugs on cell genesis depend on the rat's developmental age, with the young adult period being more

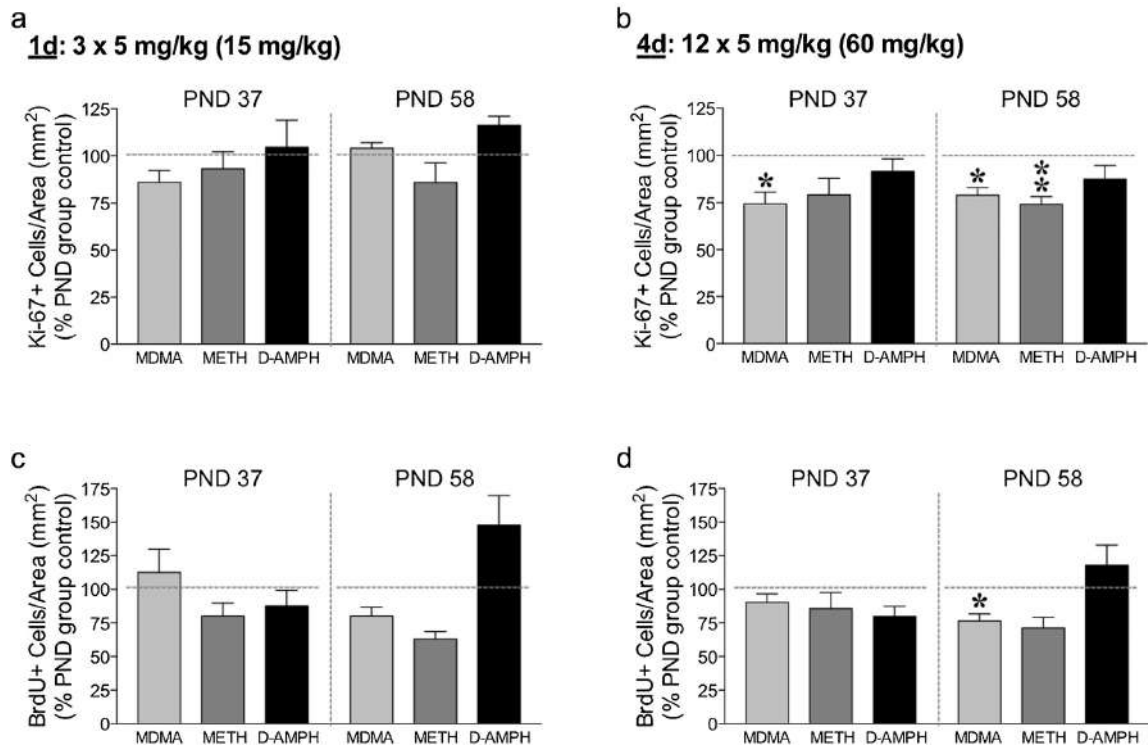


Fig. 4. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on hippocampal cell genesis at different developmental ages (PND 37 vs. PND 58, $n=6$ per age and treatment group, except the group treated with MDMA 60 mg/kg, $n=5$). (a–b) Cell proliferation as measured by the number of Ki-67+ cells by area (mm^2) in the dentate gyrus affected by an accumulative drug dose of (a) 15 mg/kg (3 pulses of 5 mg/kg) or (b) 60 mg/kg (12 pulses of 5 mg/kg) at PND 37 and PND 58. (c–d) Cell survival as measured by the number of BrdU+ cells by area (mm^2) in the dentate gyrus affected by an accumulative drug dose of (c) 15 mg/kg or (d) 60 mg/kg at PND 37 and PND 58. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the corresponding age-control group (Student's t -test). Notably, some control-drug pairwise comparisons might not be statistically significant as the SEM value for each PND control group has to be considered and is not represented in the graphs.

sensitive than the early adolescent one. MDMA and methamphetamine, but not D-amphetamine impaired hippocampal cell genesis in young adult rats. These effects were also dependent on the accumulative dose tested, as they were only observed following 12 pulses of 5 mg/kg (60 mg/kg over the course of 4 days). On the contrary, D-amphetamine increased both pro and mature BDNF forms in the hippocampus of young adult rats suggesting certain degree of neuroprotection and/or survival signals. Interestingly, mBDNF protein regulation paralleled hippocampal cell survival and 5-HT_{2C}-receptor content in young adult rats treated with the highest dose tested of psychostimulant drugs.

The enhanced rates of cell proliferation and cell survival observed in adolescent rats in comparison to young adult rats is likely due to the developmental process. Similarly, other studies have shown higher hippocampal neurogenesis rates in adolescence as compared to adulthood (e.g., He and Crews, 2007; García-Cabrerizo et al., 2015), reflective of the great level of neuroplasticity during adolescence (i.e., overproduction of axon and synapses; Spear, 2004) that might contribute to brain maturation and the transition to adulthood. These age-related basal differences in cell genesis were observed for all control groups separately (i.e., see individual boxes for each control group, Fig. 3). However, there were significant basal differences among supposedly identical control-treated groups. This might be explained by the fact that each experimental drug treatment (i.e., MDMA, methamphetamine, D-amphetamine) was done at different points in time, with different colonies provided by the

vendor (e.g., Fitzpatrick et al., 2013) and/or particular environmental conditions (Schmidt and Duman, 2007), and points out the relevance of controlling variables when studying hippocampal cell genesis. Interestingly, the observed decline in cell genesis from early adolescence to young adulthood represents a critical window of either vulnerability (i.e., leading to more damage in adulthood) or opportunity (i.e., better adaptation) to study hippocampal remodeling (Dahl, 2004) in response to challenges, such as drug exposure.

In particular, MDMA has been shown to regulate different stages of hippocampal neurogenesis depending on the mode, dose and age of drug administration as well as the species studied. For instance, when MDMA was administered during adolescence (i.e., every other day from PND 31–39), lower doses (total accumulative dose of 5 or 10 mg/kg) did not alter progenitor cell proliferation or survival as compared to a higher total accumulative dose (20 mg/kg) that increased cell proliferation yet diminished cell survival during withdrawal (Catlow et al., 2010). Moreover, 20 mg/kg of MDMA exposure during adolescence caused neurotoxic alterations in the hippocampus by reducing survival of neuronal precursors (Hernández-Rabaza et al., 2010). When MDMA was administered in adult rats a total accumulative dose of 40 mg/kg showed no effect on cell proliferation but decreased survival during withdrawal (Hernández-Rabaza et al., 2006), while in mice MDMA decreased cell proliferation in a dose dependent manner (dose-range: 1.25–40 mg/kg, daily injections for up to 30 days; Cho et al., 2007). In this context, an accumulative dose of 60 mg/kg of MDMA

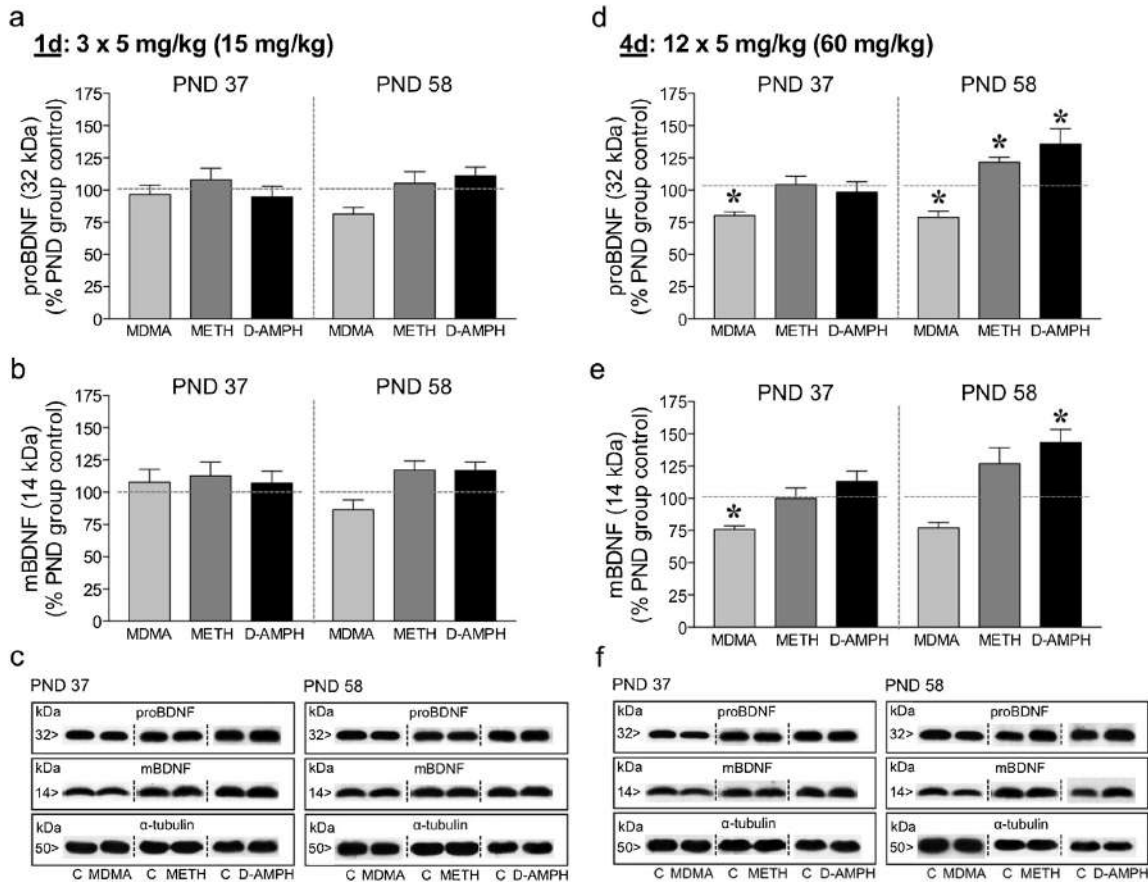


Fig. 5. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on hippocampal BDNF protein content at different developmental ages (PND 37 vs. PND 58) ($n = 6$ per age and treatment group, except the group treated with MDMA 60 mg/kg, $n = 5$). (a–c) Effects of an accumulative dose of 15 mg/kg (3 pulses of 5 mg/kg) on (a, c) proBDNF and (b–c) mBDNF protein content at PND 37 and PND 58. (d–e) Effects of an accumulative dose of 60 mg/kg (12 pulses of 5 mg/kg) on (d, f) proBDNF and (e–f) mBDNF protein content at PND 37 and PND 58. * $p < 0.05$ when compared with the corresponding age-control group (Student's t -test). Notably, some control-drug pairwise comparisons might not be statistically significant as the SEM value for each PND control group has to be considered and is not represented in the graphs. (c, f) Representative immunoblots depicting labeling of proBDNF (32 kDa) and mBDNF (14 kDa) are shown for each set of experiments.

(12 injections of 5 mg/kg over the course of 4 days) was required to impair cell genesis in the hippocampus of both adolescent (i.e., cell proliferation) and young adult (i.e., cell proliferation and survival) rats, suggesting in line with the existing literature, a neurotoxic effect of MDMA in the hippocampus. Similarly, methamphetamine reduced cell proliferation in the hippocampus of young adult rats following an accumulative dose of 60 mg/kg (12 injections of 5 mg/kg over the course of 4 days) while induced a non-significant decrease in cell survival. Moreover, no significant effects on cell genesis were observed when methamphetamine was administered earlier during adolescence or at a lower accumulative dose (i.e., 15 mg/kg administered in 3 pulses of 5 mg/kg). Comparably, prior reports in adult rats suggested that the amount of methamphetamine consumed following a self-administration paradigm was relative to the magnitude of reduction in hippocampal neurogenesis (Mandyam et al., 2008; Yuan et al., 2011). Compared to MDMA and methamphetamine previously discussed data, only a few studies have explored the effect of D-amphetamine on adult hippocampal neurogenesis. On one hand, Barr et al. (2010) showed no effect on cell proliferation and survival following repeated D-amphetamine treatment (2.5 mg/kg, i.p., daily for two weeks) in adult rats. However, another study that

explored the effect of chronic D-amphetamine administration (0.25, 0.5 or 2 mg/kg, i.p., twice daily) from early adolescence (PND 28) to adulthood (PND 71) showed no effect on hippocampal cell proliferation, but increased cell survival and neuronal differentiation in mouse brain (Dabe et al., 2013). Our results showed that D-amphetamine did not alter cell proliferation or survival in the hippocampus of rats at any age studied, although D-amphetamine increased by 17–48%, without reaching statistical significance, the number of BrdU cells in young adult rats. These overall comparative studies demonstrated that experimenter-delivered MDMA or methamphetamine, but not D-amphetamine, impaired hippocampal cell genesis depending on the accumulative dose administered (i.e., number of 5 mg/kg pulses), in young adult rats. Thus, these results extend previous reports on adolescent insensitivity (i.e., better adaptation) to amphetamine-psychostimulant drugs and suggest for adult rats certain degree of hippocampal damage that may mediate some of the addiction behaviors dependent on this brain region. For example, much research has been done on the relationship between the observed negative effects of stimulant drugs on hippocampal neurogenesis and their influence on memory dysfunction (reviewed in Canales, 2010). In fact, levels of neural progenitors in the hippocampus have

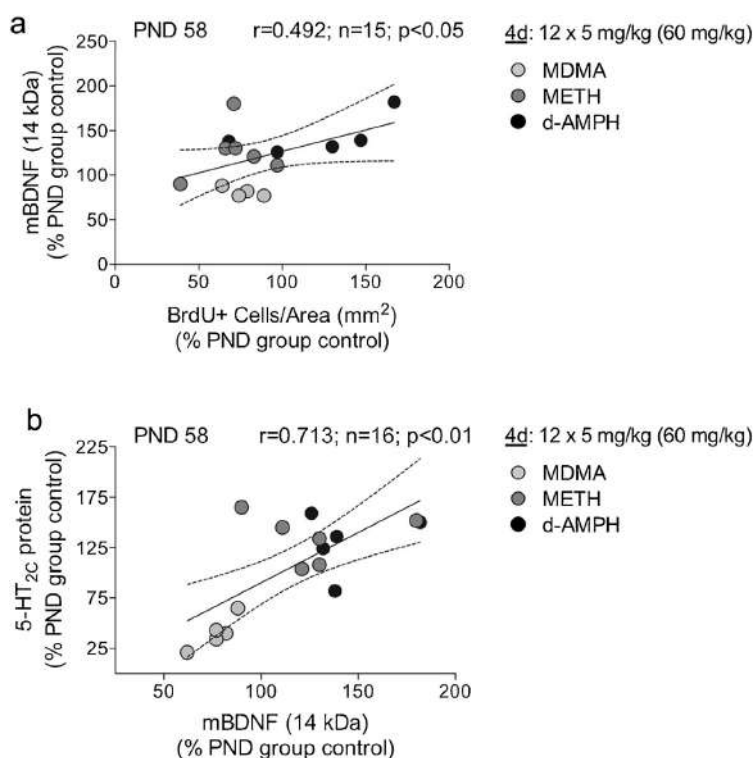


Fig. 6. Hippocampal cell survival correlates with mBDNF content in young adult rats treated with 12 pulses of 5 mg/kg of amphetamine-like psychostimulants over the course of 4 days: Possible role of 5-HT_{2c} receptors. (a) Scatter plot depicting a significant positive correlation between the number of BrdU+ cells and mBDNF protein content in the hippocampus after 4 days of amphetamine-like drug treatment and expressed as percentage of the corresponding PND-control group. Each circle represents a different treated rat. The solid line is the best fit for the correlation ($r=0.492$, $n=15$, $p<0.05$). The dotted curves indicate the 95% confidence interval for the regression line. (b) Scatter plot depicting a significant positive correlation between mBDNF and 5-HT_{2c} receptor protein content in the hippocampus after 4 days of amphetamine-like drug treatment and expressed as percentage of the corresponding PND-control group. Each circle represents a different treated rat. The solid line is the best fit for the correlation ($r=0.713$, $n=16$, $p<0.01$). The dotted curves indicate the 95% confidence interval for the regression line.

been shown to predict memory impairment and relapse to drug seeking (Recinto et al., 2012). Contrarily, the in-existent harmful effects of D-amphetamine on hippocampal cell genesis in the present results goes along with the existing literature and its use as a cognitive enhancer (Greely et al., 2008).

The functional significance and the mechanisms by which these amphetamine-drugs regulate cell genesis remains elusive. As stated earlier in the introduction, BDNF is critical for the function and survival of neurons (Mattson et al., 2004). Prior experiments suggested a time-dependent and region-specific modulation of BDNF by different dose regimens of these amphetamine-like psychostimulant drugs (see below). Similarly, the present results suggest that these drugs regulate BDNF forms depending on the dose administered (i.e., effects seen following 12 pulses of 5 mg/kg: 60 mg/kg total) and the age of development (i.e., mainly in young adult rats). In particular, while MDMA reduced hippocampal BDNF protein forms, methamphetamine and D-amphetamine increased them. Comparably to the present results, the hippocampus showed temporal decreases or unaltered BDNF content in adolescent (Ádori et al., 2010) or adult (Martínez-Turillas et al., 2006; Hemmerle et al., 2012) rat brain by MDMA. Additionally, methamphetamine effects on increasing BDNF have been shown at different developmental ages. For example, methamphetamine increased BDNF mRNA in the hippocampus during development (Grace et al., 2008) and in a time-dependent manner in adult rats (Braun et al., 2011). Moreover, at the protein level, extended access methamphetamine enhanced expression of mBDNF in the dorsal

and ventral hippocampus (Galinato et al., 2015). However, when revisiting the published studies evaluating D-amphetamine effects on BDNF the results seemed to be inconsistent. Some studies showed decreased BDNF mRNA expression in the hippocampus following D-amphetamine administration in adolescent but not adult rats (Banerjee et al., 2009; 0.5 mg/kg dose) or decreased protein in adult rats (Fuller et al., 2015; 12 escalating doses given in 4 days for a total 75 mg/kg accumulative dose). Yet, similarly to the present results, repeated treatments in adult rats with D-amphetamine (5 mg/kg/day for 5 days) increased BDNF expression and production in multiple brain regions (Meredith et al., 2002), including increased levels of hippocampal BDNF (Griesbach et al., 2008; 1 mg/kg/day for 7 days). Therefore, while MDMA decreased BDNF content in the hippocampus, D-amphetamine increased it. In this context, diminished BDNF levels could be associated with stress (i.e., MDMA drug effects on serotonergic nerve endings; for possible link between BDNF, serotonin and neurogenesis see review Foltran and Diaz, 2016) while increased levels could suggest neural adaptations following brain toxicity (i.e., neuroprotection following methamphetamine drug effects; Dluzer, 2004) or survival-signals (i.e., D-amphetamine drug effects).

An association between cell survival and mBDNF was observed by a correlation analysis in the hippocampus of young adult rats treated with 12 pulses of 5 mg/kg (i.e., the highest dose tested) of these psychostimulant drugs, suggesting mBDNF might engage to assist with changes in hippocampal plasticity. Similarly, a recent study showed that the survival of adult brain progenitors was

associated with altered BDNF signaling (Somkuwar et al., 2015). Interestingly, besides BDNF, serotonin has been shown to participate in regulating cell genesis and neuronal survival in the adult brain (Mattson et al., 2004; Foltran and Diaz, 2016). In fact, the serotonin system is known to undergo substantial development during adolescence (Chen et al., 1997) with 5-HT_{2C} receptors present at higher densities in adult hippocampus (reviewed in Berumen et al., 2012). Moreover, a recent study showed MDMA administration decreased hippocampal content of 5-HT_{2C} receptors in young adult rats (García-Cabrerizo and García-Fuster, 2015). In this context, the present results suggest an association and a possible role for 5-HT_{2C}-receptors in mBDNF-survival regulation as observed by the positive correlation between them. Interestingly, 5-HT_{2C}-receptor activity has been shown to promote proliferation and differentiation of neuronal determined progenitors cells (Klempin et al., 2010).

5. Conclusions

The present results demonstrate certain degree of hippocampal damage exerted by MDMA or methamphetamine in the hippocampus of young adult rats, that may mediate some of the addiction-like behaviors dependent on this brain region and extend previous reports on adolescent insensitivity (i.e., better adaptation) to amphetamine-like drugs. Moreover, D-amphetamine increased both pro and mature BDNF forms in the hippocampus of young adult rats proposing certain degree of neuroprotection and/or survival signals. Interestingly, mBDNF regulation paralleled hippocampal cell survival and 5-HT_{2C}-receptor content when young adult rats were treated with amphetamine-like drugs. Future studies will aim at evaluating the long-term consequences to drug-induced brain changes of treating rats at this period of vulnerability.

Role of funding source

This study was supported by Fundación Alicia Koplowitz and by Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (grant number 2012/011, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain) to MJG-F. The study was also funded by RETICS-RTA (RD12/0028/0011; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER, Spain). RG-C was supported by a pre-doctoral fellowship (Consejería de Innovación, Investigación y Turismo del Gobierno de las Islas Baleares y del Fondo Social Europeo). MJG-F is a 'Ramón y Cajal' Researcher (MINECO-UIB).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), who kindly provided Ki-67 and BrdU antibodies. The authors also thank Mr. Antonio Crespo for technical assistance.

References

- Ádori, C., Andó, R.D., Ferrington, L., Szekeres, M., Vas, S., Kelly, P.A., Hunyady, L., Bagdy, G., 2010. Elevated BDNF protein in cortex but not in hippocampus of MDMA-treated Dark Agouti rats: a potential link to the long-term recovery of serotonergic axons. *Neurosci. Lett.* 478, 56–60.
- Banerjee, P.S., Aston, J., Khundakar, A.A., Zetterström, T.S., 2009. Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain-derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *Eur. J. Neurosci.* 29, 465–476.
- Barr, J.L., Renner, K.J., Forster, G., 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, 395–405.
- Berumen, L.C., Rodríguez, A., Miledi, R., García-Alcocer, G., 2012. Serotonin receptors in the hippocampus. *Sci. World J.* doi:10.1100/2012/823493 15 pages.
- Braun, A.A., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Seroogy, K.B., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2011. Neurotoxic (+)-methamphetamine treatment in rats increases brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B expression in multiple brain regions. *Neuroscience* 184, 164–171.
- Brunell, S.C., Spear, L.P., 2006. Effects of acute alcohol or amphetamine administration on the acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 186, 579–586.
- Cameron, H.A., McKay, R.D., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406–417.
- Canales, J.J., 2010. Comparative neuroscience of stimulant-induced memory dysfunction: role for neurogenesis in the adult hippocampus. *Behav. Pharmacol.* 21, 379–393.
- Carvalho, M., Carmo, H., et al., 2012. Toxicity of amphetamines: an update. *Arch. Toxicol.* 86, 1167–1231.
- Catlow, B.J., Badanich, K.A., Sponaugle, A.E., Rowe, A.R., Song, S., Rafalovich, I., Sava, V., Kirstein, C.L., Sanchez-Ramos, J., 2010. Effects of MDMA (ecstasy) during adolescence on place conditioning and hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 628, 96–103.
- Chen, J.C., Turiak, G., Galler, J., Volicer, L., 1997. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 257–263.
- Cho, K.O., Kim, S.K., Rhee, G.S., Kwack, S.J., Cho, D.H., Sung, K.W., Kim, S.Y., 2007. Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine treatment suppresses cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 120–123.
- Crews, F.T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., Nixon, K., 2006. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience* 137, 437–445.
- Dabe, E.C., Majdak, P., Bhattacharya, T.K., Miller, D.S., Rhodes, J.S., 2013. Chronic D-amphetamine administered from childhood to adulthood dose-dependently increases the survival of new neurons in the hippocampus of male C57BL/6J mice. *Neuroscience* 231, 125–135.
- Dahl, R.E., 2004. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1021, 1–22.
- Dluzer, D.E., 2004. The effect of gender and the neurotrophin, BDNF, upon methamphetamine-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. *Neurosci. Lett.* 359, 135–138.
- Fitzpatrick, C.J., Gopalakrishnan, S., Cogan, E.S., Yager, L.M., Meyer, P.J., Lovic, V., Saunders, B.T., Parker, C.C., Gonzales, N.M., Aryee, E., Fligel, S.B., Palmer, A.A., Robinson, T.E., Morrow, J.D., 2013. Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: sign-tracking vs goal-tracking. *PLoS One* 8, e75042.
- Foltran, R.B., Diaz, S.L., 2016. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.13658.
- Fuller, J.J., Murray, R.C., Horner, K.A., 2015. D-Amphetamine withdrawal-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor in sprague-dawley rats are reversed by treatment with ketamine. *Neuropharmacology* 97, 7–17.
- Galinato, M.H., Orío, L., Mandym, C.D., 2015. Methamphetamine differentially affects BDNF and cell death factors in anatomically defined regions of the hippocampus. *Neuroscience* 286, 97–108.
- García-Cabrerizo, R., García-Fuster, M.J., 2015. Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: down-regulation of apoptotic markers. *Neurotoxicology* 49, 104–113.
- García-Cabrerizo, R., Keller, B., García-Fuster, M.J., 2015. Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability: consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304, 302–315.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 31, 79–89.
- Grace, C.E., Schaefer, T.L., Herring, N.R., Skelton, M.R., McCreary, A.E., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2008. (+)-Methamphetamine increases corticosterone in plasma and BDNF in brain more than forced swim or isolation in neonatal rats. *Synapse* 62, 110–121.
- Greely, H., Sahakian, B., Harris, J., Kessler, R.C., Gazzaniga, M., Campbell, P., Farah, M. J., 2008. Towards responsible use of cognitive-enhancing drugs by the healthy. *Nature* 456, 702–705.
- Green, A.R., Mehan, A.O., Elliott, J.M., O'shea, E., Colado, M.I., 2003. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy). *Pharmacol. Rev.* 55, 463–508.
- Green, A.R., Gabrielsson, J., Marsden, C.A., Fone, K.C., 2009. MDMA: on the translation from rodent to human dosing. *Psychopharmacology* 204, 375–378.
- Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Gomez-Pinilla, F., Sutton, R.L., 2008. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience* 154, 530–540.

- He, J., Crews, F.T., 2007. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 327–333.
- Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Vorhees, C.V., Williams, M.T., Serogy, K.B., 2012. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) treatment modulates expression of neurotrophins and their receptors in multiple regions of adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 520, 2459–2474.
- Hernández-Rabaza, V., Domínguez-Escribà, L., Barcia, J.A., Rosel, J.F., Romero, F.J., García-Verdugo, J.M., Canales, J.J., 2006. Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* 51, 967–973.
- Hernández-Rabaza, V., Navarro-Mora, G., Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Marín, M.P., García-Verdugo, J.M., Renau-Piqueras, J., Canales, J.J., 2010. Neurotoxicity and persistent cognitive deficits induced by combined MDMA and alcohol exposure in adolescent rats. *Addict. Biol.* 15, 413–423.
- Izenwasser, S., 2005. Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. *Crit. Rev. Neurobiol.* 17, 51–67.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579.
- Klempin, F., Babu, H., De Pietri Tonelli, D., Alarcon, E., Fabel, K., Kempermann, G., 2010. Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT_{1A}, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* doi:http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2010.00014.
- Lu, G., 2003. Pro-region of neurotrophins: role of synaptic modulation. *Neuron* 39, 735–738.
- Mandyam, C.D., Koob, G.F., 2012. The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci.* 35, 250–260.
- 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. *Biol. Psychiatry* 64, 958–968.
- Martínez-Turillas, R., Moyano, S., Del Río, J., Frechilla, D., 2006. Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 402, 126–130.
- Mattson, M.P., Maudsley, S., Martin, B., 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and disorders. *Trends Neurosci.* 27, 589–594.
- Meredith, G.E., Callen, S., Scheuer, D.A., 2002. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res.* 949, 218–227.
- Recinto, P., Samant, A.R., Chavez, G., Kim, A., Yuan, C.J., Soleiman, M., Grant, Y., Edwards, S., Wee, S., Koob, G.F., George, O., Mandyam, C.D., 2012. Levels of neural progenitors in the hippocampus predict memory impairment and relapse to drug seeking as a function of excessive methamphetamine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 37, 1275–1287.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661.
- SAMHSA, 2002. Results from the 2001 national household survey on drug abuse: volume 1. Summary of national findings. In: NHSDA, editor. Series H-17. Rockville, MD: Office of Applied Studies.
- Schaefer, T.L., Skelton, M.R., Herring, N.R., Gudelsky, G.A., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2008. Short- and long-term effects of (+)-methamphetamine and (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on monoamine and corticosterone levels in the neonatal rat following multiple days of treatment. *J. Neurochem.* 104, 1674–1685.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S., 2007. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav. Pharmacol.* 18, 391–418.
- Somkuwar, S.S., Fannon, M.J., Staples, M.C., Zamora-Martínez, E.R., Navarro, A.I., Kim, A., Quigley, J.A., Edwards, S., Mandyam, C.D., 2015. Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct. Funct.* doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-1163-z.
- Spear, L.P., 2004. Adolescent brain development and animal models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1021, 23–26.
- Spear, L.P., 2007. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 1–9.
- Steinkellner, T., Freissmuth, M., Sitte, H.H., Montgomery, T., 2011. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA 'Ecstasy'), methamphetamine and D-amphetamine. *Biol. Chem.* 392, 103–115.
- Teixeira-Gomes, A., Costa, V.M., Feio-Azevedo, R., Bastos, M.L., Carvalho, F., Capela, J.P., 2015. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int. J. Dev. Neurosci.* 41, 44–62.
- UNODC, 2014. World Drug Report. United Nations Office on Drug and Crime, Vienna.
- Vorhees, C.V., Reed, T.M., Morford, L.L., Fukumura, M., Wood, S.L., Brown, C.A., Skelton, M.R., McCrea, A.E., Rock, S.L., Williams, M.T., 2005. Periadolescent rats (P41–50) exhibit increased susceptibility to D-amphetamine-induced long-term spatial and sequential learning deficits compared to juvenile (P21–30 or P31–40) or adult rats (P51–60). *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 117–134.
- Vorhees, C.V., He, E., Skelton, M.R., Graham, D.L., Schaefer, T.L., Grace, C.E., Braun, A.A., Amos-Kroohs, R., Williams, M.T., 2011. Comparison of (+)-methamphetamine, ±-methylenedioxymethamphetamine, (+)-amphetamine and ±-fenfluramine on egocentric learning in the Cincinnati water maze. *Synapse* 65, 368–378.
- Wojtowicz, J.M., Kee, N., 2006. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat. Protoc.* 1, 1399–1405.
- Yuan, C.J., Quirocho, J.M., Kim, A., Wee, S., Mandyam, C.D., 2011. Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 98–108.

ARTÍCULO V

Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats: Attenuation of c-Fos activation

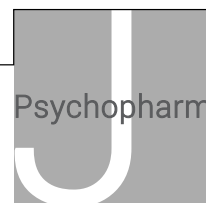
García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

Journal of Psychopharmacology, 2019; 33: 154-162

Resumen

Los resultados del Artículo I demostraron que la administración de cocaína en la adolescencia temprana-media (PND 33-39) no indujo efectos negativos sobre la sintomatología depresiva cuando se evaluó a largo plazo en la rata adulta. En el presente estudio se quiso evaluar si una reexposición aguda a la cocaína durante la etapa adulta (p. ej., PND 71) podía permitir observar cierto impacto negativo a nivel comportamental y molecular en animales con una historia previa de cocaína durante la etapa vulnerable adolescente (PND 33-39). Los resultados más relevantes mostraron que una única exposición a cocaína en la etapa adulta en ratas con una historia previa de cocaína en la etapa adolescente era suficiente para inducir un incremento en la sintomatología prodepresiva (mayor desespero conductual y mayor anhedonia) y una disminución de la actividad neuronal (c-Fos) a nivel del estriado dorsal. Estos datos demuestran los efectos negativos inducidos a largo plazo, tanto a nivel comportamental como molecular, por la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media y que solo se manifiestan tras una reexposición aguda a la droga en la etapa adulta.

Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats: Attenuation of c-Fos activation



Journal of Psychopharmacology
2019, Vol. 33(1) 154–162
© The Author(s) 2018
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0269881118812353
journals.sagepub.com/home/jop



Rubén García-Cabrerizo and M. Julia García-Fuster 

Abstract

Background: The goal of the present study was to utilize the adolescent drug experience as an emerging vulnerability factor for developing psychiatric comorbidities in adulthood that could, in turn, help to elucidate and/or hypothesize possible mechanisms contributing to higher relapse rates.

Outcomes: The current results showed that adolescent cocaine exposure (15 mg/kg, intraperitoneally, seven days) during early–mid adolescence (postnatal days 33–39) enhanced negative affect in adulthood, by increasing behavioral despair following drug re-exposure and by increasing anhedonia. Thus, these behavioral data provided a good model to further ascertain the long-term cellular and molecular adaptations that might take place in the brain in response to adolescent cocaine exposure as well as the impact of drug re-exposure in adulthood. In this regard, the results showed that adolescent cocaine exposure did not modulate cell proliferation (Ki-67+ cells) or c-Fos protein activation in the dentate gyrus region of the hippocampus, but attenuated c-Fos activation in the dorsal striatum.

Conclusions: These results proved that a history of cocaine exposure during adolescence increased the vulnerability to induce negative affect (i.e. emergence of psychiatric comorbidity) in adulthood while it decreased neuronal activation in the dorsal striatum. Interestingly, these effects were only observed following cocaine re-exposure in adulthood, suggesting that avoiding drug contact in adulthood could prevent the long-term negative effects induced by adolescent cocaine.

Keywords

Adolescence, cocaine, comorbidity, depression, neuronal activity

Introduction

Cocaine exposure has been associated with a higher incidence of comorbid mental disorders (Filip et al., 2013) such as increased brain reward thresholds and increased depressive- and anxiety-like states (e.g. Koob, 2012), which could be observed during withdrawal in humans and animal models (Markou and Kenny, 2002; Perrine et al., 2008). However, these negative effects induced by cocaine seemed to vary with the age at drug exposure and with the time-point at which negative affect was evaluated. For example, while prenatal cocaine administration induced an enduring depressive-like phenotype during withdrawal in adulthood (Overstreet et al., 2000), adolescent cocaine exposure produced different behavioural outcomes when changes were immediately evaluated in the forced-swim test during adolescence: for no effects see Alves et al. (2008) versus for the induction of a pro-depressive state see Caffino et al. (2015). Moreover, when adolescent cocaine effects were evaluated later on in adulthood no changes were observed in behavioural despair (i.e. one aspect of depression-like behaviour; see García-Cabrerizo et al., 2015). Finally, cocaine exposure in adult rats was shown either to increase anxiety- and depression-like behaviour during early withdrawal (Perrine et al., 2008) or to induce no change in depressive-like behaviour as measured in the forced-swim test (Zilkha et al., 2014), although this later study showed a reduced sucrose preference in cocaine-exposed-stressed rats, suggesting an increased vulnerability to develop depressive-like behaviour following chronic stress.

Among all ages evaluated, adolescence is a critical period of brain plasticity during which most drug addicts initiate their use (early drug use being a strong predictor of the transition to addiction), and therefore an age period exceptionally vulnerable to both social and neurobiological influence. In fact, a disruption in normal brain development during adolescence, such as early drug use, has also been hypothesized as a risk factor for developing psychiatric comorbidity (Marco et al., 2011; Schepis et al., 2008; Volkow, 2004; Zhu et al., 2016). In this context, the present study aimed at extending prior knowledge on the effects of cocaine exposure during adolescence on negative affect in adulthood. Particularly, the present study is a follow-up of a recent paper from our research group (García-Cabrerizo et al., 2015) in which cocaine exposure (15 mg/kg per day, intraperitoneally (i.p.), seven or 14 days) administered during early–mid adolescence (postnatal days (PNDs) 33–39 or PNDs 33–46) was not able to induce long-term effects on behavioural despair in adulthood. Thus, the current goal was to further extend this original behavioural analysis (behavioural despair; see García-Cabrerizo et al., 2015) by including other aspects of emotional affectation, such

IUNICS, University of the Balearic Islands, and IdISBa, Palma, Spain

Corresponding author:

M. Julia García-Fuster, IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma, Spain.
Email: j.garcia@uib.es

as anxiety-like behaviour and anhedonia (a major core symptom of depression and of cocaine withdrawal; for example, D'Souza and Markou, 2010; Hatzigiakoumis et al., 2011) that could be altered in adulthood following adolescent cocaine, and by also evaluating how drug re-exposure in adulthood would affect these behavioural responses.

Additionally, another goal of the present study was to achieve a better understanding of how early drug initiation (i.e. adolescence vulnerability) might affect the neurobiological mechanisms and neural adaptations taking place during the course of withdrawal, which might help to explain the negative impact of cocaine on affect (i.e. psychiatric comorbidity). In particular, one common neurobiological adaptation being dysregulated by cocaine exposure and during depressive-like states is the well-known dysregulation of adult hippocampal neurogenesis (for cocaine see review in Mandyam and Koob, 2012; for depressive-like states see Jacobs et al., 2000). Moreover, histochemical detection of c-Fos (protein or mRNA level) has been proven to be a great tool to detect changes in neural activity in large populations of neurons at the single cell level. Although it seems pretty clear that acute cocaine induces c-Fos activation in several brain regions (e.g. Curran et al., 1996; Graybiel et al., 1990; Young et al., 1991), most of the studies being performed in the dorsal and/or ventral striatum, there is some controversy as to whether repeated cocaine treatment results in marked tolerance (e.g. Moratalla et al., 1996) or sensitization (e.g., Crombag et al., 2002) in the ability of an acute drug challenge to induce c-Fos in the brain. Thus, the role of this study was to evaluate how long-term withdrawal following adolescent cocaine exposure might impact negative affect (i.e. comorbidity addiction-depression), hippocampal neurogenesis and neuronal activity (i.e. c-Fos activation in the hippocampus and dorsal striatum) following drug re-exposure in adulthood. A preliminary report of a portion of this work was presented at the 37th SEF Meeting with guest society the British Pharmacological Society (García-Fuster et al., 2017a).

Materials and methods

Animals

A total of 68 adolescent male Sprague–Dawley rats (PND 26 at the beginning of the experiment) bred in the animal facility at the University of the Balearic Islands were used in this study. Rats were housed in groups of two or three in standard cages (except for Study I, in which rats were housed individually from PND 73 to 98) under precise environmental conditions (22°C, 70% humidity and 12 h light/dark cycle, lights on at 08:00 h) with *ad libitum* access to a standard diet and tap water. Rats were treated following the ARRIVE guidelines (McGrath and Lilley, 2015) and according to standard European ethical guidelines (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council). As stated in the Spanish Royal Decree 53/2013, all experimental procedures were approved by the Local Bioethical Committee (University of the Balearic Islands) and by the regional Government (Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca, Direcció General d'Agricultura i Ramaderia, Govern de les Illes Balears). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering. All procedures were performed during the light period (between 09:00 h and 13:00 h).

Study I: effects of adolescent cocaine exposure on affective-like behaviour in rats

For the first study 44 adolescent rats were utilized. Prior to any behavioural testing rats were handled for two days (PNDs 26–27; see Figure 1(a)). Changes in affective-like behaviour were evaluated by three different tests (i.e. forced-swim test, open field and sucrose preference) that quantified core symptoms of depression (i.e. behavioural despair, anxiety-like behaviour and anhedonia; see Figure 1(a)). First, all rats were exposed to the forced-swim test, a 15 min pre-test on PND 28 and a 5 min test on PND 29, where rats were videotaped. Each rat was placed in an individual tank 41 cm high × 32 cm diameter, water to a depth of 25 cm, and at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (for further details see García-Cabrerizo et al., 2015). Videos were then analysed to obtain the baseline time spent immobile for each rat on PND 29 (Behavioral Tracker software, CA, USA). Following three days of rest, groups of rats were treated daily for seven days (PNDs 33–39) with saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg, i.p., $n=21$) and cocaine (15 mg/kg, i.p., $n=23$), as previously described (see García-Cabrerizo et al., 2015 for the specific age-window of adolescent vulnerability; see also García-Fuster et al., 2017b for long-term effects in adulthood following the same experimental procedure in adolescence). This same paradigm of cocaine administration at this specific window of exposure induced behavioural psychomotor sensitization (see Parsegian et al., 2016). On PND 40, 24 h after the last drug administration, all rats were exposed to the forced-swim test (see Figure 1(a)) to evaluate whether adolescent cocaine induced immediate negative effects on behavioural despair. Moreover, to further evaluate the long-term consequences of adolescent cocaine on adulthood, rats were left undisturbed for 31 days (i.e. forced withdrawal) until they were challenged on PND 71 with a single dose of saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg, i.p., saline +sal, $n=9$, and cocaine +sal, $n=11$) or cocaine (15 mg/kg, i.p., saline +coc, $n=12$, cocaine +coc, $n=12$) and 45 min later exposed to the forced-swim test (see Figure 1(a)). Two days later, on PND 73, anxiety-like behaviour was evaluated in the open field by placing rats for 5 min in a wall-enclosed circular arena (80 cm diameter). The test session was recorded to later evaluate the time spent exploring the new field (i.e. distance travelled, time spent inactive, latency to centre and time spent in centre; see Walsh and Cummins, 1976). Immediately after the open field test, rats were single housed for the remainder of the experimental design (see Figure 1(a)). Then, anhedonia was evaluated by measuring sucrose preference (i.e. amount of sucrose consumed) in a two-bottle choice test (e.g. Slattery et al., 2007). As described in more detail elsewhere (García-Cabrerizo and García-Fuster, 2017), rats were trained to drink from two bottles placed one on each side of the housing cage. The first and last day (PND 75 and PND 78), both bottles were filled with water, and on the other two days (PNDs 76–77, see Figure 1(a)), one bottle contained 1% sucrose and the other one water. To avoid bias towards any side of the cage, bottles were placed in alternate positions. Bottles were weighed to calculate liquid consumption (grams of sucrose) per day (PND 76 and PND 77) or to quantify water versus sucrose consumption (grams) on PND 77 per experimental group. Finally, rats were left undisturbed for 20 days (i.e. forced withdrawal) until they were challenged again on PND 98 with a single dose of saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg, i.p., saline +sal+sal, $n=9$ and cocaine +sal+sal, $n=11$) or cocaine (15 mg/kg, i.p., saline

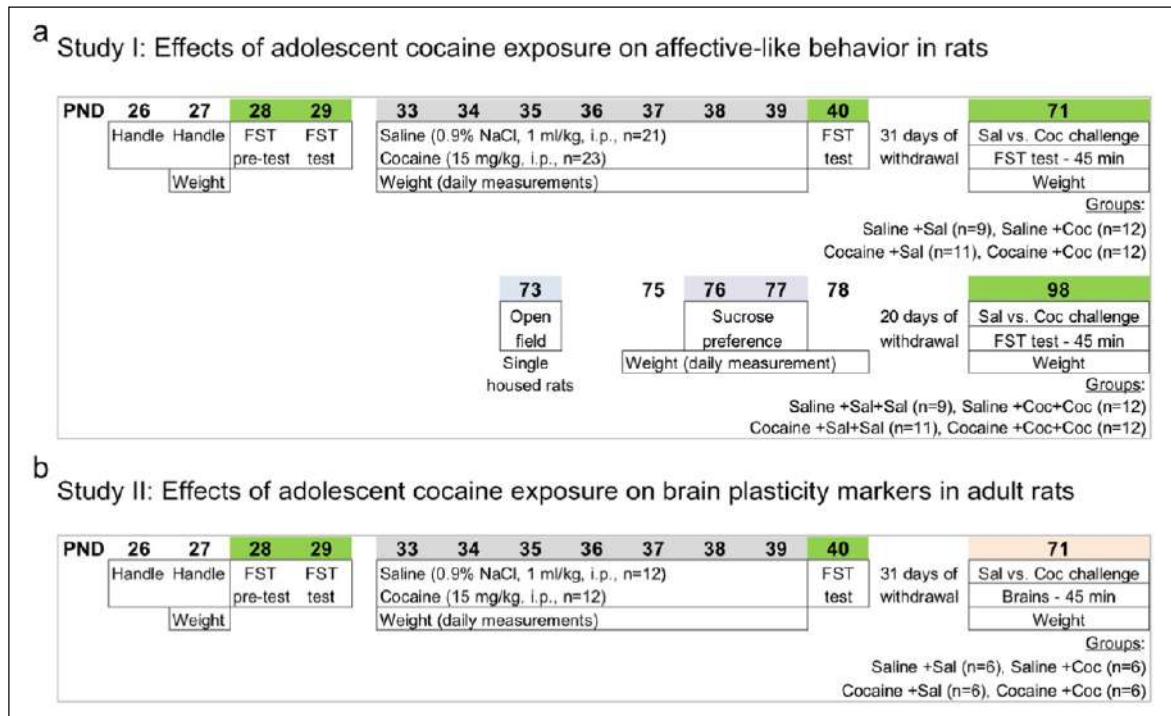


Figure 1. Experimental design. (a) Study I: effects of adolescent cocaine exposure on affective-like behaviour in rats. (b) Study II: effects of adolescent cocaine exposure on brain plasticity markers in adult rats.

Coc: cocaine; FST: forced-swim test; i.p.: intraperitoneal; PND: postnatal day; Sal: saline.

+coc+coc, $n=12$, cocaine +coc+coc, $n=12$) and 45 min later exposed to the forced-swim test (see Figure 1(a)).

Study II: effects of adolescent cocaine exposure on brain plasticity markers in adult rats

For the second study 24 adolescent rats were utilized following the same paradigm as described for Study I, but with minor modifications (see Figure 1(b)). Briefly, rats were handled for two days (PNDs 26–27) and then exposed to the forced-swim test (pre-test on PND 28 and test day on PND 29 as described above) for baseline immobility levels on PND 29. Following three days of rest, groups of rats were treated for seven days (PNDs 33–39) with saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg, i.p., $n=12$) and cocaine (15 mg/kg, i.p., $n=12$). On PND 40, all rats were exposed to the forced-swim test (see Figure 1(b)) and then they were left undisturbed for 31 days (i.e. forced withdrawal) until they were challenged on PND 71 with a single dose of saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg, i.p., saline +sal, $n=6$ and cocaine +sal, $n=6$) or cocaine (15 mg/kg, i.p., saline +coc, $n=6$, cocaine +coc, $n=6$) and killed by decapitation 45 min later (i.e. at the exact same time rats from Study I were exposed to the forced-swim test; see Figure 1(a) vs. Figure 1(b)). The left half-brain was quickly frozen in -30°C isopentane and stored at -80°C until further processing. For each animal, 30 μm sections were cryostat-cut and slide-mounted starting at -1.30 mm from the bregma, which includes posterior

parts of the caudate putamen or striatum, and throughout the whole extent of the hippocampus (starting around -1.72 and up to -6.80 mm from the bregma). Tissue was kept at -80°C until immunohistochemical analyses were done to ascertain the rate of hippocampal cell proliferation (i.e. Ki-67+ cells in the dentate gyrus; García-Cabrero et al., 2015; García-Fuster et al., 2010) and the rate of c-Fos activation (e.g. Curran et al., 1996; Graybiel et al., 1990) in the dentate gyrus region of the hippocampus and in the dorsal striatum.

Immunohistochemical analysis

The rate of recent cell proliferation within a cell cycle time of 25 h (Cameron and McKay, 2001) or of c-Fos activation (Sundquist and Nisenbaum, 2005) was quantified by post-fixing fresh frozen sections in 4% paraformaldehyde as described before (García-Fuster et al., 2010; Sundquist and Nisenbaum, 2005). Then, sections were exposed to several steps such as antigen retrieval, blocking in peroxidase solution and BSA containing 1% serum and 0.05% Triton X-100, overnight incubation with rabbit polyclonal anti-Ki-67 (1:40000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson, University of Michigan, Michigan, USA) or anti-c-Fos (1:40000; Santa Cruz Biotechnology, California, USA), and incubation with biotinylated anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories, California, USA). Finally, bound antibody was detected with Avidin/Biotin complex (Vectastain Elite ABC kit; Vectors Laboratories, California, USA), the chromogen

3,3'-diaminobenzidine (with nickel chloride for c-Fos) was used for visualization of signal. Then, tissue for Ki-67, but not for c-Fos, was counterstained with cresyl violet, and finally all tissue was dehydrated in graded alcohols, immersed in xylene and cover-slipped using Permount® mounting medium. The number of immunostained positive cells in the dentate gyrus region of the hippocampus (Ki-67 and c-Fos) was quantified by a blinded experimenter in every eighth section (and covering the whole depth of the hippocampus) with a Leica DMR light microscope (63X objective lens) and focusing through the thickness of the section. For the dorsal striatum, images of whole sections were taken with a Leica DMR light microscope (20X objective). The number of c-Fos positive cells was quantified in two representative slices from the dorsal striatum (i.e. below the external capsule, -1.30 to -1.80 mm from the bregma) per animal using Image J software (1.51s version, Maryland, USA). For each section and marker of analysis, the area (mm²) in which positive cells were quantified was calculated with a densitometer (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad, California, USA) or Image J (c-Fos in the dorsal striatum). Thus, the results are expressed as the total number of positive cells (Ki-67+ cells, c-Fos+ neurons) in the dentate gyrus and/or dorsal striatum divided by the total area evaluated (mm²). This quantification method corrects for possible differences in the area analysed among rats (examples following the same method: García-Cabrero et al., 2015, 2018; García-Fuster et al., 2017b).

Statistical analyses

Data were analysed with GraphPad Prism, Version 6 (GraphPad Software, Inc., California, USA). Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Changes in the time spent immobile in the forced-swim test were evaluated by two-way repeated measures analyses of variance (ANOVAs) followed by Sidak's multiple comparisons tests, in which Treatment (saline vs. cocaine) during adolescence (PNDs 33–39) and Day of analysis (PNDs 29, 40, 71 and 98 for Study I and 29 and 40 for Study II) were treated as independent variables. Changes in anxiety-like behaviour (i.e. open field), anhedonia (i.e. changes in sucrose consumption) and in brain markers (i.e. Ki-67, c-Fos) were evaluated by two-way ANOVAs followed by Sidak's multiple comparison tests (when appropriate), in which Treatment (saline vs. cocaine) during adolescence (PNDs 33–39) and Challenge on PND 71 (+sal vs. +coc) were treated as independent variables. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats

Chronic cocaine during early adolescence (PNDs 33–39) did not alter the time spent immobile in the forced-swim test (Treatment \times Day interaction: $F_{3,54} = 0.013$, $p = 0.998$) during adolescence (PND 40) or when rats were re-exposed to saline in adulthood either on PND 71 or on PND 98 (see Figure 2(a)). Contrarily, when rats were re-exposed to cocaine in adulthood, there was a

significant Treatment \times Day interaction ($F_{3,66} = 4.052$, $p = 0.011$; see Figure 2(b)). In particular, *post-hoc* comparisons revealed that rats with a history of adolescent cocaine showed increased behavioural despair when re-exposed to cocaine in adulthood ($+63 \pm 18$ s spent immobile in the forced-swim test, $p < 0.01$ vs. saline-treated rats during adolescence). The results from Study II in the forced-swim test replicated the effects observed for Study I (see Figure 1(a)) by showing that chronic cocaine during early adolescence (PNDs 33–39) did not induce immediate effects in the forced-swim test on PND 40 (Treatment \times Day interaction: $F_{1,22} = 2.104$, $p = 0.161$; see Figure 2(c)).

When evaluating the effects of adolescent cocaine exposure on anxiety-like behaviour in adulthood (PND 73), no significant results were observed for any of the parameters analysed: overall distanced travelled (Treatment \times Challenge interaction: $F_{1,39} = 1.029$, $p = 0.317$), time spent inactive (Treatment \times Challenge interaction: $F_{1,39} = 0.904$, $p = 0.348$), latency to centre (Treatment \times Challenge interaction: $F_{1,39} = 0.004$, $p = 0.947$) or time spent in centre (Treatment \times Challenge interaction: $F_{1,39} = 1.586$, $p = 0.215$) (see Figure 2(d)).

When evaluating the effects of adolescent cocaine exposure on anhedonia, although no significant effects were observed on sucrose intake on PND 76 (data not shown), a significant effect of Treatment ($F_{1,39} = 4.632$, $p = 0.038$), but no effect of Challenge ($F_{1,39} = 0.265$, $p = 0.610$) or Treatment \times Challenge interaction ($F_{1,39} = 0.118$, $p = 0.733$), was observed on PND 77 (see Figure 2(e), left panel). To better appreciate the effect of Treatment on sucrose intake and since no significant effect was observed due to cocaine Challenge (saline vs. cocaine on PND 71), a graph combining the experimental groups by adolescent drug treatment (saline vs. cocaine on PNDs 33–39) was represented (see Figure 2(e), right panel). The results revealed that rats exposed to cocaine during adolescence showed lower sucrose intake (-11 ± 5 g sucrose, $t = 2.219$, $p = 0.032$) on PND 77 when compared with rats that received saline (see Figure 2(e)). Moreover, when evaluating in more detail liquid consumption on PND 77 from each bottle (water vs. sucrose), the results showed a significant Treatment \times Bottle interaction ($F_{1,82} = 7.126$, $p = 0.009$) and a significant effect of Bottle ($F_{1,82} = 225.9$, $p < 0.001$). In particular, *post-hoc* analysis revealed that although rats with a history of adolescent cocaine showed lower sucrose consumption (see Figure 2(e)), there were no changes in the total amount of water consumed ($+3 \pm 4$ g water, $p > 0.05$; data not shown in graph).

Adolescent cocaine exposure did not modulate cell proliferation or c-Fos activation in hippocampus, but attenuated c-Fos activation in dorsal striatum, following drug re-exposure in adult rats

When measuring the number of Ki-67+ cells/area in the dentate gyrus region of the hippocampus, the results revealed no significant effect of Treatment ($F_{1,20} = 0.600$, $p = 0.448$), Challenge ($F_{1,20} = 0.042$, $p = 0.840$) or Treatment \times Challenge interaction ($F_{1,20} = 0.010$, $p = 0.923$) (see Figure 3(a) and (b)). Similarly, no effects of Treatment ($F_{1,18} = 1.766$, $p = 0.201$), Challenge ($F_{1,18} = 0.323$, $p = 0.577$) or Treatment \times Challenge interaction ($F_{1,18} = 2.956$, $p = 0.103$) were observed when measuring the

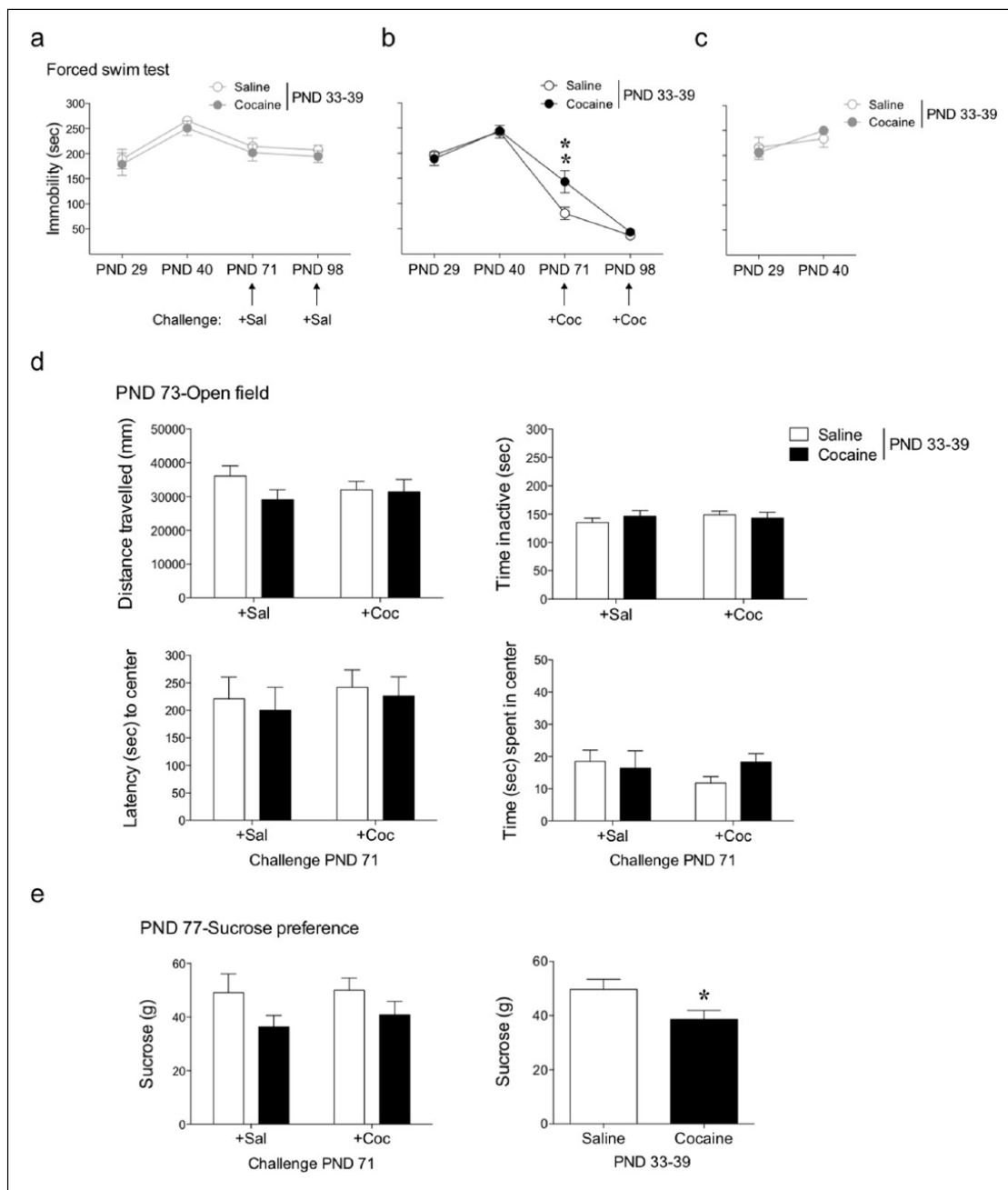


Figure 2. Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats. (a–c) Forced-swim test as measured on PND 29 (baseline), PND 40, PND 71 and PND 98 following re-exposure with (a) saline (+sal) or (b) cocaine (+coc). Data represent mean \pm SEM of the time (seconds) spent immobile. Two-way repeated measures analyses of variance (ANOVAs) followed by Sidak's multiple comparisons tests: $**p < 0.01$ when compared with saline +coc treated group. (d) Open field as measured on PND 73. Columns represent mean \pm SEM of the distance travelled (millimetres), the time inactive (seconds), the latency (seconds) to the centre and the time (seconds) spent in the centre. Two-way ANOVAs did not detect any significant effects. (e) One per cent sucrose preference (two-bottle choice test, PND 77). Columns represent mean \pm SEM of the amount of 1% sucrose consumed (grams) on PND 77. A two-way ANOVA detected a significant effect of Treatment ($F_{1,39} = 4.632$, $p = 0.038$) on sucrose intake that is further represented on the right figure when combining groups independently of drug challenge (multiple t -test was performed on PND 77: $*p < 0.05$ when compared with saline treated rats). Coc: cocaine; PND: postnatal day; Sal: saline.

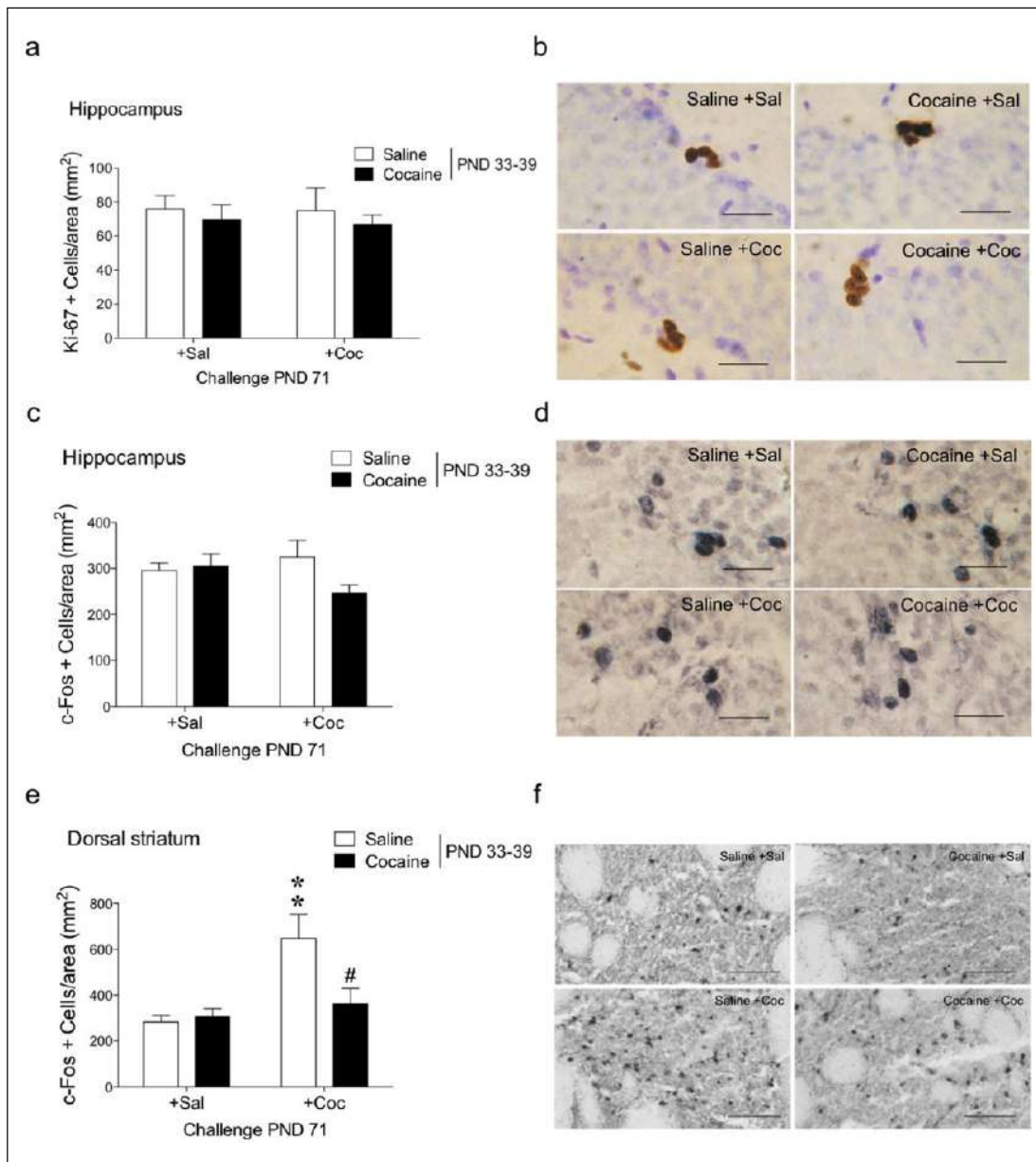


Figure 3. Adolescent cocaine exposure did not modulate cell proliferation or c-Fos activation in hippocampus, but attenuated c-Fos activation in dorsal striatum, following drug re-exposure in adult rats. (a) Quantitative analysis (mean \pm SEM) of Ki-67+ cells per area (mm²) in the left dentate gyrus. (b) Representative images of Ki-67+ (brown labelling in the blue granular layer) taken with a light microscope using a 63X objective lens to identify individual cells. Scale bar = 30 μ m. (c) Quantitative analysis (mean \pm SEM) of c-Fos+ cells per area (mm²) in the left dentate gyrus. (d) Representative images of c-Fos+ (dark blue labelling in the light blue granular layer) taken with a light microscope using a 63X objective lens to identify individual cells. Scale bar = 30 μ m. (e) Quantitative analysis (mean \pm SEM) of c-Fos+ cells per area (mm²) in the dorsal striatum. Two-way analyses of variance followed by Sidak's multiple comparisons tests: ** p < 0.01 when compared with saline +sal treated group; # p < 0.05 when compared with saline +coc treated group. (f) Representative images of c-Fos+ (dark black labelling on the light grey background) taken with a light microscope using a 20X objective lens to identify individual cells. Scale bar = 100 μ m. Coc: cocaine; PND: postnatal day; Sal: saline.

number of c-Fos + cells/area (mm²) in the dentate gyrus region of the hippocampus (see Figure 3(c) and (d)). However, when evaluating the effects of adolescent cocaine exposure and drug re-exposure in adulthood on c-Fos activation in the dorsal striatum, the results showed a significant effect of Treatment ($F_{1,17} = 4.364$, $p = 0.05$), Challenge ($F_{1,17} = 11.24$, $p = 0.004$) and a Treatment \times Challenge interaction ($F_{1,17} = 6.028$, $p = 0.025$). *Post-hoc* analysis revealed that acute cocaine challenge (+coc) increased the number of c-Fos+ cells/area in the dorsal striatum of rats with a history of saline in adolescence (saline +coc: $+365 \pm 87$ cells/area, $p < 0.01$ vs. saline +sal), an effect that was not observed when rats were exposed to cocaine in adolescence (cocaine +coc: $+56 \pm 67$ cells/area, $p > 0.05$ vs. cocaine +sal) (Figure 3(e) and (f)).

Discussion

It is well accepted that withdrawal from repeated psychostimulant drug exposure precipitates behavioural and physiological symptoms similar to the ones described for depressive-like states, such as despair and anhedonia (e.g. Barr et al., 2002; Filip et al., 2013). However, and as mentioned in the introduction, the negative consequences of cocaine exposure in rats seemed to be dependent on when the drug was administered and at what time-point during withdrawal negative affect was evaluated. In this regard, the present results showed that adolescent cocaine exposure (PNDs 33–39) did not induce behavioural despair when evaluated immediately during adolescence (PND 40) — an effect replicated for both studies (I and II) with different groups of rats. These effects agreed with the prior lack of effects observed by Alves et al. (2008) and are in contradiction with the pro-depressive state observed by Caffino et al. (2015), although this experiment followed a much longer cocaine exposure and higher doses (20 days of 20 mg/kg per day vs. seven days of 15 mg/kg per day), and therefore suggests that further studies are needed to truly understand these behavioural effects on adolescence. Moreover, when evaluating the long-term effects of adolescent cocaine in adulthood, while rats re-exposed to cocaine showed increased behavioural despair (novel data), rats challenged with saline showed no change in behaviour (reproducing our prior results; see García-Cabrerizo et al., 2015), and suggesting that the increase in behavioural despair observed in adulthood following adolescent cocaine could be prevented by avoiding drug re-exposure. To further evaluate other aspects of emotional affectation, rats were sequentially exposed to two other tests that measure core symptoms of depression (i.e. open field for anxiety- and/or exploratory-like behaviour, and sucrose preference as a measure of anhedonia or loss of the ability to experience positive reinforcement). While no overall changes were observed in exploratory behaviour, adolescent cocaine exposure reduced sucrose consumption in the two-bottle choice test, which, together with the observed increase in behavioural despair, reinforced the negative consequences exerted by adolescent cocaine on enhancing negative affect in adulthood. Therefore, adolescent cocaine exposure represents an excellent rat model of long-term vulnerability to increased negative affect (i.e. depressive-like phenotype induced by prior cocaine administration) in adulthood in which to study the neural adaptations that might be responsible for this maladaptive behaviour.

As mentioned earlier, hippocampal neurogenesis represents one common neurobiological adaptation found to be dysregulated following cocaine exposure (e.g. Mandyam and Koob, 2012; Yamaguchi et al., 2004) and during depressive-like states (e.g. Jacobs et al., 2000). However, most of the previous studies evaluated drug and/or pro-depressive phenotype effects on cell genesis already in adult rats and did not explore the long-term consequences following an adolescent cocaine experience. In this line of thought, two of our prior studies (García-Cabrerizo et al., 2015; García-Fuster et al., 2017b) evaluated the effects of administering cocaine on hippocampal cell genesis at the same age-window of adolescent vulnerability (PNDs 33–39) used in the present study. Although one study showed deficits in the number of adult-born precursor cells (Ki-67+) and the number of surviving mature cells (49–51 days old BrdU+), these effects were seen only for bred low-responder rats (i.e. rats bred for low novelty-induced locomotor activity), as compared with bred high-responders (high novelty-induced locomotion), and were suggested to be attributed to an altered neuroplastic response to learning (García-Fuster et al., 2017b). On the other hand, the other study, which used the same outbred rats as in the present study, showed no changes on neurogenic markers (Ki-67+ proliferating cells and 38 days old BrdU+ surviving cells) following adolescent cocaine exposure (García-Cabrerizo et al., 2015). The current results replicated the effects observed in García-Cabrerizo et al. (2015), since rats challenged on PND 71 with saline (+sal) showed no long-term effects of adolescent cocaine on cell proliferation (Ki-67+ cells). Moreover, acute cocaine exposure in adulthood (saline +coc group) did not impair cell proliferation as measured 45 min after drug injection (vs. saline +sal group), as previously reported (Yamaguchi et al., 2004), and thus reinforcing the notion that cocaine effects on cell proliferation are dependent on the dose administered and the time of analysis (e.g. Eisch and Nestler, 2002).

Examining c-Fos expression in adult rats after acute cocaine injection was used to probe aberrant circuit alterations driving the observed behavioural phenotype following adolescent cocaine (i.e. depressive- and anhedonic-like behaviours). While no significant changes in c-Fos activation were observed in the dentate gyrus region of the hippocampus, adolescent cocaine exposure attenuated the expected activity of dorsal striatum c-Fos neurons following acute cocaine challenge during withdrawal. This aberrant adaptation following cocaine pretreatment was previously described by Curran et al. (1996) at the mRNA level, and by Moratalla et al. (1996) at the protein level. However, there is some controversy in the literature as to whether repeated cocaine treatment induced marked tolerance (e.g. Curran et al., 1996; Moratalla et al., 1996; present results) or sensitization (e.g. Crombag et al., 2002; Hope et al., 2006) in the ability of an acute cocaine challenge to induce c-Fos in the brain. Several factors could account for these discrepancies: different brain regions of analysis (i.e. dorsal striatum exhibited tolerance while nucleus accumbens displayed sensitized effects); differences in time of withdrawal (i.e. incubation of psychomotor sensitization: during the first 24 h, Moratalla et al., 1996; seven days, Crombag et al., 2002; 14 days, Curran et al., 1996; and up to six months, Hope et al., 2006); whether the drug was administered in a novel environment (i.e. sensitized c-Fos response, Uslaner et al., 2001) vs. in the home cage (i.e. tolerance to c-Fos activation, Moratalla et al., 1996). In this study, although we followed a drug paradigm (15 mg/kg,

seven days, i.p.) known to induce behavioural sensitization (i.e. rats were injected in a novel environment; see García-Fuster et al. (2010), c-Fos protein expression, as measured after 31 days of withdrawal, was attenuated in rats re-exposed to cocaine and with a history of adolescent cocaine in dorsal striatum. Nevertheless, since in all of the previous studies cocaine was always administered in adult rats, the present results extend this prior data to include novel attenuated effects on c-Fos activation in the dorsal striatum when cocaine was administered during a window of adolescent vulnerability. This brain region is of relevance, as the neural circuits underlying pleasure and motivation for natural and drug rewards overlap severely (Kelley and Berridge, 2002), thus suggesting a functional reorganization of brain reward circuits in these animals with increased negative affect.

To conclude, a history of cocaine exposure during adolescence increased negative affect (i.e. emergence of psychiatric comorbidity) while it decreased neuronal activation in the dorsal striatum, but only following cocaine re-exposure in adulthood, thus suggesting that the long-term negative effects induced by adolescent cocaine could be prevented by avoiding drug contact in adulthood.

Acknowledgements

We thank Drs Huda Akil and Stanley J Watson (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), who kindly provided Ki-67 antibody. We also thank Cristian Bis-Humbert and Dr Benjamin Keller, who helped with procedural assistance.


Declaration of conflicting interest

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (grants 2012/011 and 2016/002, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain to MJG-F) and Consejería de Innovación, Investigación y Turismo del Gobierno de las Islas Baleares y del Fondo Social Europeo (pre-doctoral fellowship to RG-C). MJG-F is a member of RETICS-RTA (RD16/0017/0010; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER).

ORCID iD

M. Julia García-Fuster  <https://orcid.org/0000-0002-9177-3775>

References

Alves CJ, Magalhães A, Summavielle T, et al. (2008) Hormonal, neurochemical, and behavioral response to a forced swim test in adolescent rats throughout cocaine withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* 1139: 366–373.

Barr AM, Markou A and Phillips AG (2002) A ‘crash’ on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends Pharmacol Sci* 23: 475–482.

Caffino L, Calabrese F, Giannotti G, et al. (2015) Stress rapidly dysregulates the glutamatergic synapse in the prefrontal cortex of cocaine-withdrawn adolescent rats. *Addict Biol* 20: 158–169.

Cameron HA and McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406–417.

Crombag HS, Jedynek JP, Redmond K, et al. (2002) Locomotor sensitization to cocaine is associated with increased Fos expression

in the accumbens, but not in the caudate. *Behav Brain Res* 136: 455–462.

Curran EJ, Akil H and Watson SJ (1996) Psychomotor stimulant- and opiate-induced c-fos mRNA expression patterns in the rat forebrain: Comparisons between acute drug treatment and a drug challenge in sensitized animals. *Neurochem Res* 21: 1425–1435.

D’Souza MS and Markou A (2010) Neural substrates of psychostimulant withdrawal-induced anhedonia. *Curr Top Behav Neurosci* 3: 119–178.

Eisch AJ and Nestler EJ (2002) To be or not to be: Adult neurogenesis and psychiatry. *Clin Neurosci Res* 2: 93–108.

Filip M, Frankowska M, Jastrzebska J, et al. (2013) Preclinical studies on comorbidity between depression and psychostimulant addiction. *Pharmacol Rep* 65: 1529–1534.

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ (2017) Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect and voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal: Role of hippocampal FADD. *Addict Biol*. Epub ahead of print 28 December 2017. DOI: 10.1111/adb.12593.

García-Cabrerizo R, Bis-Humbert C and García-Fuster MJ (2018) Methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage following prolonged withdrawal in rats. *Neurotoxicology* 66: 1–9.

García-Cabrerizo R, Keller B and García-Fuster MJ (2015) Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304: 302–315.

García-Fuster MJ, Keller B and García-Cabrerizo R (2017a) Long-term consequences of treating rats with cocaine at a window of adolescent vulnerability on negative affect in adulthood. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 121: 43–43.

García-Fuster MJ, Parsegian A, Watson SJ, et al. (2017b) Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis selectively in adult bred low-responder rats. *Psychopharmacology* 234: 1293–1305.

García-Fuster MJ, Perez JA, Clinton SM, et al. (2010) Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *Eur J Neurosci* 31: 79–89.

Graybiel AM, Moratalla R and Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6912–6916.

Hatzigiakoumis DS, Martinotti G, Giannantonio MD, et al. (2011) Anhedonia and substance dependence: Clinical correlates and treatment options. *Front Psychiatry* 2: 10.

Hope BT, Simmons DE, Mitchell TB, et al. (2006) Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. *Eur J Neurosci* 24: 867–875.

Jacobs BL, van Praag H and Gage FH (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5: 262–269.

Kelley AE and Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: Relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22: 3306–3311.

Koob GF (2012) Animal models of psychiatric disorders. *Handb Clin Neurol* 106: 137–66.

Mandyam CD and Koob GF (2012) The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci* 35: 250–260.

Marco EM, Macri S and Laviola G (2011) Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: Evidence from animal models. *Neurotox Res* 19: 286–307.

Markou A and Kenny PJ (2002) Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories. *Neurotox Res* 4: 297–313.

- McGrath JC and Lilley E (2015) Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): New requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193.
- Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, et al. (1996) Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 17: 147–156.
- Overstreet DH, Moy SS, Lubin DA, et al. (2000) Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats. *Physiol Behav* 70: 149–156.
- Parsegian A, Garcia-Fuster MJ, Watson SJ, et al. (2016) *Adolescent cocaine experience differentially augments psychomotor sensitization in adulthood and alters dopamine receptor and epigenetic profiles in the nucleus accumbens of selectively bred high- and low-responder rats*. Presented at Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 12–16 November, 2016.
- Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu CA, et al. (2008) Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology* 54: 355–364.
- Schepis TS, Adinoff B and Rao U (2008) Neurobiological processes in adolescent addictive disorders. *Am J Addict* 17: 6–23.
- Slattery DA, Markou A and Cryan JF (2007) Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 190: 555–568.
- Sundquist SJ and Nisenbaum LK (2005) Fast Fos: Rapid protocols for single- and double-labeling c-Fos immunohistochemistry in fresh frozen brain sections. *J Neurosci Methods* 141: 9–20.
- Uslaner J, Badiani A, Norton CS, et al. (2001) Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *Eur J Neurosci* 13: 1977–1983.
- Volkow ND (2004) The reality of comorbidity: Depression and drug abuse. *Biol Psychiatry* 56: 714–717.
- Walsh RN and Cummins RA (1976) The open-field test: A critical review. *Psychol Bull* 83: 482–504.
- Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, et al. (2004) Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 1025: 351–362.
- Young ST, Porrino LJ and Iadarola MJ (1991) Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1291–1295.
- Zhu W, Mao Z, Zhu C, et al. (2016) Adolescent exposure to cocaine increases anxiety-like behavior and induces morphologic and neurochemical changes in the hippocampus of adult rats. *Neuroscience* 313: 174–183.
- Zilkha N, Feigin E, Barnea-Ygael N, et al. (2014) Induction of depressive-like effects by subchronic exposure to cocaine or heroin in laboratory rats. *J Neurochem* 130: 575–582.

ARTÍCULO VI

Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect and voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal: role of hippocampal FADD


García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

Addiction Biology, 2019; 24: 239-250

Resumen

Los estudios previos realizados en la presente Tesis doctoral demuestran mayores efectos negativos a nivel neuroquímico inducidos por la metanfetamina cuanto más tarde se inicia el consumo (adolescencia tardía vs. temprana, véase Artículo IV). En este contexto, el presente estudio evaluó las posibles consecuencias conductuales inducidas por la metanfetamina a largo plazo sobre la sintomatología negativa (fenotipo prodepresivo y proadictivo) en la rata adulta. Los principales resultados obtenidos mostraron, tras un largo período de abstinencia, un aumento de los efectos negativos a nivel comportamental (efectos prodepresivos: incremento de la anhedonia asociada al desespero conductual; efectos proadictivos: un aumento del consumo voluntario de metanfetamina). Por otro lado, se observaron efectos neurotóxicos mediante la disminución por un lado del contenido de monoaminas en varias regiones cerebrales (sistema dopaminérgico en el cuerpo estriado y serotoninérgico en el hipocampo) y por otro de marcadores de neuroplasticidad (disminución de la proteína proapoptótica FADD) en el hipocampo. Además, la reducción de FADD mostró una correlación con el incremento del consumo voluntario de metanfetamina, indicativo de la importancia de esta molécula en las neuroadaptaciones inducidas por la esta droga psicoestimulante durante la abstinencia.

Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect and voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal: role of hippocampal FADD

Rubén García-Cabrerizo^{1,2} & M. Julia García-Fuster^{1,2} 

IUNICS, University of the Balearic Islands, Palma, Spain¹ and Balearic Islands Health Research Institute (IdISBa), Palma, Spain²

ABSTRACT

While prior studies have established various interacting mechanisms and neural consequences (i.e. monoaminergic nerve terminal damage) that might contribute to the adverse effects caused by methamphetamine administration, the precise mechanisms that mediate relapse during withdrawal remain unknown. This study evaluated the long-term consequences of binge methamphetamine administration (three pulses/day, every 3 hours, 4 days, i.p.; dose-response: 2.5, 5 and 7.5 mg/kg) in adult Sprague–Dawley rats at two behavioral levels following 25 days of withdrawal: (1) negative affect (behavioral despair—forced-swim test, and anhedonia—1% sucrose consumption, two-bottle choice test) and (2) voluntary methamphetamine consumption (20 mg/l, two-bottle choice test). Striatal and hippocampal brain samples were dissected to quantify monoamines content by high-performance liquid chromatography and to evaluate neurotoxicity (dopaminergic and serotonergic markers) and neuroplasticity markers [i.e. cell fate regulator (Fas-associated protein with death domain) FADD] by Western blot. The results showed that methamphetamine administration induced dose-dependent negative effects during prolonged withdrawal in adult rats. In particular, rats treated repeatedly with methamphetamine (7.5 mg/kg) showed (1) enhanced negative affect—increased anhedonia associated with behavioral despair, (2) increased voluntary methamphetamine consumption, (3) enhanced neurotoxicity—decreased dopamine and metabolites in striatum and decreased serotonin in hippocampus, (4) altered neuroplasticity markers—decreased FADD protein and increased p-FADD/FADD balance selectively in hippocampus and (5) higher consumption rates of methamphetamine that were associated with lower FADD content in hippocampus. These results confirm that methamphetamine withdrawal dose-dependently induced negative affect and decreased monoamines content, while also increased voluntary methamphetamine consumption and suggested a role for hippocampal FADD neuroplasticity in these drug-withdrawal adaptations.

Keywords methamphetamine withdrawal, negative affect, voluntary consumption.

Correspondence to: M. Julia García-Fuster, IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa, km 7.5, E-07122 Palma, Spain. E-mail: j.garcia@uib.es

INTRODUCTION

The psychostimulant methamphetamine is a widely abused drug (UNODC 2015) and thus a major health problem. Although the initial neurobiological mechanisms that underlie the acute effects of methamphetamine are well understood (i.e. reinforcing effects through activation of the reward system; e.g. Nestler 2005), its recreational use is often characterized by a pattern of repeated frequent drug administrations during a short period of time (i.e. binge exposure) that

likely leads to high dependence rates (e.g. Krasnova & Cadet 2009; Moszczynska & Callan 2017). Methamphetamine interacts in the central nervous system with monoamine transporter sites with different affinities—with more potent actions on dopamine (DA) and noradrenaline (NE) release than serotonin (5-HT) (reviewed in Teixeira-Gomes *et al.* 2015). The potential for methamphetamine-induced persistent deficits in monoaminergic systems is well recognized in adult rodents (e.g. Krasnova & Cadet 2009; Carvalho *et al.* 2012). For example, high-dose binge administrations of

methamphetamine decreased DA and its principal metabolites concentrations in striatum (Ricaurte *et al.* 1982) as well as 5-HT in hippocampus (e.g. Morgan, Cattabeni, & Costa 1972). Moreover, there are other well-established interacting mechanisms and neural consequences (i.e. excitotoxicity, oxidative stress and metabolic compromise) that might contribute to the known adverse effects caused by repeated methamphetamine (reviewed in Steinkellner *et al.* 2011; Teixeira-Gomes *et al.* 2015). Interestingly, methamphetamine neurotoxicity is dose-dependent in experimental animals (see revision, Moszczynska & Callan 2017), and its effects can last from days to several months. Moreover, during methamphetamine withdrawal, many behavioral consequences emerge such as intense drug craving, which is likely linked to the propensity to drug relapse (see revision, Moszczynska & Callan 2017). Although the most prominent behavioral symptoms during long-term methamphetamine withdrawal are cognitive impairments and negative affect (e.g. behavioral despair and anhedonia), which are similar to the symptoms of major depressive disorder (Barr, Markou, & Phillips 2002), the precise mechanisms leading to these withdrawal symptoms remain unknown.

The neurotoxic effects of methamphetamine on monoaminergic systems have been proposed to be mediated, at least in part, by the induction of neuronal apoptosis (see revision, Krasnova & Cadet 2009). In particular, methamphetamine-induced neuronal apoptosis has been linked to stimulation of Ligand (FasL)/Fas-mediated cell death pathway, such as eliciting the expression of FasL in striatal neurons and causing cleavage of downstream caspases 8 and 3 (e.g. Jayanthi *et al.* 2005). However, the regulation of indispensable Fas-associated protein with death domain (FADD), a cell fate regulator that binds to Fas receptor and mediates either cell death or survival depending on its phosphorylation state and cellular localization (e.g. Alappat *et al.* 2005) by methamphetamine is unknown. Interestingly, accumulating evidence suggests that FADD forms have an important role in the pathophysiology of depression (García-Fuster *et al.* 2014; García-Fuster & García-Sevilla 2016), drug addiction (e.g. Ramos-Miguel *et al.* 2012) and cognition (Hernández-Hernández *et al.* 2017; Ramos-Miguel *et al.* 2017), making this multifunctional marker that could balance cell death with cell survival and/or plasticity (i.e. p-FADD/FADD balance as a postulated index of neuroplasticity; Ramos-Miguel *et al.* 2012), a most relevant candidate for mediating some of the mechanisms driving methamphetamine withdrawal symptoms.

As the age of methamphetamine exposure seems to be crucial for its neurotoxic outcome (e.g. Teixeira-

Gomes *et al.* 2015), with adult rats being more susceptible than adolescents (e.g. García-Cabrerizo & García-Fuster 2016a), and the dosage regimen and species are major variables to the negative drug effects (e.g. Carvalho *et al.* 2012), this study utilized adult Sprague–Dawley rats to ascertain the dose–response consequences of methamphetamine administration. In particular, the effects of binge methamphetamine administration were evaluated in a dose-dependent manner (2.5, 5 and 7.5 mg/kg, i.p., three pulses per day for 4 days) following prolonged withdrawal at different levels: (1) negative affect (i.e. behavioral despair and anhedonia), (2) voluntary methamphetamine consumption (i.e. oral self-administration), (3) *ex vivo* monoamines content, (4) dopaminergic and serotonergic markers and (4) dysregulation of FADD protein forms. A preliminary report of a portion of this work was presented at the 10th FENS Forum of Neuroscience (García-Cabrerizo & García-Fuster 2016b).

MATERIAL AND METHODS

Animals

This study utilized a total of 47 adult male Sprague–Dawley rats bred at the University of the Balearic Islands in two separate experimental waves (25 and 22 rats, respectively), which were performed in consecutive months and combined for analysis. Rats were housed in controlled environmental conditions (22°C, 70% humidity and 12-hour light/dark cycle) with *ad libitum* access to a standard diet and tap water in groups of three until experimental Day 32 (D32), when they were housed individually (see Fig. 1a and further experimental details below). Rats were habituated to the experimenter by being handled for a couple of days prior to any manipulations. All animal care and experimental procedures complied with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.* 2010), were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC and Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research, National Research Council 2003) and were approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

Drug treatment

Groups of randomly allocated adult rats (350–400 g) were treated with (+) methamphetamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, MO, USA) following a binge paradigm (dose–response: 2.5, 5 or 7.5 mg/kg, every 3 hours, 3 times per day, i.p.) during four consecutive days (total of 12 pulses). The number of rats for each

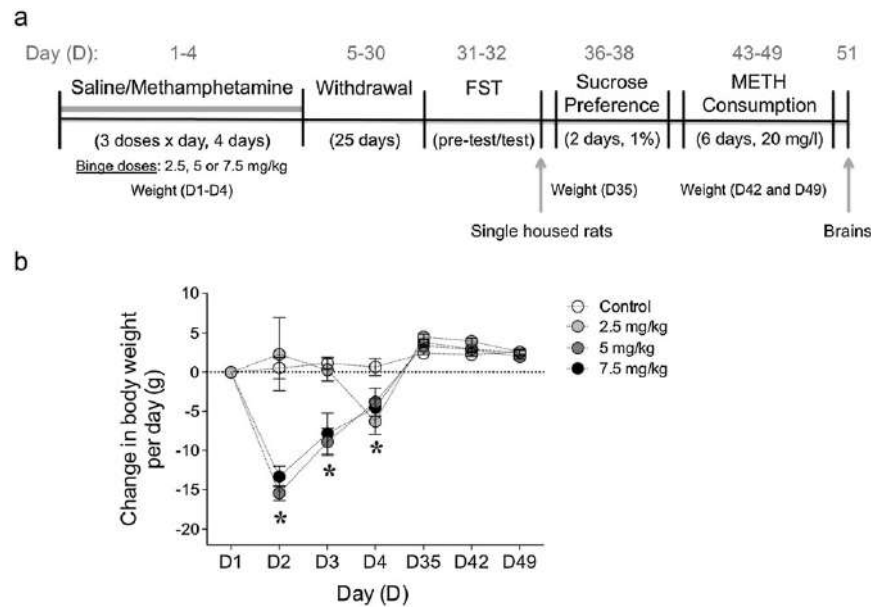


Figure 1 (a) Experimental design. (b) Methamphetamine binge administration dose-dependently induced anorexigenic effects in rats. The graph represents the change in rat body weight (g) per day of treatment. Groups of treatment: Control (saline-treated rats, $n = 15$) and methamphetamine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg $\times 3$, i.p., 4 days, $n = 7, 15$ and 10, respectively). Data represent mean \pm SEM of change in body weight (g). Two-way repeated measures ANOVA followed by Dunnett's or Tukey's multiple comparisons tests: at least $*P < 0.05$ when compared to control-treated rats. D = Day; FST = forced-swim test; METH = methamphetamine

experimental group was as follows: wave 1 (2.5 mg/kg, $n = 7$; 5 mg/kg, $n = 6$; 7.5 mg/kg, $n = 4$) and wave 2 (5 mg/kg, $n = 9$; 7.5 mg/kg, $n = 6$), thus rendering a total n of 7, 15 and 10 rats per dose, respectively. Control rats received the same number of saline injections (0.9% NaCl, 1 ml/kg, $n = 15$ rats total—8 and 7 per wave) at the indicated times (see Fig. 1a). The dose range was chosen based on prior studies in which methamphetamine induced changes in brain neurochemistry and/or neurotoxicity in Sprague–Dawley rats (e.g. Teixeira-Gomes *et al.* 2015; García-Cabrerizo & García-Fuster 2016a; Moszczynska & Callan 2017). Rats were weighted every day during the course of drug treatment (D1–D4) and were left undisturbed (forced withdrawal) for 25 days prior to any behavioral testing (see Fig. 1).

Behavioral testing

The effects of prolonged methamphetamine withdrawal were evaluated on negative affect at two levels: (1) behavioral despair—time spent immobile in the forced-swim test (FST) (e.g. Barr *et al.* 2002; Slattery & Cryan 2017) and (2) anhedonia—sucrose consumption in a two-bottle choice test (e.g. Slattery, Markou, & Cryan 2007). Finally, drug withdrawal effects on eliciting oral voluntary methamphetamine consumption were evaluated with a two-bottle choice (e.g. Wheeler *et al.* 2009).

Forced-swim test

As previously described in detail (García-Cabrerizo, Keller, & García-Fuster 2015), during the pre-test (D31, see Fig. 1a), each rat was placed in a tank (41 cm high \times 32 cm diameter) for 15 minutes filled with water ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) to a depth of 25 cm. Fresh water tanks were used for each rat, and temperature was monitored constantly. On test day (D32, Fig. 1a), rats were videotaped while being in the water tank for 5 minutes. An investigator blind to the experimental groups scored the videos by measuring the time spent immobile *versus* active (climbing and swimming) utilizing Behavior Tracker software (Version 1.5, CA, USA). Immediately after the FST (D32, see Fig. 1), rats were single housed for the remaining of the experimental design.

Sucrose consumption

On D35, rats were weighted (Fig. 1a). Then, following a standard protocol (e.g. Slattery *et al.* 2007), rats were trained to drink from two water bottles placed on the extreme sides of the cage for 24 hours (D35–36). The next day, one bottle was randomly switched for an identical bottle but containing 1% of sucrose solution (diluted in tap water), a concentration shown in a preliminary study to provide a robust but not maximal sucrose consumption per day (dose–response study: from 0.1 to 2% sucrose; see García-Cabrerizo & García-Fuster 2016b) and

was left undisturbed for 24 hours (D36–37). Then, bottles were reversed—to avoid bias towards any one side, and rats were allowed to drink for another 24 hours (D37–38). Finally, the bottle containing 1% sucrose was replaced with a water bottle, and drinking from both bottles was measured for 24 hours (D38–39) before one water bottle was removed from the cage (D39). Throughout the experiment, all bottles were weighted daily, and the amount of sucrose or water consumed (g) per day was calculated for each rat (i.e. sum of total g of either sucrose or water consumed every 24-hour period: D36–37 and D37–38 and divided by 2 days).

Methamphetamine consumption

On D42, rats were weighted, and a second bottle of water was introduced in each cage for 24 hours before the test began (D42–43, Fig. 1a). The next day, one bottle was randomly switched with a bottle that contained 20 mg/l of methamphetamine solution (diluted in tap water and daily prepared; Wheeler *et al.* 2009). This concentration of drinking methamphetamine induced aversion in naïve rats (i.e. preliminary dose–response study: dose range from 5 to 20 mg/l; see García-Cabrerizo & García-Fuster 2016b), as methamphetamine is known to have a bitter flavor and to induce condition taste aversion (Wheeler *et al.* 2009). Rats were allowed to drink for a total of 6 days (D43–49) during which bottles were reversed every 24 hours to avoid bias towards any one side. On D49, rats were weighted for the last time (see Fig. 1a). Finally, the bottle of methamphetamine was replaced with a water bottle and drinking from both bottles was measured for 24 hours (D49–50) before one bottle was removed from the cage (D50). All bottles were weighted daily, and the amount of voluntary methamphetamine consumed (g) per day was calculated for each rat (i.e. sum of total g of either methamphetamine or water consumed every 24-hour period: D43–44, D44–45, D45–D46, D46–47, D47–48 and D48–49 and divided by 6 days).

Tissue collection

On D51, rats were killed by rapid decapitation, and their brains removed for neurochemical analyses (Fig. 1a). The extracted brains were cut sagittally on an ice-cold plate, and the striatum and hippocampus were freshly dissected from each hemisphere and were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use. The left-side brain regions were used to evaluate monoamines levels using a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay, while the right-side regions were used for Western blot analysis (e.g. dopaminergic, serotonergic and neuroplasticity markers).

High-performance liquid chromatography

The levels of monoamine neurotransmitters (DA, NE and 5-HT) and metabolites (mainly 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA; 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) were determined on D51 by HPLC as previously described (Moranta, Esteban, & García-Sevilla 2009). Before doing so, total protein concentrations (μg) were calculated using a small aliquot for each sample by bicinchoninic acid assay (ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Then, the rest of each striatal or hippocampal sample was placed individually into cold tubes containing 1 ml of 0.4 M HClO_4 , 0.01% K_2EDTA and 0.1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and then homogenized and centrifuged at $40\,000\times g$ for 15 minutes at 4°C . The resulting supernatant was filtered with a $0.45\ \mu\text{m}$ syringe (Spartan-3, Sigma-Aldrich), and various aliquots (10 μl for striatal and 30 μl for hippocampal samples) were injected into the HPLC system (further details in Moranta *et al.* 2009). The compounds were detected electrochemically, and the current produced was monitored by use of an interphase (Waters busSAT/IN Module) connected to a digital PC. The contents of DA, NE and 5-HT and metabolites in a given sample were calculated by interpolating the corresponding peak height into a parallel standard curve using the software Millennium³² (Waters) and corrected by the total amount of protein (ng monoamines/ μg of protein).

Western blot

Total homogenates of striatal or hippocampal samples from the right brain hemisphere were prepared (García-Cabrerizo *et al.* 2015), and brain proteins (40 μg protein) were resolved by electrophoresis on 10% SDS–PAGE minigels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), followed by immunoblotting standard procedures (García-Fuster, Miralles, & García-Sevilla 2007). Membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody: (1) Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anti-FADD (H-181) (1:5000; sc-5559), anti-DARPP-32 (H-62) (1:1000; sc-11365), anti-D2 receptor (H-50) (1:1000; sc-9113), anti-5-HT_{2C} (D-12) (1:500; sc-17797), anti-5-HT_{2A} (A-4) (1:1000; sc-166775); (2) Cell Signaling (MA, USA): anti-phospho-Ser191-FADD (1:750; no. 2785), (3) Chemicon International (CA, USA): anti-phospho-Ser31-TH (1:1000; AB5423); anti-DAT (1:5000; MAB369) and (4) Sigma-Aldrich (MO, USA): anti- β -actin (1:10000; clone AC-15). The next day, membranes were incubated with the secondary antibody, horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:5000 dilution; Cell Signaling), immunoreactivity of target proteins was detected with ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK), and the

signal of bound antibody was visualized by exposure (1–60 minutes) to an autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm). Autoradiograms were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad). The content of target proteins in the striatum or hippocampus of rats treated with methamphetamine was compared in the same gel with that of control rats. This procedure was repeated until each sample was quantified at least 3 times in different gels (each gel with different samples from all experimental groups). Finally, percent changes in immunoreactivity with respect to control samples (100%) were calculated for each rat in the various gels, and the mean value was used as a final estimate. β -actin was used as a loading control.

Data and statistical analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism, Version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM).

For the statistical evaluation of changes in rat body weight, a two-way repeated measures ANOVA followed by Dunnett's or Tukey's multiple comparisons tests was used, in which Treatment (control, 2.5, 5 and 7.5 mg/kg of methamphetamine) and Day (D1 to D42) were treated as independent variables. D49 was not included in the analysis, as rats from wave 2 were not weighted on that day. When evaluating changes in the FST, a two-way ANOVA (*post hoc* Dunnett's test) was used with Treatment (control, 2.5, 5 and 7.5 mg/kg of methamphetamine) and Behavior (immobile *versus* active) as independent variables. For the two-bottle choice tests, a two-way ANOVA with Treatment (control, 2.5, 5 and 7.5 mg/kg of methamphetamine) and Bottle (water *versus* 1% sucrose or water *versus* 20 mg/l methamphetamine) as independent variables was used. Multiple *t*-tests were utilized to ascertain differences in bottle liquid consumption among treatment groups. Finally, when evaluating the effects of methamphetamine withdrawal on the content of monoamines and their metabolites (by HPLC) or on the regulation of neurochemical markers (by Western blot), a one-way ANOVA (*post hoc* Dunnett's test) was used. Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible associations between variables. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Methamphetamine binge administration dose-dependently induced anorexigenic effects in rats

As shown in Fig. 1b, methamphetamine administration induced changes in body weight as demonstrated by a significant Treatment \times Day interaction

($F_{15,215} = 12.23$, $P < 0.001$) and an effect of Treatment ($F_{3,43} = 21.35$, $P < 0.001$). In particular, *post hoc* analysis revealed reduced weight gain during repeated methamphetamine exposure in a dose–response manner when compared to control treated rats: doses of 5 and 7.5 mg/kg (D2, D3 and D4, at least $*P < 0.05$) and dose 2.5 mg/kg (D4, at least $P < 0.05$) (Fig. 1b). Moreover, there was a significant effect of Day ($F_{5,215} = 44.47$, $P < 0.001$) suggesting the induction of tolerance to methamphetamine anorexigenic effects (i.e. smaller change in body weight: D4 *versus* D2 for doses 5 and 7.5 mg/kg; at least $P < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test; significance not represented in Fig. 1b). These results agreed with prior data describing the anorexigenic effects of methamphetamine administration (Steinkellner *et al.* 2011; Carvalho *et al.* 2012) in relation to the dose administered (see García-Cabrero & García-Fuster 2016a for similar results—dose regimen: 5 mg/kg). Interestingly, the effects of repeated methamphetamine on body weight did not persist over time, as there were no significant weight differences following 25 days of withdrawal and during the remaining of the experimental design (see D35, Fig. 1b), along with the expected increase in food intake to a level similar to controls during withdrawal (e.g. Torney & Lasagna 1960; Kraeuchi *et al.* 1985).

Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect in rats following prolonged withdrawal

The effects of prolonged methamphetamine withdrawal on inducing negative affect were evaluated at two levels: (1) behavioral despair (i.e. increased immobility in the FST) and (2) anhedonia (i.e. decreased sucrose intake by the two-bottle choice test). The results for the FST (D32) showed that although there was a significant Treatment \times Behavior interaction ($F_{3,86} = 3.94$, $P = 0.01$) and an effect of Behavior ($F_{1,86} = 4.45$, $P = 0.038$), there was no effect of Treatment ($F_{3,86} = 0.01$, $P > 0.05$) (Fig. 2a). On the other hand, the two-bottle choice test (D36–38, 2 days exposure to 1% sucrose) showed no significant Treatment \times Bottle interaction ($F_{3,86} = 1.66$, $P = 0.181$), no effect of Treatment ($F_{3,86} = 0.86$, $P = 0.465$) but showed a significant effect of Bottle ($F_{1,86} = 246.8$, $P < 0.001$). Thus, multiple *t*-tests revealed that rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine showed a significant decrease in the amount (g/day) of 1% sucrose consumed paired with an increase in water consumption (at least $*P < 0.05$ for each bottle *versus* control rats; Fig. 2b). Additionally, rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine showed decreased preference for the bottle containing 1% sucrose ($-12 \pm 3\%$, $P < 0.001$) as

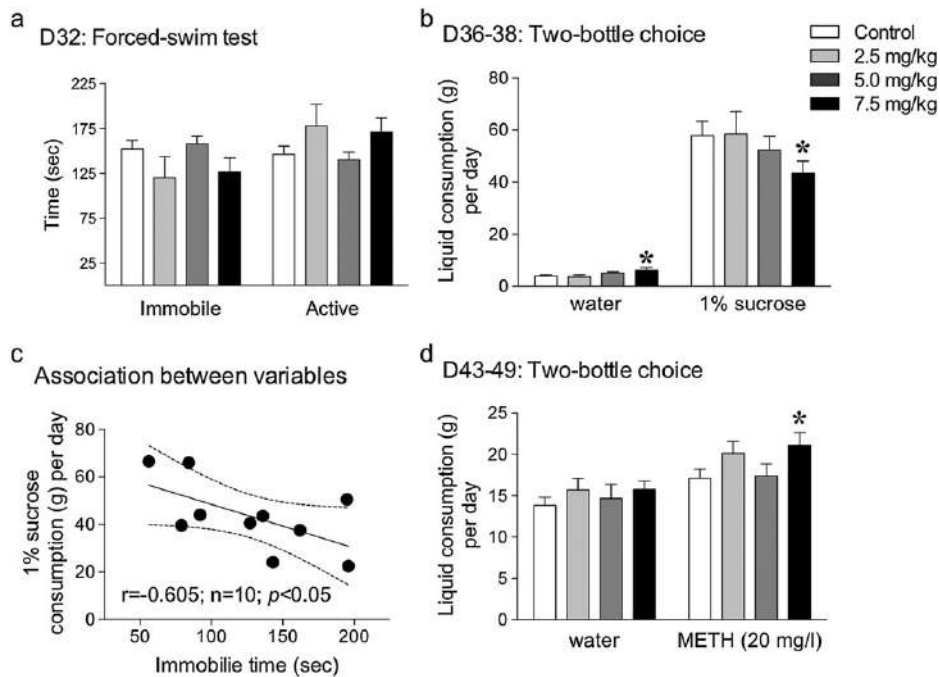


Figure 2 Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect in rats following prolonged withdrawal. (a) Forced-swim test (FST, D32). Groups of treatment: Control (saline-treated rats, $n = 15$) and methamphetamine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg \times 3, i. p., 4 days, $n = 7, 15$ and 10 , respectively). Data represent mean \pm SEM of the time (seconds) spent immobile versus active (climbing + swimming). (b) 1% sucrose preference (two-bottle choice test, D36–38). Data represent mean \pm SEM of the amount of water or 1% sucrose consumed (g) per day. (c) Association between variables. Scatter plot depicting a significant negative correlation between the time spent immobile in the FST with the amount of 1% sucrose consumed for rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine. Each circle represents a different treated rat. The solid line is the best fit for the correlation ($r = -0.605$, $n = 10$, $P < 0.05$). The dotted curves indicate the 95% confidence interval for the regression line. (d) Methamphetamine binge administration dose-dependently elicited voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal (two-bottle choice test, D43–49). Data represent mean \pm SEM of the amount of water or 20 mg/l of methamphetamine consumed (g) per day. Two-way ANOVA followed by multiple t -tests comparisons: $*P < 0.05$ when compared to the corresponding control group. METH = methamphetamine

measured during the last 24 hours of the test (D37–38) (data not shown). Moreover, Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible associations between the two behavioral variables used to measure negative affect (i.e. immobility in the FST and g of 1% sucrose consumption per day in the two-bottle choice). Interestingly, there was a significant negative correlation between both variables for rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine ($r = -0.605$, $n = 10$, $P < 0.05$) (Fig. 2c).

Methamphetamine binge administration dose-dependently elicited voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal

The effects of prolonged methamphetamine withdrawal on eliciting voluntary drug consumption (i.e. increased methamphetamine intake) were evaluated by the two-bottle choice (D43–49, 6 days exposure to 20 mg/l methamphetamine, Fig. 2d). The results showed no significant Treatment \times Bottle interaction ($F_{3,92} = 0.41$, $P = 0.752$)

and no effect of Treatment ($F_{3,92} = 2.25$, $P = 0.088$). However, there was a significant effect of Bottle ($F_{1,92} = 15.05$, $P < 0.001$), and multiple t -tests revealed that rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine showed a significant increase in the amount (g/day) of 20 mg/l methamphetamine consumption (at least $*P < 0.05$ versus control rats; Fig. 2d).

Methamphetamine binge administration dose-dependently reduced monamines content following prolonged withdrawal in rat brain

As shown in Fig. 3a, methamphetamine induced dose-dependent significant changes in the contents of DA ($F_{3,39} = 6.99$, $P < 0.001$) and its metabolites (DOPAC: $F_{3,39} = 6.79$, $P < 0.001$ and HVA: $F_{3,37} = 4.02$, $P = 0.014$) in striatum following prolonged withdrawal. In particular, *post hoc* analyses revealed that rats treated with 5 or 7.5 mg/kg of methamphetamine showed decreased contents for DA, DOPAC and HVA ($**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ versus control rats, Fig. 3a). No changes

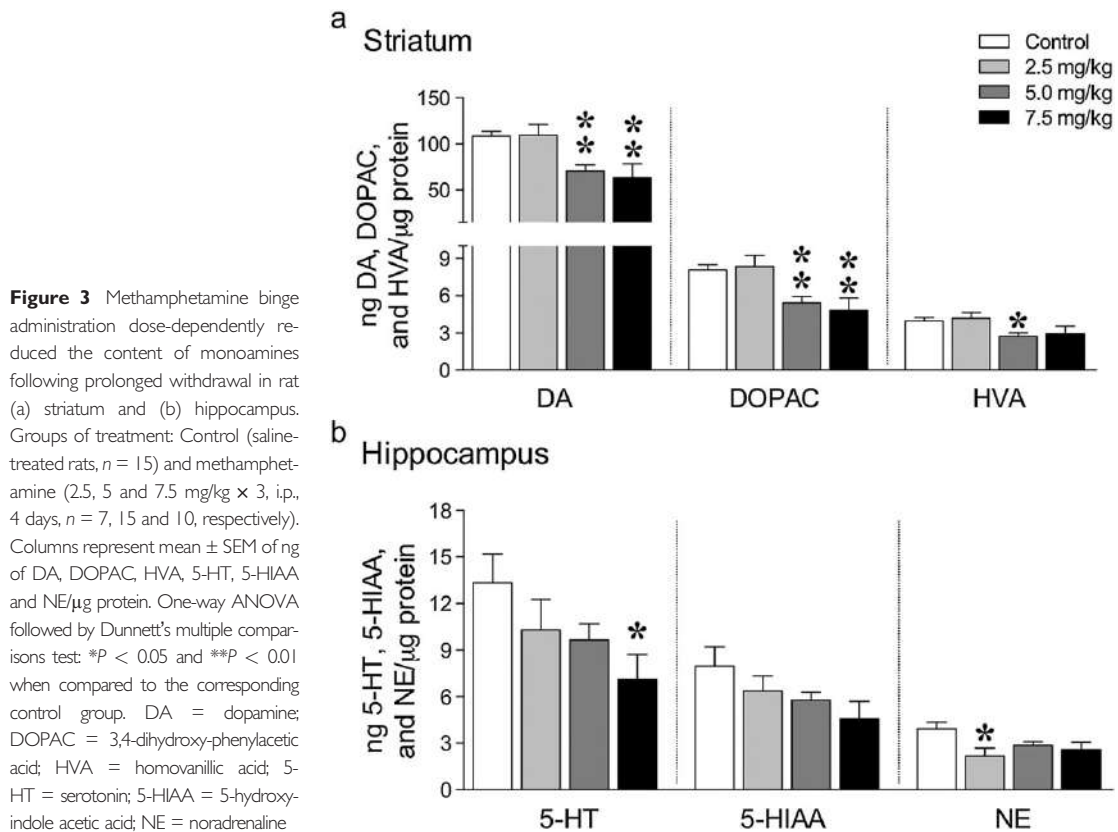


Figure 3 Methamphetamine binge administration dose-dependently reduced the content of monoamines following prolonged withdrawal in rat (a) striatum and (b) hippocampus. Groups of treatment: Control (saline-treated rats, $n = 15$) and methamphetamine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg $\times 3$, ip., 4 days, $n = 7, 15$ and 10, respectively). Columns represent mean \pm SEM of ng of DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA and NE/ μ g protein. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared to the corresponding control group. DA = dopamine; DOPAC = 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid; HVA = homovanillic acid; 5-HT = serotonin; 5-HIAA = 5-hydroxy-indole acetic acid; NE = noradrenaline

were observed in the content of 5-HT ($F_{3,40} = 0.73$, $P = 0.540$) and 5-HIAA ($F_{3,40} = 0.33$, $P = 0.327$) in striatum (data not shown). When evaluating the effects of methamphetamine withdrawal on hippocampus, the results showed dose-dependent significant changes in the contents of 5-HT ($F_{3,42} = 2.56$, $P = 0.068$), 5-HIAA ($F_{3,42} = 3.25$, $P = 0.031$) and NE ($F_{3,41} = 3.57$, $P = 0.022$). *Post hoc* analyses revealed that methamphetamine administration decreased 5-HT (* $P < 0.05$ for dose of 7.5 mg/kg) and NE (* $P < 0.05$ for dose of 2.5 mg/kg) when compared to control rats (Fig. 3b).

Methamphetamine binge administration dose-dependently regulated neurochemical markers following prolonged withdrawal in rat brain

To further evaluate the effects of methamphetamine in rat brain, some key striatal dopaminergic markers (i.e. D2 receptor, DAT, p-TH and DARPP-32) as well as two hippocampal serotonergic markers (i.e. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors) were evaluated by Western blot. As shown in Table 1, prolonged methamphetamine withdrawal did not induce significant changes in any of the selected markers in striatum and/or hippocampus (*versus* control-treated rats). However, when evaluating the effects of methamphetamine withdrawal on the cell fate

regulator FADD, there were region-specific changes in FADD protein forms, with more robust changes observed in hippocampus (Fig. 4). In particular, while a one-way ANOVA did not detect significant changes in striatum for FADD protein ($F_{3,42} = 0.34$, $P = 0.793$), the analysis was significant for p-FADD ($F_{3,38} = 3.07$, $P = 0.039$) and p-FADD/FADD balance ($F_{3,38} = 2.88$, $P = 0.048$). Yet, *post hoc* comparisons did not detect any significant changes among experimental groups (Fig. 4a,b). On the other hand, when evaluating the effects of methamphetamine withdrawal in hippocampus, the results showed significant changes for all protein forms (FADD: $F_{3,39} = 4.81$, $P = 0.006$; p-FADD: $F_{3,41} = 5.67$, $P = 0.002$; p-FADD/FADD balance: $F_{3,37} = 9.64$, $P < 0.001$). *Post hoc* analyses revealed that rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine had decreased FADD content and increased p-FADD/FADD balance (** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ *versus* control rats; Fig. 4c, d) during prolonged withdrawal in hippocampus. Moreover, rats treated with 2.5 mg/kg of methamphetamine showed a significant reduction in p-FADD content (* $P < 0.05$ *versus* control rats; Fig. 4c,d). Methamphetamine binge administration did not alter the content of β -actin ($F_{3,41} = 2.18$, $P = 0.105$), and thus, it was used as a loading control (see representative immunoblots in figure 4b,d).

Increased methamphetamine consumption following prolonged withdrawal is associated with reduced hippocampal FADD protein content

Pearson's correlation coefficients were evaluated to test for possible associations among voluntary metham-

phetamine consumption, the content of brain monoamines and the regulation of neurochemical markers following prolonged withdrawal. The main results showed that in rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine, the amount of methamphetamine consumed during withdrawal negatively correlated with FADD pro-

Table 1 Effects of prolonged methamphetamine withdrawal (25 days) on striatal dopaminergic and hippocampal serotonergic protein markers in rats by Western blot analysis.

	Markers	Control	2.5 mg/kg	5 mg/kg	7.5 mg/kg	ANOVA: $F_{DFn,DFd}$, P value
Striatum	D2	100±6	95±6	105±7	110±15	$F_{3,30} = 0.40, p = 0.752$
	DAT	102±6	84±4	102±6	104±11	$F_{3,35} = 1.34, p = 0.279$
	p-TH	102±8	85±5	94±9	92±8	$F_{3,36} = 0.58, p = 0.633$
	DARPP-32	102±10	104±2	107±7	114±8	$F_{3,38} = 0.30, p = 0.824$
Hippocampus	5-HT _{2A}	100±3	108±6	85±6	107±8	$F_{3,43} = 3.80, p = 0.017$
	5-HT _{2C}	101±5	100±12	119±11	111±6	$F_{3,42} = 1.24, p = 0.307$

D2 = dopamine receptor; DAT = dopamine transporter; p-TH = phosphorylated tyrosine hydroxylase; DARPP-32 = dopamine- and cyclic AMP-regulated neuronal phosphoprotein, Mr 32 kDa; 5-HT_{2A} = serotonin 2A receptor; 5-HT_{2C} = serotonin 2C receptor. Data are means ± SEM of at least three experiments per group and expressed as percentage of the corresponding control-treated group. ANOVAs did not detect significant changes after the various treatments with methamphetamine followed by 25 days of spontaneous withdrawal, except for 5-HT_{2A} regulation on hippocampus, although *post hoc* comparisons did not detect any significant changes among experimental groups.

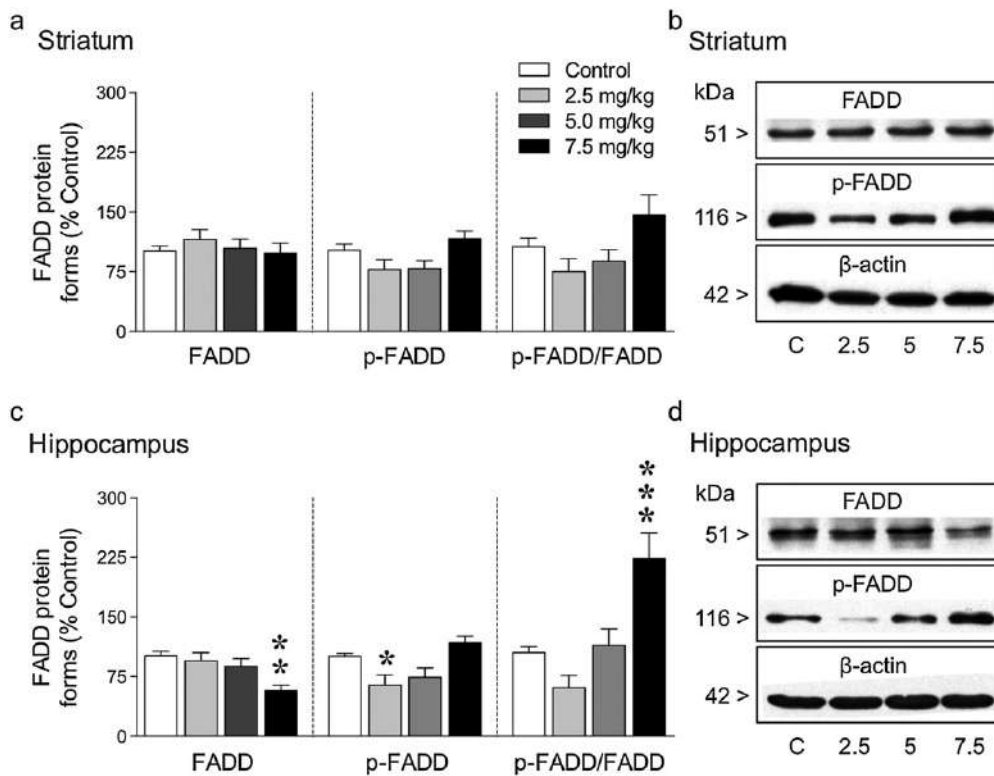


Figure 4 Methamphetamine binge administration dose-dependently regulated Fas-associated protein with death domain (FADD) forms following prolonged withdrawal in rat (a, b) striatum and (c, d) hippocampus. Groups of treatment: Control (saline-treated rats, $n = 15$) and methamphetamine (2.5, 5 and 7.5 mg/kg $\times 3$, i.p., 4 days, $n = 7, 15$ and 10 , respectively). Columns represent mean \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of control-treated rats. One-way ANOVA followed by Dunnett's test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared to the corresponding control group. (b–d) Representative immunoblots depicting labeling of total FADD, p-FADD and the corresponding for β -actin as a loading control in striatum and hippocampus, respectively

tein content in hippocampus ($r = -0.720$, $n = 9$, $P = 0.014$) (Fig. 5).

DISCUSSION

The main results of this study showed that repeated binge methamphetamine administration induced dose-dependent negative effects during prolonged withdrawal in adult rats. In particular, following 25 days of forced withdrawal, rats treated repeatedly with methamphetamine (7.5 mg/kg) showed (1) enhanced negative affect—increased anhedonia associated with behavioral despair, (2) increased voluntary methamphetamine consumption, (3) enhanced neurotoxicity—decreased DA and metabolites in striatum and decreased 5-HT in hippocampus, (4) altered neuroplasticity markers—decreased FADD protein and increased p-FADD/FADD balance selectively in hippocampus and (5) higher consumption rates of methamphetamine during withdrawal were associated with lower FADD content in hippocampus.

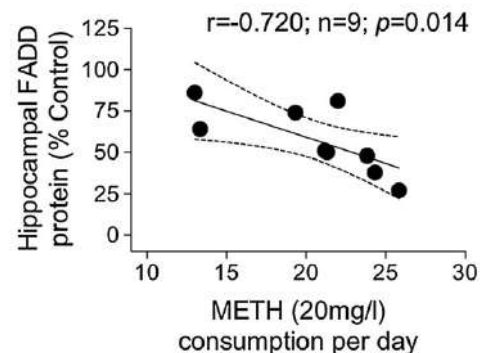
It is well accepted that withdrawal from repeated methamphetamine treatment precipitates in animals behavioral and physiological symptoms similar to the ones described for major depressive disorder, such as despair and anhedonia (Barr *et al.* 2002). In this regard, the present results showed that binge methamphetamine dose-dependently induced negative affect in rats during prolonged withdrawal by showing combined increased time spent immobile in the FST (i.e. a measure of behavioral despair) with reduced sucrose consumption in the two-bottle choice test (i.e. a measure of anhedonia or loss of pleasant stimulus). Prior experiments showed that withdrawal from many drugs, including methamphetamine, led to depressive-like behavior (Iijima, Koike, & Chaki 2013; Hajheidari, Miladi-Gorji, & Bigdeli 2015; Ren *et al.* 2015) and anhedonia in rodents (e.g. Koob 2013). In fact, psychostimulant withdrawal in rodents has been proposed as a model in which to study depressive-like behavior (e.g. Barr *et al.* 2002). In this

line of thought, the present results reinforced this notion, while presented a paradigm to further ascertain the consequences (i.e. rate of voluntary drug consumption) and/or putative neurochemical correlates (i.e. role of FADD) associated with methamphetamine withdrawal.

Prior experiments validated the oral route of methamphetamine self-administration (i.e. two-bottle choice) as a viable alternative to intravenous (i.v.) self-administration procedures for investigating the motivational effects to consume the drug (Wheeler *et al.* 2009). In fact, although the absorption of orally administered methamphetamine occurs more slowly in the intestines (peak plasma levels being reached 180 minutes after dosing; Schepers *et al.* 2003) as compared to more rapid routes (i.v.: cerebral circulation in 10–15 seconds; reviewed in Rawson 2013), prior studies suggested that oral administration resulted in similar enhanced levels of use as the i.v. route (Cruickshank & Dyer 2009). Thus, this study utilized a two-bottle choice test (20 mg/l of drinking methamphetamine over water; e.g. Shabani *et al.* 2016) to ascertain the rate of voluntary drug consumption in methamphetamine-withdrawn rats. In particular, rats with a history of methamphetamine intake (dose of 7.5 mg/kg) showed increased voluntary methamphetamine consumption, which suggested either increased sensitivity to the conditioned rewarding properties of the drug (unlikely due to decreased general reward sensitivity as measured by decreased 1% sucrose consumption) or insensitivity to its aversive effects. Similarly, mice bred for high methamphetamine intake, a genetic selective-breeding model of binge-level drug intake and addiction vulnerability (Shabani *et al.* 2016) showed a profound reduction in sensitivity to the aversive effects of methamphetamine (Shabani *et al.* 2012). In summary, the present results extend recent reports, which showed increased voluntary oral methamphetamine consumption following 2 weeks of withdrawal (Doyle *et al.* 2015; Hajheidari *et al.* 2015), to suggest even more prolonged

Figure 5 Increased methamphetamine consumption following prolonged withdrawal is associated with reduced hippocampal Fas-associated protein with death domain (FADD) protein content. Scatter plot depicting a significant negative correlation between the amount of oral methamphetamine consumed (20 mg/l) and FADD content in hippocampus for rats treated with 7.5 mg/kg of methamphetamine. Each circle represents a different treated rat. The solid line is the best fit for the correlation ($r = -0.720$, $n = 9$, $P = 0.014$). The dotted curves indicate the 95% confidence interval for the regression line. METH = methamphetamine

Methamphetamine withdrawal (7.5 mg/kg)



effects observed up to 45 days following the last methamphetamine administration (i.e. from D4 to D49).

In terms of the neurotoxic effects observed in methamphetamine-withdrawn rats, the present results broaden the prior literature demonstrating drug-induced negative effects in rat brain (e.g. see revisions, Krasnova & Cadet 2009; Moszczynska & Callan 2017) by showing persistent, long-lasting and dose-dependent decreases in striatal contents of DA (and its main metabolites DOPAC and HVA) and decreases in hippocampal 5-HT and NE as measured by HPLC 47 days after the last exposure to methamphetamine. It is worth mentioning that the observed decreases in total monoamines (and metabolites) levels are not sufficient to establish any changes to neurotransmission, as *in vivo* microdialysis will be the minimum requisite to understand these effects (e.g. Yamamoto, Danhof, & de Lange 2017). To further evaluate the possible molecular mechanisms behind these neurotoxic effects, although the literature in experimental animals has proven parallel reductions in dopaminergic (e.g. DAT and TH) and serotonergic (e.g. SERT) markers (see revision, Moszczynska & Callan 2017), the present results showed no changes in any of the protein markers evaluated (dopaminergic: D2 receptor, DAT, p-TH, DARPP-32; serotonergic: 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors) in rat brain following prolonged methamphetamine withdrawal. These results propose that while the contents of brain monoamine neurotransmitters were decreased, some of the key receptors and molecules that mediate their effects were intact, suggesting that changes in neurotransmission *per se* may not be involved in the observed behavioral changes or proposing a different time-course in the recovery from the damage caused by methamphetamine. In fact, possible adaptive mechanisms might take place (i.e. see role of FADD below), such as increased synthesis of monoamine neurotransmitters markers and upregulation of function of its signaling in an attempt to compensate for the prior neurotoxic damage (see detail discussion in revision by Moszczynska & Callan 2017).

In this regard, repeated administration of methamphetamine (dose of 7.5 mg/kg) resulted in decreased FADD protein content and increased p-FADD/FADD balance (i.e. a putative neuroplasticity marker; Ramos-Miguel *et al.* 2012) selectively in hippocampus of withdrawn rats. Similarly, neuroprotective pathways (decreased Fas) were activated following voluntary methamphetamine oral consumption (Wheeler *et al.* 2009). Thus, although differences in the pathways related to apoptosis are known to be involved in methamphetamine-induced neurotoxicity (e.g. Cadet, Jayanthi, & Deng 2003), the effects seem to be regulated in a time-course manner, with neurotoxicity observed up to 24-hour post-methamphetamine administration but normalized 1 week later (Jayanthi *et al.* 2005). Moreover,

experiments done with a different amphetamine-like psychostimulant such as MDMA also showed reduced content of FADD, Bax and cytochrome c in rat hippocampus following repeated administration (García-Cabrerizo & García-Fuster 2015), which suggested, as apoptosis was not triggered, the induction of neurochemical changes. Accordingly, the present results replicated previously accepted neurotoxicity effects (i.e. decreased DA and metabolites in striatum and decreased 5-HT and NE in hippocampus) paired with normalized monoaminergic neurotransmitter signaling but decreased FADD (and increased p-FADD/FADD balance) content selectively in hippocampus, suggesting the induction of neural plasticity and/or repair mechanisms to a prior drug insult (i.e. neurochemical adaptations). The regulation of FADD adaptor during methamphetamine withdrawal further supports the role of this multifunctional protein outside of the apoptotic pathway, thus reinforcing its function as a major signaling step in adaptive cell responses (see prior studies, e.g. García-Fuster *et al.* 2007, 2014; García-Fuster & García-Sevilla 2016; Ramos-Miguel *et al.* 2012, 2017). Future studies will attempt to ascertain a possible mechanistic link between the observed behaviors and changes in hippocampal FADD adaptor. In this regard, a recent study also showed a combination of depressive-like behavior (including anhedonia) and increased BDNF (i.e. a marker of neural plasticity) content during prolonged methamphetamine withdrawal in mice (Ren *et al.* 2015). Moreover, in terms of the observed region-specific FADD regulation, prior studies also showed similar results, with specific effects observed in hippocampus as compared to other brain regions (e.g. striatum and/or prefrontal cortex, see García-Cabrerizo *et al.* 2015; Hernández-Hernández *et al.* 2017). Interestingly, methamphetamine-induced hippocampal changes are particularly relevant given the role of this brain region in learning, memory and executive functioning and given the well-known deficits in cognitive performance that occur during methamphetamine withdrawal (see Moszczynska & Callan 2017). In this context, two recent studies from our group showed an association between loss of FADD protein and cognitive decline either in an elderly human population (Ramos-Miguel *et al.* 2017) or in rats (Hernández-Hernández *et al.* 2017). The present results showed that rats with higher voluntary intake of methamphetamine showed less hippocampal FADD suggesting that hippocampal FADD regulation paralleled the long-lasting behavioral abnormalities taking place during methamphetamine withdrawal such as cognitive decline, and therefore, drugs that manipulate FADD (e.g. procognitive drugs increase FADD in parallel to improving cognitive performance, see Hernández-Hernández *et al.* 2017) might confer beneficial effects against this symptom.

In summary, the present data demonstrated that binge methamphetamine exposure dose-dependently induced persistent negative affect during withdrawal as observed by two core symptoms of depression (i.e. behavioral despair and anhedonia), together with deficits in striatal DA and hippocampal 5-HT contents, thus validating this drug paradigm as a good model in which to further study methamphetamine withdrawal syndrome. In particular, rats exposed to a prior history of methamphetamine (7.5 mg/kg) showed increased voluntary methamphetamine consumption in association with region-specific changes in hippocampal FADD protein forms, suggesting a possible role that deserves further mechanistic exploration, for this neuroplasticity marker in the adaptations taking place in this brain region during prolonged methamphetamine withdrawal.

Acknowledgements

This study was supported by Fundación Alicia Koplowitz and partly by Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (grant numbers 2012/011 and 2016/002, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain) to M.J.G.-F. R.G.-C. was supported by a predoctoral fellowship (Consejería de Innovación, Investigación y Turismo del Gobierno de las Islas Baleares y del Fondo Social Europeo). M.J.G.-F. is a 'Ramón y Cajal' Researcher (MINECO-UIB) and a member of RETICS-RTA (RD12/0028/0011 and RD16/0017/001; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER).

Authors Contribution

M.J.G.-F. and R.G.-C. were responsible for the study concept and design. R.G.-C. conducted the experiments. R. G.-C. and M.J.G.-F. analyzed the data, and M.J.G.-F. drafted the manuscript. Both authors contributed to and have approved the final version for publication.

References

- Alappatt EC, Feig C, Boyerinas B, Vokland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at Serine 194 by CK1 α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19:321–332.
- Barr AM, Markou A, Phillips AG (2002) A 'crash' course of psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends Pharmacol Sci* 23:475–482.
- Cadet JL, Jayanthi S, Deng X (2003) Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *FASEB J* 17:1755–1788.
- Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, Carvalho F, Bastos Mde L (2012) Toxicity of amphetamines: an update. *Arch Toxicol* 86:1167–1231.
- Cruikshank CC, Dyer KR (2009) A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 104:1085–1099.
- Doyle SE, Feng H, Garber G, Menaker M, Lynch WJ (2015) Effects of circadian disruption on methamphetamine consumption in methamphetamine-exposed rats. *Psychopharmacology* 232:2169–2179.
- García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ (2015) Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: down-regulation of apoptotic markers. *Neurotoxicology* 49:104–113.
- García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ (2016a) Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages. *Neurotoxicology* 56:29–39.
- García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ (2016b) Prolonged methamphetamine withdrawal elicits voluntary drug consumption associated with enhanced negative affect. *The 10th FENS Forum of Neuroscience*, abstract: FENS-0684.
- García-Cabrerizo R, Keller B, García-Fuster MJ (2015) Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability: consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304:302–315.
- García-Fuster MJ, Díez-Alarcía R, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2014) FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: basal contents and effects of psychotropic treatments. *Neuroscience* 277:541–551.
- García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2016) Effects of antidepressant treatments on FADD and p-FADD protein in rat brain cortex: enhanced anti-apoptotic p-FADD/FADD ratio after chronic desipramine and fluoxetine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 233:2955–2971.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399–411.
- Hajheidari S, Miladi-Gorji H, Bigdeli I (2015) Effect of the environmental enrichment on the severity of psychological dependence and voluntary methamphetamine consumption in methamphetamine withdrawn rats. *Neurosci Lett* 584:151–155.
- Hernández-Hernández E, Miralles A, Esteban S, García-Fuster MJ (2017) Repeated treatment with the α_2 -adrenoceptor agonist UK-14304 improves cognitive performance in middle-age rats: role of hippocampal FADD. *J Psychopharmacol*. <https://doi.org/10.1177/0269881117742667>.
- Iijima M, Koike H, Chaki S (2013) Effect of an mGlu2/3 receptor antagonist on depressive behavior induced by withdrawal from chronic treatment with methamphetamine. *Behav Brain Res* 246:24–28.
- Jayanthi S, Deng X, Ladenheim B, McCoy MT, Cluster A, Cai NS, Cadel JL (2005) Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:868–873.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160:1577–1579.
- Koob GF (2013) Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Front Psych* 4:72.
- Kraeuchi K, Rudolph K, Wirz-Justice A, Feer H (1985) Similarities in feeding behavior of chronic methamphetamine treated and withdrawn rats to VMH lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav* 23:917–920.
- Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev* 60:379–407.

- Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA (2009) Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:61–72.
- Morgan CD, Cattabeni F, Costa E (1972) Methamphetamine, fenfluramine and their N-dealkylated metabolites: effect on monoamine concentrations in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 180:127–135.
- Moszczynska A, Callan SP (2017) Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: implications for treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 362:474–488.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445–1449.
- Ramos-Miguel A, Álvaro-Bartolomé M, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2012) Role of multifunctional FADD (Fas-Associated Death Domain) adaptor in drug addiction (Chapter 7). In: Belin D ed. *Addictions—From Pathophysiology to Treatment*. InTech Open ISBN: 978-953-51-0783-5.
- Ramos-Miguel A, García-Sevilla JA, Barr AM, Bayer TA, Falkai P, Leurgans SE, Schneider JA, Bennett DA, Honer WG, García-Fuster MJ (2017) Decreased cortical FADD protein is associated with clinical dementia and cognitive decline in an elderly community sample. *Mol Neurodegener* 12:26.
- Rawson RA (2013) Current research on the epidemiology, medical and psychiatric effects, and treatment of methamphetamine use. *J Food Drug Anal* 21:S77–S81.
- Ren Q, Ma M, Yang C, Zhang JC, Yao W, Hashimoto K (2015) BDNF-TrkB signaling in the nucleus accumbens shell of mice has key role in methamphetamine withdrawal symptoms. *Transl Psychiatry* 5:e666.
- Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res* 235:93–103.
- Schepers RJ, Oyler JM, Joseph RE, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA (2003) Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin Chem* 49:121–132.
- Shabani S, Houlton SK, Hellmuth L, Mojica E, Mootz JR, Zhu Z, Reed C, Phillips TJ (2016) A mouse model for binge-level methamphetamine use. *Front Neurosci* 10:493.
- Shabani S, McKinnon CS, Cunningham CL, Phillips TJ (2012) Profound reduction in sensitivity to the aversive effects of methamphetamine in mice bred for high methamphetamine intake. *Neuropharmacology* 62:1134–1141.
- Slattery DA, Cryan JF (2017) Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology (Berl)* 234:1451–1465.
- Slattery DA, Markou A, Cryan JF (2007) Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 190:555–568.
- Steinkellner T, Freissmuth M, Sitte HH, Montgomery T (2011) The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and D-amphetamine. *Biol Chem* 392: 103–115.
- Teixeira-Gomes A, Costa VM, Feio-Azevedo R, Bastos ML, Carvalho F, Capela JP (2015) The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int J Dev Neurosci* 41:44–62.
- Torney J, Lasagna L (1960) Relation of thyroid function to acute and chronic effects of amphetamine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 128:201–209.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2015) World drug report. *United Nations Publication Sales No. E15. XI6*. Vienna.
- Wheeler JM, Reed C, Burkhart-Kasch S, Li N, Cunningham CL, Janowsky A, Franken FH, Wiren KM, Hashimoto JG, Scibelli AC, Phillips TJ (2009) Genetically correlated effects of selective breeding for high and low methamphetamine consumption. *Genes Brain Behav* 8:758–771.
- Yamamoto Y, Danhof M, de Lange ECM (2017) Microdialysis: the key to physiologically based model prediction of human CNS target site concentrations. *AAPS J* 19:891–909.

ARTÍCULO VII

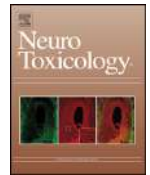
Methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage following prolonged withdrawal in rats

García-Cabrerizo R, Bis-Humbert C and García-Fuster MJ

NeuroToxicology, 2018; 66: 1-9

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar si los efectos negativos observados tras la administración de metanfetamina en la ventana de vulnerabilidad (adolescencia tardía, véase Artículo IV) perduraban tras un largo período de abstinencia hasta la etapa adulta. Los resultados mostraron que los efectos negativos inducidos tras la administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía en el hipocampo (disminución de la supervivencia celular y BDNF maduro) sí perduraban en el tiempo tras un largo período de abstinencia. Además, la disminución observada de los niveles de BDNF maduro mostró una correlación con los niveles de activación neuronal (c-Fos) en el hipocampo, poniendo de manifiesto alteraciones en la supervivencia celular que pueden perdurar hasta la etapa adulta.



Full Length Article

Methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage following prolonged withdrawal in rats



Rubén García-Cabrerizo^{a,b}, Cristian Bis-Humbert^{a,b}, M. Julia García-Fuster^{a,b,*}

^a IUNICS, University of the Balearic Islands, Palma, Spain

^b Balearic Islands Health Research Institute (IdISBa), Palma, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2017

Received in revised form 22 January 2018

Accepted 26 February 2018

Available online 6 March 2018

Keywords:

Methamphetamine

Withdrawal

Neurotoxicity

Neurogenesis

Neuroplasticity

Age

ABSTRACT

A recent study from our laboratory demonstrated that binge methamphetamine induced hippocampal cell damage (i.e., impaired cell genesis) in rats when administered specifically during late adolescence (postnatal day, PND 54–57) and evaluated 24 h later (PND 58). The results also suggested a possible role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulating cell genesis and survival. This subsequent study evaluated whether these effects persisted in time as measured following prolonged withdrawal. Male Sprague-Dawley rats were treated (i.p.) with BrdU (2×50 mg/kg, 3 days, PND 48–50) followed by a binge paradigm (3 pulses/day, every 3 h, 4 days, PND 54–57) of methamphetamine (5 mg/kg, $n = 14$, M) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, $n = 12$, C). Following 34 days of forced withdrawal (PND 91), rats were killed 45 min after a challenge dose of saline (Sal: C-Sal, $n = 6$; M-Sal, $n = 7$) or methamphetamine (Meth: C-Meth, $n = 6$; M-Meth, $n = 7$). Neurogenesis markers (Ki-67: cell proliferation; NeuroD: early neuronal survival; BrdU: prolonged cell survival, 41–43 days old cells) were evaluated by immunohistochemistry while neuroplasticity markers (BDNF and Fos forms) were evaluated by Western blot. The main results showed that a history of methamphetamine administration (PND 54–57) induced enduring hippocampal cell damage (i.e., observed on PND 91) by decreasing cell survival (BrdU+ cells) and mature-BDNF (m-BDNF) protein content, associated with neuronal survival, growth and differentiation. Interestingly, m-BDNF regulation paralleled hippocampal c-Fos protein content, indicating decreased neuronal activity, and thus reinforcing the persisting negative effects induced by methamphetamine in rat hippocampus following prolonged withdrawal.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Methamphetamine is a highly abused psychostimulant, which is typically self-administered in a binge manner (i.e., repeated frequent administration in short periods of time) (UNODC, 2015). Although several factors could account for its neurotoxic effects (e.g., Steinkellner et al., 2011; Halpin et al., 2014), for the purpose of this study only two will be considered. First, methamphetamine induces neurotoxicity in experimental animals in a dose-dependent manner (see revision, Moszczynska and Callan, 2017), and specifically at high doses (e.g., García-Cabrerizo and García-Fuster, 2017), which has been shown to be particularly damaging in certain brain regions (e.g., reducing the volume of hippocampus

while inducing cell death) both in animals and humans (e.g., Thompson et al., 2004; Hori et al., 2010; Thanos et al., 2016). Second, given that the initiation in psychostimulant drug consumption starts during adolescence and young adulthood (SAMHSA, 2002), and considering early age as a vulnerability factor that will affect how drugs will impact brain function and behavior (Spear, 2007), the age of methamphetamine exposure will be crucial for its neurotoxic outcome (Brunell and Spear, 2006; Teixeira-Gomes et al., 2015). Against this background, a recent study from our research group showed that the effects of methamphetamine on cell genesis toxicity (i.e., impaired hippocampal neurogenesis) depended on the accumulative dose administered, and on the age of the rat when the drug was administered (García-Cabrerizo and García-Fuster, 2016). In particular, methamphetamine effects were observed following a binge paradigm administration (5 mg/kg, every 3 h) for 4 consecutive days (i.e., 12 drug injections for an accumulative dose of 60 mg/kg) but not after 1 day (i.e., 3 drug injections for an

* Corresponding author at: IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa km 7.5, E-07122, Palma, Spain.

E-mail address: j.garcia@uib.es (M. J. García-Fuster).

accumulative dose of 15 mg/kg, and only when the drug was administered during late adolescence/young adulthood period (postnatal day, PND 54–57) but not earlier during adolescence (PND 33–36) (García-Cabrero and García-Fuster, 2016). Moreover, the results suggested a possible role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on regulating cell genesis and survival (García-Cabrero and García-Fuster, 2016), in agreement with its critical role for survival and preservation of neurons in the brain (Mattson et al., 2004).

Considering that during methamphetamine withdrawal many behavioral consequences emerge (i.e., cognitive deficits, intense drug craving, brain neurotoxicity; e.g., Rogers et al., 2008), which are likely linked to the propensity to drug relapse (see revision, Mszczynska and Callan, 2017), the present follow up study aimed at evaluating whether the negative effects – decreased hippocampal neurogenesis and neuroplasticity markers – of administering methamphetamine during late adolescence (PND 54–57) persisted in time as measured following 34 days of prolonged withdrawal. In particular, hippocampal neurogenesis was evaluated at different stages (Ki-67: cell proliferation; NeuroD: early neuronal survival; BrdU: prolonged cell survival, 41–43 days old cells) by immunohistochemistry while the contents of key neuroplasticity markers (BDNF and Fos forms) were evaluated by Western blot.

2. Materials and methods

2.1. Rats

Male Sprague-Dawley rats ($n = 26$) were bred at the University of the Balearic Islands. At weaning (PND 21) rats were housed in groups of 2–3 in standard cages and in controlled environmental conditions (22 °C, 70% humidity, and 12-h light/dark cycle, lights on at 8:00 a.m.) with *ad libitum* access to a standard diet and tap water. Prior to any experimental procedure, rats were habituated to the experimenter by being handled on two separate days (PND 45 and 47, see Fig. 1a). Animal care and experimental procedures

complied with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010; McGrath et al., 2010) and were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Bioethical Committee (UIB-CAIB). All efforts were made to minimize the number of rats used and their suffering.

2.2. Drug treatment and tissue collection

As depicted in Fig. 1a, rats were treated with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 2×50 mg/kg, i.p.; Calbiochem, USA) delivered at 12 h intervals for 3 consecutive days (PND 48–50) as previously described (García-Fuster et al., 2010). Then, rats received a binge paradigm (3×5 mg/kg per day, i.p., every 3 h) for 4 consecutive days (PND 54–57; Fig. 1a) with (+)-methamphetamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, MO, USA) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg per day, i.p.). The dose of methamphetamine (pulses of 5 mg/kg: total accumulative dose of 60 mg/kg) and age of administration (PND 54–57) were selected based on a previous study from our research group showing hippocampal cell damage on PND 58 (García-Cabrero and García-Fuster, 2016). Other studies with similar methamphetamine drug regimens also showed changes in brain neurochemistry (see reviews, Teixeira-Gomes et al., 2015; Mszczynska and Callan, 2017).

Rats were weighted every day during the course of BrdU (PND 48–50) and drug treatment (PND 54–57) administration. Rectal temperature was measured before any drug treatment (baseline levels at PND 54) and daily 30 min after the last daily pulse of methamphetamine (PND 54–57). Then, rats were left undisturbed (forced withdrawal) for 34 days (PND 91). This prolonged length of the withdrawal period was chosen based on prior experiments in which at least 4 weeks of forced withdrawal led to hippocampal neural adaptations (e.g., García-Fuster et al., 2012; García-Cabrero and García-Fuster, 2017), as drug delayed neurobiological effects during prolonged withdrawal likely contribute to an increased vulnerability to relapse. On PND 91, rats were weighted

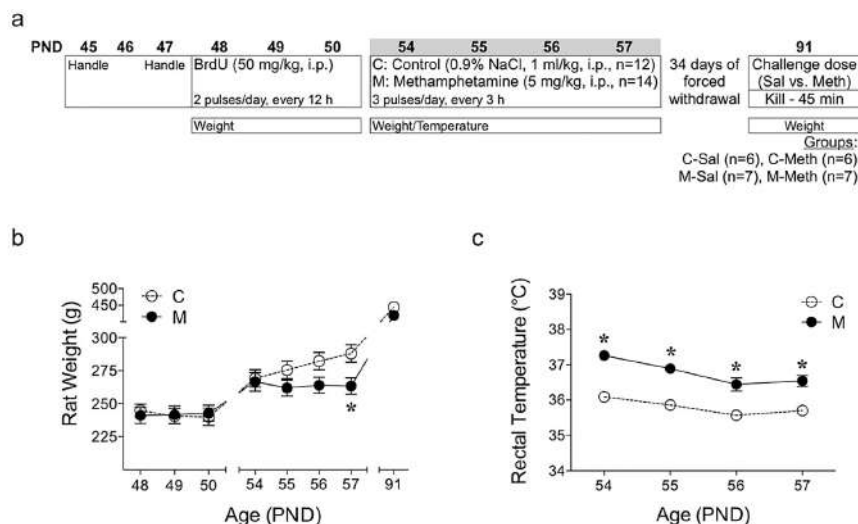


Fig. 1. Experimental design. (a) Male Sprague-Dawley rats were exposed to the procedures described at the indicated postnatal days (PND). Adolescent rats were treated with BrdU (2×50 mg/kg, i.p., 3 days, PND 48–50) and then with a binge paradigm (3 pulses per day, i.p., every 3 h, for 4 days, PND 54–57) of methamphetamine (5 mg/kg, $n = 14$, M) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, $n = 12$, C). Following 34 days of prolonged withdrawal (PND 91), rats were killed 45 min after a challenge dose of saline (Sal) or 5 mg/kg of methamphetamine (Meth) and their brains removed and dissected for further analysis: (1) the left-side hippocampus for evaluating cell genesis markers by immunohistochemistry, and (2) the right-side hippocampus for evaluating neuroplasticity markers by Western blot. Groups of treatment: C-Sal, $n = 6$, C-Meth, $n = 6$, M-Sal, $n = 7$, M-Meth, $n = 7$. (b) Effect of drug treatment (BrdU and binge methamphetamine vs. saline) across days (PND 48–57 and PND 91) on rat body weight. * $p < 0.05$ vs. C on PND 57 (two-way repeated measures ANOVA followed by multiple *t*-tests). (c) Effect of methamphetamine treatment across days (PND 54–57) on rectal temperature in young rats. At least * $p < 0.001$ vs. C (two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's).

and challenged with a single dose of saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.) or methamphetamine (5 mg/kg, i.p.) and killed by decapitation without anesthesia 45 min later (Fig. 1a). The left half-brain was quickly frozen in -30°C isopentane and stored at -80°C until further processing. For each animal, 30 μm sections were cryostat cut and slide-mounted throughout the entire hippocampal extent (-1.72 to -6.80 mm from Bregma) and kept at -80°C until cell genesis markers (i.e., Ki-67 for cell proliferation, NeuroD for early neuronal survival, and BrdU for the survival of 41–43 days old cells; García-Fuster et al., 2010, 2011) were analyzed by immunohistochemistry. The right hippocampus was freshly dissected and frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until neuroplasticity markers (i.e., BDNF and Fos protein forms) were analyzed by Western blot experiments.

2.3. Immunohistochemistry analysis

The rate of recent cell proliferation – all dividing cells within a cell cycle time of 25 h (Ki-67 cell labeling; Cameron and McKay, 2001), neural progenitors proliferation – a transient transcription factor restricted to developing neurons (NeuroD cell labeling; e.g., Lee, 1997; Miyata et al., 1999), and cell survival – BrdU labeling, which incorporated into newly synthesized DNA strands of actively proliferating cells (e.g., Wojtowicz and Kee, 2006) at the time of injection (i.e., 41–43 days old cells) were evaluated in hippocampal tissue sections (30 μm) that were post-fixed in 4% paraformaldehyde as previously described in detail (García-Fuster et al., 2010, 2011). Briefly, following several steps such as antigen retrieval, blocking in peroxidase solution and BSA containing 1% serum and 0.05% Triton X-100 (see protocol in detail; García-Fuster et al., 2010, 2011), sections were incubated overnight with one of the following antibodies: (1) rabbit polyclonal anti-Ki-67 (1:40000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson, University of Michigan), (2) goat polyclonal anti-NeuroD (N-19) (1:2500; Santa Cruz Biotechnology), or (3) rabbit polyclonal anti-BrdU (1:40000; kindly provided by Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson, University of Michigan). The next day sections were incubated with biotinylated anti-rabbit or anti-goat secondary antibody 1:1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Bound antibody was detected with Avidin/Biotin complex (Vectastain Elite ABC kit; Vectors Laboratories) and the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (with nickel chloride for NeuroD) was used for visualization of signal. Finally, tissue was counterstained with cresyl violet, dehydrated in graded alcohols, immersed in xylene and coverslipped using Permount[®] mounting medium. The number of immunostained positive cells in every 8th section was quantified by a blind experimenter to the treatment groups throughout the hippocampal extent with a Leica DMR light microscope (63X objective lens) and focusing through the thickness of the section. The overall quantified area (mm^2) in each section was measured with a densitometer (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, BioRad) for all rats, and thus, the results are expressed as the total number of proliferating (Ki-67+) or surviving (early survival, NeuroD+; long-term survival, BrdU+) cells in the dentate gyrus divided by the total area analyzed (mm^2). This quantification method corrects for possible different areas of analysis among different treatment groups (Amrein et al., 2011; García-Cabrero et al., 2015; García-Cabrero and García-Fuster, 2016), which is particularly relevant when comparing the overall content of different cell markers (Ki-67, NeuroD and BrdU labeling).

2.4. Western blot analysis

As previously described in detail (García-Cabrero and García-Fuster, 2015), 40 μg of each hippocampal homogenate was resolved by electrophoresis on 10–12% SDS-PAGE minigels (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight at 4°C in blocking solution containing the appropriate primary antibody whose vendors and dilution conditions were the following: (1) Santa Cruz Biotechnology (CA, USA): anti-BDNF (N-20) (1:2500), anti-c-Fos (F-25) (1:1000), anti-Fos B (H-237) (1:750), which recognized Fos B and Δ Fos B protein forms, and (2) Sigma-Aldrich (MO, USA): anti- β -actin (clone AC-15) (1:10000). The next day, membranes were incubated (1 h, room temperature) in secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse IgG linked to horseradish peroxidase; 1:5000 dilution; Cell Signaling). The signal of bound antibody was visualized by exposing membranes, priorly incubated with ECL reagents (Amersham, Buckinghamshire, UK), in contact with an autoradiographic film (Amersham ECL Hyperfilm) for 1–60 min which was then quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, Bio-Rad). The content of BDNF or Fos protein forms for each treatment group was compared in the same gel with that of control treated rats (PND 54–57) challenged at PND 91 with saline (C-Sal). Thus, the percent change in immunoreactivity with respect to C-Sal samples (100%) was calculated for each treated rat in each gel. This process was repeated at least 3 times in different gels (i.e., each gel with different brain samples), and the mean value was used as a final estimate. β -actin served as a loading control as its content was not altered by any treatment conditions.

2.5. Data and statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism, Version 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean values \pm standard error of the mean (SEM). Changes in body weight or core temperature were evaluated by two-way repeated measures ANOVAs followed by multiple *t*-tests or Sidak's multiple comparisons test, in which Treatment (C, control; M, methamphetamine) and Day (PND 48–91 or PND 54–57, respectively) were treated as independent variables. When evaluating the effects of binge methamphetamine administration on the regulation of hippocampal neurogenesis (by immunohistochemistry) or neurochemical markers (by Western blot) following 34 days of forced withdrawal (PND 91), a two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test, with Treatment (PND 54–57: C vs. M) and Challenge (PND 91: Sal vs. Meth) as independent variables was used. Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible associations among variables. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of drug treatment across days on body weight and core temperature in rats

As shown in Fig. 1b, rat's weight gain did not change throughout the duration of BrdU administration (PND 48–50), but was reduced during methamphetamine administration (PND 54–57) as demonstrated by a Treatment \times Day interaction ($F_{7,168} = 13.40$, $p < 0.001$). Multiple *t*-tests revealed a significant drop in weight gain for rats repeatedly treated with methamphetamine (PND 57, $*p < 0.05$) when compared to control treated rats (see Fig. 1b). These results replicated previously described anorexigenic effects of methamphetamine when administered at this window of late adolescence (PND 54–57) and with the same dosage regimen (see García-Cabrero and García-Fuster, 2016). Interestingly, the effects of repeated methamphetamine on body weight did not persist over time, as there were no significant weight differences on PND 91 following 34 days of forced withdrawal (see 91, Fig. 1b). These results were expected as previous results showed that food intake

increased during methamphetamine withdrawal to match controls (e.g., Torney and Lasagna, 1960; Kraeuchi et al., 1985). A recent study from our group observed similar results in adult rats that were treated following the same dosage regimen (i.e., 5 mg/kg, 3 times per day for 4 days) (i.e., drop in body weight induced by methamphetamine followed by body weight normalization during withdrawal as compared to control-treated rats; see García-Cabrero and García-Fuster, 2017).

Before drug treatment, the two experimental groups showed no overall basal differences in core body temperature (C, $36.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ vs. M, $36.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$, data not shown), therefore, changes in body temperature caused by treatment were directly compared daily between both experimental groups. A two-way repeated measures ANOVA detected a significant effect of Treatment ($F_{1,24} = 24.90$, $p < 0.001$). In particular, post-hoc analyses revealed that binge methamphetamine administration increased daily body core temperature (at least $*p < 0.001$) when compared to control treated rats (see Fig. 1c). Moreover, there was a significant effect of Day ($F_{3,72} = 11.20$, $p < 0.001$) suggesting the induction of tolerance to methamphetamine induced hyperthermia following repeated exposure (i.e., smaller increase in body temperature by methamphetamine: PND 57 vs. PND 54, $p < 0.001$, Tukey's multiple comparisons test; significance not represented in Fig. 1c), as previously suggested by others (e.g., Myles et al., 2008).

3.2. Methamphetamine binge administration effects on hippocampal neurogenesis in rats following 34 days of prolonged withdrawal

When evaluating hippocampal recent cell proliferation (Ki-67+ cells/area), the results showed a significant Treatment (PND 54–57) x Challenge (PND 91) interaction ($F_{1,22} = 5.03$, $p = 0.035$), and a significant effect of Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 10.82$, $p = 0.003$). Sidak's post-hoc analysis revealed that acute methamphetamine administration impaired cell proliferation as observed 45 min post injection in control treated rats (PND 54–57) challenged with a single dose of methamphetamine at PND 91 (C-Meth: -13 ± 3 cells/area, $**p < 0.01$ vs. C-Sal; see Fig. 2a and d). Moreover, when evaluating early cell survival (NeuroD+ cells/area), the results showed no significant effect of Treatment (PND 54–57: $F_{1,22} = 0.40$, $p = 0.534$), Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 0.23$, $p = 0.638$) nor a Treatment x Challenge interaction ($F_{1,22} = 0.50$, $p = 0.485$) (see Fig. 2b and e). Finally, as described earlier, BrdU was administered on PND 48–50 (see Fig. 1a) to label newborn cells prior to any drug treatment (PND 54–57). Interestingly, when evaluating the survival of these BrdU+ cells/area on PND 91 (i.e., age of cells: 41–43 days old), the results showed a significant effect of Treatment (PND 54–57: $F_{1,20} = 11.56$, $p = 0.003$), but no effect of Challenge (PND 91: $F_{1,20} = 0.11$, $p = 0.747$) or Treatment x Challenge interaction ($F_{1,20} = 0.32$, $p = 0.580$) (see Fig. 2c and f). In particular, besides the overall effect of Treatment (C vs. M during PND 54–57) on decreasing BrdU+ cells, Sidak's multiple comparisons test revealed a significant decrease in the number of BrdU+ surviving cells in rats exposed to methamphetamine during late adolescence (M-Sal: -24 ± 8 cells/area, $*p < 0.05$ vs. C-Sal; see Fig. 2c and f).

3.3. Methamphetamine binge administration effects on hippocampal cell plasticity markers in rats following 34 days of prolonged withdrawal: role of m-BDNF and c-Fos proteins

The first cell plasticity marker evaluated by Western blot was BDNF, which is initially synthesized as a precursor protein (pro-BDNF) that is then processed into a mature form (m-BDNF) (Lu, 2003). When evaluating the content of pro-BDNF in hippocampus, the results showed no significant effects of Treatment (PND 54–57: $F_{1,22} = 2.77$, $p = 0.110$), Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 0.27$, $p = 0.610$) and no Treatment x Challenge interaction ($F_{1,22} = 0.02$, $p = 0.879$) (see

Fig. 3a and b). However, when evaluating the content of m-BDNF, a two-way ANOVA detected a significant effect of Treatment ($F_{1,22} = 14.44$, $p = 0.001$) and Challenge ($F_{1,22} = 18.06$, $p < 0.001$). Sidak's multiple comparison tests revealed that a single dose of methamphetamine on PND 91 decreased m-BDNF (C-Meth: $-26 \pm 7\%$, $**p < 0.01$ vs. C-Sal) and that repeated methamphetamine administration during late adolescence induced enduring effects on reducing m-BDNF (M-Sal: $-24 \pm 7\%$, $**p < 0.01$ and M-Meth: $-39 \pm 7\%$, $***p < 0.001$ vs. C-Sal; see Fig. 3a and b).

Moreover, the following neuroplasticity markers from the Fos family proteins (e.g., Santos et al., 2017), c-Fos, Fos B and its truncated splice variant Δ Fos B (e.g., McClung et al., 2004), were also evaluated in hippocampus. The results showed no significant effects of Treatment (PND 54–57: $F_{1,22} = 3.55$, $p = 0.073$), Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 0.97$, $p = 0.335$) and no Treatment x Challenge interaction ($F_{1,22} = 0.33$, $p = 0.573$) for c-Fos protein content (see Fig. 3c and d). However, when evaluating Fos B the results were as follows: effect of Treatment (PND 54–57: $F_{1,22} = 8.92$, $p = 0.007$), effect of Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 3.69$, $p = 0.068$), Treatment x Challenge interaction ($F_{1,22} = 4.29$, $p = 0.050$). Sidak's multiple comparison tests revealed that a single dose of methamphetamine on PND 91 decreased Fos B (C-Meth: $-7.7 \pm 3\%$, $*p < 0.05$ vs. C-Sal) and that repeated methamphetamine administration during late adolescence induced enduring effects on reducing Fos B (M-Sal: $-9.7 \pm 3\%$, $**p < 0.01$ and M-Meth: $-9 \pm 3\%$, $**p < 0.01$ vs. C-Sal; see Fig. 3c and d). Finally, when evaluating Δ Fos B the results showed no significant effects of Treatment (PND 54–57: $F_{1,22} = 1.08$, $p = 0.309$), Challenge (PND 91: $F_{1,22} = 0.70$, $p = 0.411$) and no Treatment x Challenge interaction ($F_{1,22} = 0.26$, $p = 0.618$) (see Fig. 3c and d).

Finally, to test for possible associations among variables (i.e., Ki-67, NeuroD, BrdU, pro-BDNF, m-BDNF, c-Fos, Fos B and Δ Fos B) Pearson's correlation coefficients were calculated for all methamphetamine treated rats (C-Meth, M-Sal and M-Meth). Interestingly, only one association came out statistically significant: m-BDNF protein content positively correlated with that of c-Fos ($r = 0.678$, $n = 20$, $p = 0.001$), but not with that of Fos B ($r = -0.204$, $n = 20$, $p = 0.387$) or Δ Fos B ($r = 0.046$, $n = 20$, $p = 0.846$) in hippocampus (Fig. 3e) (data not shown for other statistically non-significant correlations).

4. Discussion

The main results of this study indicated that a history of methamphetamine administration during early age (PND 54–57) induced enduring hippocampal cell damage following 34 days of forced withdrawal (i.e., as observed on PND 91) by decreasing cell survival (BrdU+ cells) and m-BDNF protein content. Interestingly, m-BDNF regulation paralleled hippocampal c-Fos protein content, indicating decreased neuronal activity, and thus reinforcing the persisting negative effects induced during methamphetamine withdrawal in rat hippocampus.

In a prior study, the same paradigm of binge methamphetamine administration (PND 54–57) used in the present study reduced hippocampal cell proliferation as measured 24 h after the last dose on PND 58 (see García-Cabrero and García-Fuster, 2016). This follow up study revealed enduring hippocampal cell damage (i.e., observed on PND 91) by decreasing cell survival (41–43 days old BrdU+ cells), while had no effect on recent cell proliferation (Ki-67+ cells) or early neuronal survival (NeuroD+ cells). These results help understand how methamphetamine administration (i.e., long-term and immediate effects) affects the distinct stages of neurogenesis. It is well known that establishing adequate protocols to study cell genesis is critical to correctly evaluate cells that are at different stages of maturation along the neurogenesis process (e.g., García-Fuster et al., 2010, 2011). In this context, the present study

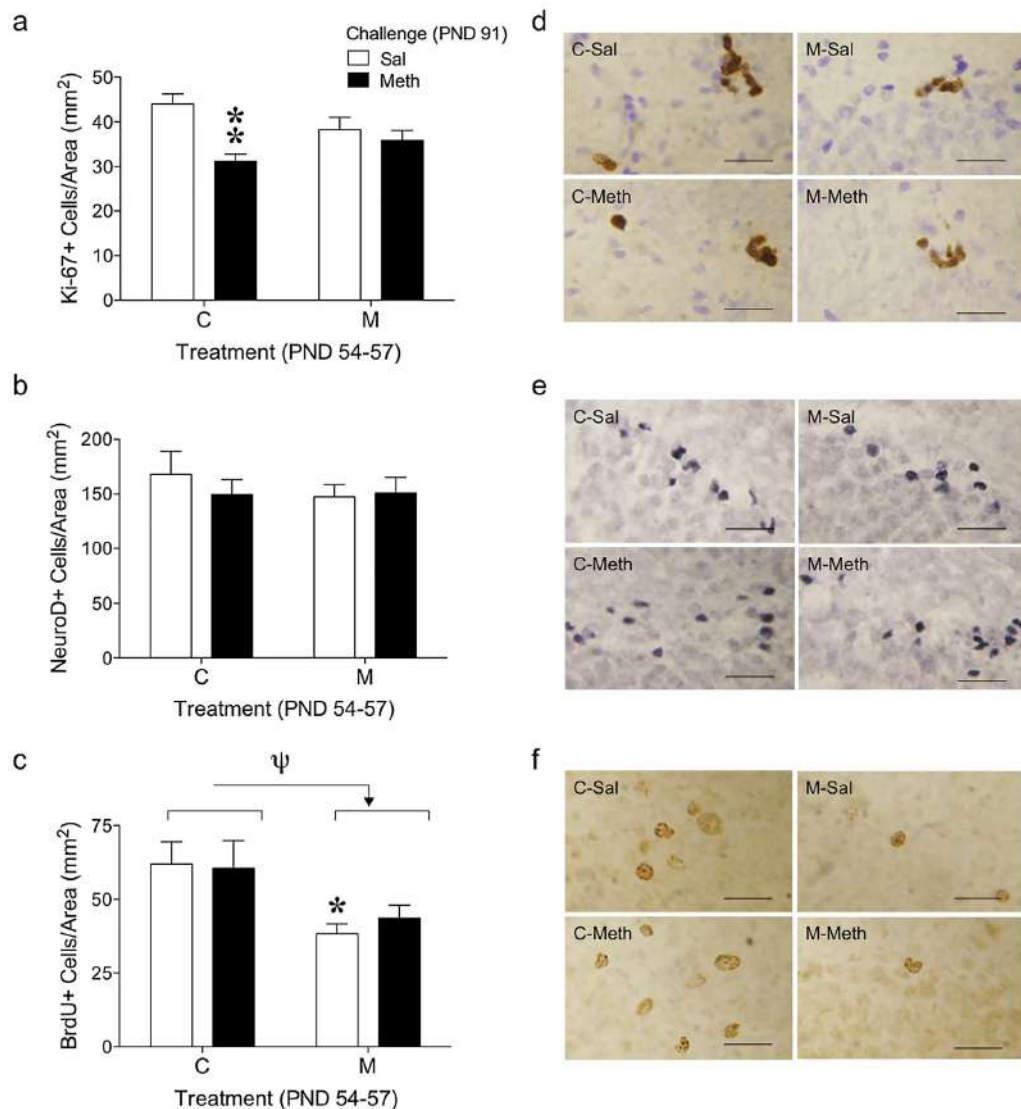


Fig. 2. Methamphetamine binge administration effects on hippocampal cell genesis in young rats following 34 days of prolonged withdrawal. Quantitative analysis (mean \pm SEM) of the number of positive cells per area (mm^2) in the left dentate gyrus: (a) Ki-67+ cells/area as a measure of cell proliferation, (b) NeuroD+ cells/area as a measure of early cell survival (i.e., 5–7 days old cells with a neuronal phenotype), and (c) BrdU+ cells/area as a measure of long-term cell survival (41–43 days old cells). Groups of treatment: C-Sal, $n = 6$, C-Meth, $n = 6$, M-Sal, $n = 7$, M-Meth, $n = 7$. Effect of Treatment: $\varphi < 0.05$ vs. M. $**p < 0.01$ when comparing C-Meth vs. C-Sal and $*p < 0.05$ when comparing C-Sal vs. M-Sal (two-way ANOVA followed by Sidak's). Representative IHC of (d) Ki-67+ (brown labeling in the blue granular layer), (e) NeuroD+ (dark blue labeling in the light blue granular layer) and (f) BrdU+ (dark brown labeling in the light brown granular layer) cell labeling in control treated rats (C, PND 54–57). For each treatment group, a representative image was taken with a light microscope using a 63x objective lens to identify individual cells. Scale bar = 30 μm . The color reproduction of this figure is available at the NeuroToxicology journal online.

evaluated cells born at different time points: Ki-67 labeled recently divided cells (Scholzen and Gerdes, 2000; Kee et al., 2002); NeuroD denoted immature young neurons (early cell survival; von Bohlen Und Halbach, 2007); and BrdU indicated mature 41–43 days old cells (e.g., Dayer et al., 2003). Interestingly, the results also showed that acute methamphetamine administration impaired cell proliferation (Ki-67+ cells) on PND 91, without affecting early or prolonged cell survival. These results, together with prior results from our research group (García-Cabrero and García-Fuster, 2016), extend the research done by others (i.e., Mandym et al., 2008; Yuan et al., 2011; Loxton and Canales, 2017; reviewed in Eisch and Harburg, 2006; Mandym and Koob, 2012), and suggest

that the immediate effects of methamphetamine on impairing recent cell proliferation (i.e., less cell birth) led to a delayed decreased number of surviving cells (i.e., BrdU+ cells) during prolonged withdrawal (i.e., present results), proposing a persistent effect of methamphetamine over neurogenesis regulation. Therefore, impaired hippocampal cell survival, adds to the several persistent neural adaptations taking place in the hippocampus following methamphetamine administration, and proposes this process as a potential target for therapeutic interventions during methamphetamine intake and/or withdrawal (e.g., methamphetamine-induced behavioral deficits, Mandym et al., 2008; reviewed in Canales, 2010). Although the present study did not

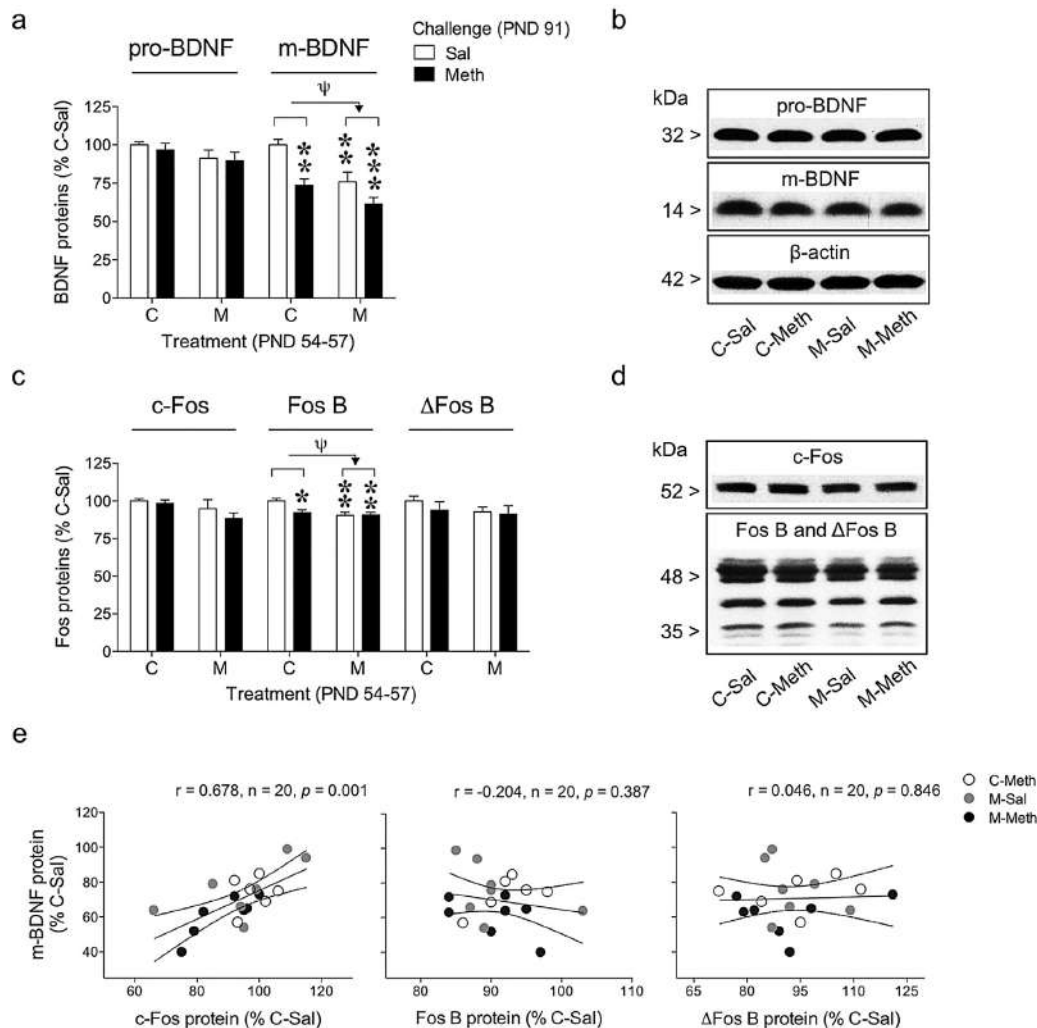


Fig. 3. Methamphetamine binge administration effects on hippocampal cell plasticity markers in young rats following 34 days of prolonged withdrawal. (a) pro-BDNF and m-BDNF protein content and (c) c-Fos, Fos B and ΔFos B protein content. Groups of treatment: C-Sal, n = 6, C-Meth, n = 6, M-Sal, n = 7, M-Meth, n = 7. Columns represent mean \pm SEM of n experiments per group and expressed as a percentage of C-Sal treated rats. Two-way ANOVA followed by Sidak's: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when comparing C-Meth vs. C-Sal, and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when comparing M-Sal or M-Meth vs. C-Sal. Effect of Treatment (PND 54-57) when comparing C vs. M; $\Psi < 0.05$. (b, d) Representative immunoblots depicting labeling of pro-BDNF (~32 kDa), m-BDNF (~14 kDa), c-Fos (~52 kDa), Fos B (~46–50 kDa), ΔFos B (~35–37 kDa), and the corresponding for β-actin as a loading control in hippocampus are shown for each set of experiments. (e) Hippocampal m-BDNF content correlated with c-Fos ($r = 0.678, n = 20, p = 0.001$) but not Fos B ($r = -0.204, n = 20, p = 0.387$) or ΔFos B ($r = 0.046, n = 20, p = 0.846$) protein content in young rats following 34 days of methamphetamine withdrawal. In the scatter plots, each circle represents a different rat, and the solid line is the best fit for the correlations. The curves indicate the 95% confidence interval for the regression line.

test any potential functional deficits associated with the observed persistent decrease in surviving cells in hippocampus, as an example, a recent study showed long-term cognitive and neurogenic changes induced by methamphetamine administration during adolescence in rats (Loxton and Canales, 2017).

When ascertaining the functional significance and the mechanisms by which methamphetamine might regulate neurogenesis, BDNF appears as a critical neurotrophic factor (i.e., Schmidt and Duman, 2007) previously described to parallel neurogenesis regulation (e.g., Lee et al., 2000; Somkuwar et al., 2016; García-Cabrerizo and García-Fuster, 2016) and thus with a key role in the function and survival of neurons (Mattson et al., 2004). In this context, the present results showed that methamphetamine decreased m-BDNF content, but not that of its precursor form (pro-BDNF), both after immediate exposure

(i.e., acute effects on PND 91, control rats challenged with methamphetamine) and following 34 days of prolonged withdrawal (i.e., history of methamphetamine on PND 54-57). Interestingly, while acute methamphetamine inhibited recent cell proliferation and m-BDNF, methamphetamine withdrawal decreased the number of surviving cells and m-BDNF protein content, suggesting a possible role for m-BDNF at the different stages of neurogenesis regulation. When revising prior studies on BDNF modulation by methamphetamine, the data shows effects that are time-dependent and region-specific as well as driven by the different dose regimens of methamphetamine administration. In particular, when looking at the effects taking place in hippocampus, some data reported increases in BDNF content (Grace et al., 2008; Braun et al., 2011; McFadden et al., 2014; Galinato et al., 2015; García-Cabrerizo and García-Fuster, 2016)

while others reported no effects (i.e., following prolonged withdrawal; Hajheidari et al., 2015) or even, similarly to the current results, decreases in its regulation (Banerjee et al., 2009; Dimatelis et al., 2014). Interestingly, although clinical studies reported increases in BDNF levels in plasma of chronic methamphetamine users (Kim et al., 2005), a recent study demonstrated that patients with low serum levels of BDNF had higher risk of depression symptoms during methamphetamine withdrawal (Ren et al., 2017). Thus, it seems reasonable to speculate that the observed hippocampal damage on m-BDNF and cell survival might participate in the dysregulation of some of the negative behavioral effects observed during methamphetamine withdrawal (e.g., García-Cabrero and García-Fuster, 2017). In particular, this recent study from our group (García-Cabrero and García-Fuster, 2017) showed that methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect as observed by two core symptoms of depression (i.e., behavioral despair and anhedonia) as well as increased voluntary drug consumption in rats following 25 days of withdrawal.

Considering that c-Fos regulates the expression of BDNF in distinct neuronal populations of the hippocampal formation *in vivo* (Dong et al., 2006), and that BDNF activates distinct enhancers to induce *c-fos* transcription in neurons (Joo et al., 2016), the regulation of several Fos family proteins (c-Fos, Fos B and Δ Fos B) was evaluated in this study. The current results indicated that while methamphetamine decreased hippocampal Fos B content both immediately after exposure (i.e., acute effects, control rats challenged with methamphetamine) and following 34 days of prolonged withdrawal (i.e., history of methamphetamine on PND 54–57), it had no effect on c-Fos or Δ Fos B. Although Δ Fos B accumulation in the nucleus accumbens and dorsal striatum represents one mechanism by which drugs of abuse produce relatively stable changes in the brain (i.e., methamphetamine effects, see Nestler, 2012) that contribute to an addictive phenotype (Nestler et al., 2001), Δ Fos B regulation in other brain regions (i.e., hippocampus) by methamphetamine might not follow the same temporal (i.e., withdrawal time) or spatial (i.e., different brain regions) regulation (e.g., McDaid et al., 2006; Cornish et al., 2012). Thus, the fact that Δ Fos B was not regulated in the hippocampus of methamphetamine-treated rats does not necessarily mean a lack of addictive potential of the drug. The product of the gene *fos*, c-Fos protein is critical for synaptic plasticity and hippocampal memory (e.g., He et al., 2002), and its expression is biphasic, with increased activity following acute neuronal function and decreased activity following chronically stimulation of neurons (e.g., by amphetamines, Renthal et al., 2008). In fact, although prior results have shown that methamphetamine induced c-Fos, Fos B and Δ Fos B (see further details above) in several brain regions (e.g., Nestler, 2012; Cadet et al., 2015), a recent study showed that Fos B is involved in the protective functions against methamphetamine neurotoxicity in postsynaptic neurons (Kuroda et al., 2010), which supports the present results – lower levels of Fos B might translate into decreased neuroprotection and/or enhanced neurotoxicity during methamphetamine withdrawal. Interestingly, the current results also showed that although overall c-Fos protein was not altered in the different experimental conditions, decreased m-BDNF content paralleled hippocampal low levels of c-Fos protein in methamphetamine-treated rats. Therefore, as c-Fos is a reliable marker of neuronal activity (i.e., excitability and survival; Zhang et al., 2002) known to exacerbate methamphetamine-induced neurotoxicity when not present (i.e., heterozygous mutant (\pm) *c-fos* mice; Deng et al., 1999), the observed parallel regulation between m-BDNF and c-Fos expression could be considered as a potential contributor to the neurotoxic effects that might participate in hippocampal-dependent behavioral deficits (e.g., Palop et al., 2003), such as the

well-known deficits in cognitive performance (see Moszczynska and Callan, 2017), taking place during prolonged methamphetamine withdrawal.

5. Conclusions

The present results demonstrate that methamphetamine binge administration during late adolescence induced enduring hippocampal cell damage (i.e., decreased cell survival, m-BDNF and Fos B protein contents) following 34 days of withdrawal. Moreover, decreased hippocampal m-BDNF content was associated with low levels of c-Fos protein content, and both of these markers had been previously ascribed a role on regulating cell survival. Thus, the co-down-regulation of these neuroplasticity markers (i.e., cell survival, m-BDNF, c-Fos, Fos B) following prolonged methamphetamine withdrawal, enhances our prior knowledge on some of the consequences leading to methamphetamine neurotoxicity and could account for some of the addictive-like behaviors dependent on this brain region following methamphetamine consumption.

Funding

This study was supported by Fundación Alicia Koplowitz (Madrid, Spain) and by Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (grants 2012/011 and 2016/002, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain) to MJG-F. RG-C was supported by a pre-doctoral fellowship (Consejería de Innovación, Investigación y Turismo del Gobierno de las Islas Baleares y del Fondo Social Europeo). MJG-F is a member of RETICS-RTA (RD12/0028/0011 and RD16/0017/001; Instituto de Salud Carlos III, MINECO/FEDER).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Drs. Huda Akil and Stanley J. Watson (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), who kindly provided Ki-67 and BrdU antibodies. The authors would also like to thank Dr. Benjamin Keller for procedural assistance.

References

- 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. *Eur. J. Neurosci.* 34, 978–987.
- Banerjee, P.S., Aston, J., Khundakar, A.A., Zetterström, T.S., 2009. Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain-derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *Eur. J. Neurosci.* 29, 465–476.
- Braun, A.A., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Seroogy, K.B., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2011. Neurotoxic (+)-methamphetamine treatment in rats increases brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B expression in multiple brain regions. *Neuroscience* 184, 164–171.
- Brunell, S.C., Spear, L.P., 2006. Effects of acute alcohol or amphetamine administration on the acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 186, 579–586.
- Cadet, J.L., Brannock, C., Jayanthi, S., Krasnova, I.N., 2015. Transcriptional and epigenetic substrates of methamphetamine addiction and withdrawal: evidence from a long-access self-administration model in the rat. *Mol. Neurobiol.* 51, 696–717.
- Canales, J.J., 2010. Comparative neuroscience of stimulant-induced memory dysfunction: role for neurogenesis in the adult hippocampus. *Behav. Pharmacol.* 21, 379–393.
- Cameron, H.A., McKay, R.D., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406–417.
- Cornish, J.L., Hunt, G.E., Robins, L., McGregor, I.S., 2012. Regional c-Fos and FosB/ Δ FosB expression associated with chronic methamphetamine self-administration and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience* 206, 100–114.

- Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., Cameron, H.A., 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 460, 563–572.
- Deng, X., Ladenheim, B., Tsao, L.L., Cadet, J.L., 1999. Null mutation of c-fos causes exacerbation of methamphetamine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 19, 10107–10115.
- Dimatelis, J.J., Russell, V.A., Stein, D.J., Daniels, W.M., 2014. Methamphetamine reversed maternal separation-induced decrease in nerve growth factor in the ventral hippocampus. *Metab. Brain Dis.* 29, 433–439.
- Dong, M., Wu, Y., Fan, Y., Xu, M., Zhang, J., 2006. c-fos modulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 400, 177–180.
- Eisch, A.J., Harburg, G.C., 2006. Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16, 271–286.
- Galinato, M.H., Orio, L., Mandym, C.D., 2015. Methamphetamine differentially affects BDNF and cell death factors in anatomically defined regions of the hippocampus. *Neuroscience* 286, 97–108.
- García-Cabrerizo, R., Keller, B., García-Fuster, M.J., 2015. Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability: consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304, 302–315.
- García-Cabrerizo, R., García-Fuster, M.J., 2015. Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: down-regulation of apoptotic markers. *NeuroToxicology* 49, 104–113.
- García-Cabrerizo, R., García-Fuster, M.J., 2016. Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages. *NeuroToxicology* 56, 29–39.
- García-Cabrerizo, R., García-Fuster, M.J., 2017. Methamphetamine binge administration dose-dependently enhanced negative affect and voluntary drug consumption in rats following prolonged withdrawal: role of hippocampal FADD. *Addict. Biol.* doi:http://dx.doi.org/10.1111/adb.12593.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 31, 79–89.
- García-Fuster, M.J., Flagel, S.B., Mahmood, S.T., Mayo, L.M., Thompson, R.C., Watson, S.J., 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.
- García-Fuster, M.J., Flagel, S.B., Mahmood, S.T., Watson, S.J., Akil, H., 2012. Cocaine withdrawal causes delayed dysregulation of stress genes in the hippocampus. *PLoS One* 7, e42092.
- Grace, C.E., Schaefer, T.L., Herring, N.R., Skelton, M.R., McCreary, A.E., Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2008. (+)-Methamphetamine increases corticosterone in plasma and BDNF in brain more than forced swim or isolation in neonatal rats. *Synapse* 62, 110–121.
- Hajheidari, S., Miladi-Gorji, H., Bigdeli, I., 2015. Effect of the environmental enrichment on the severity of psychological dependence and voluntary methamphetamine consumption in methamphetamine withdrawn rats. *Neurosci. Lett.* 584, 151–155.
- Halpin, L.E., Collins, S.A., Yamamoto, B.K., 2014. Neurotoxicity of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Life Sci.* 97, 37–44.
- He, J., Yamada, K., Nabeshima, T., 2002. A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacology* 26, 259–268.
- Hori, N., Kadota, M.T., Watanabe, M., Ito, Y., Akaiki, N., Carpenter, D.O., 2010. Neurotoxic effects of methamphetamine on rat hippocampus pyramidal neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 8469–8856.
- Joo, J.Y., Schaukowitz, K., Farbiak, L., Kilaru, G., Kim, T.K., 2016. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat. Neurosci.* 19, 75–83.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J.M., 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Methods* 115, 97–105.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579.
- Kim, D.J., Roh, S., Kim, Y., Yoon, S.J., Lee, H.K., Han, C.S., Kim, Y.K., 2005. High concentrations of plasma brain-derived neurotrophic factor in methamphetamine users. *Neurosci. Lett.* 388, 112–115.
- Kraeuchi, K., Rudolph, K., Wirz-Justice, A., Feer, H., 1985. Similarities in feeding behavior of chronic methamphetamine treated and withdrawn rats to VMH lesioned rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23, 917–920.
- Kuroda, K.O., Ornthanalai, V.G., Kato, T., Murphy, N.P., 2010. FosB null mutant mice show enhanced methamphetamine neurotoxicity: potential involvement of FosB in intracellular feedback signaling and astroglial function. *Neuropsychopharmacology* 35, 641–655.
- Lee, J.E., 1997. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 13–20.
- Lee, J., Duan, W., Long, J.M., Ingram, D.K., Mattson, M.P., 2000. Dietary restriction increases the number of newly generated cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus. *J. Mol. Neurosci.* 15, 99–108.
- Loxton, D., Canales, J.J., 2017. Long-term cognitive, emotional and neurogenic alterations induced by alcohol and methamphetamine exposure in adolescent rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 74, 1–8.
- Lu, B., 2003. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 10, 86–98.
- 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. *Biol. Psychiatry* 64, 958–968.
- Mandyam, C.D., Koob, G.F., 2012. The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci.* 35, 250–260.
- Mattson, M.P., Maudsley, S., Martin, B., 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and disorders. *Trends Neurosci.* 27, 589–594.
- McClung, C.A., Ulery, P.G., Perrotti, L.I., Zachariou, V., Berton, O., Nestler, E.J., 2004. DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132, 146–154.
- McDaid, J., Graham, M.P., Napier, T.C., 2006. Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and DeltaFosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* 70, 2064–2074.
- McFadden, L.M., Vieira-Brock, P.L., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E., 2014. Methamphetamine self-administration attenuates hippocampal serotonergic deficits: role of brain-derived neurotrophic factor. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1315–1320.
- McGrath, J.C., Drummond, G.B., McLachlan, E.M., Kilkenny, C., Wainwright, C.L., 2010. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1573–1576.
- Miyata, T., Maeda, T., Lee, J.E., 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 13, 1647–1652.
- Moszczynska, A., Callan, S.P., 2017. Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: implications for treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 362, 474–488.
- Myles, B.J., Jarrett, L.A., Broom, S.L., Speaker, H.A., Sabol, K.E., 2008. The effects of methamphetamine on core body temperature in the rat – PART 1: chronic treatment and ambient temperature. *Psychopharmacology* 198, 301–311.
- Nestler, E.J., Barrot, M., Self, D.W., 2001. ΔFos-B: a sustained molecular switch for addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11042–11046.
- Nestler, E.J., 2012. Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 10, 136–143.
- Palop, J.J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G.Q., Raber, J., Masliah, E., Mucke, L., 2003. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9572–9577.
- Ren, W., Luan, X., Zhang, J., Guttee, P., Cai, Y., Zhao, J., Gu, Y., Wu, C., Su, H., Tao, J., Xie, Y., Lv, D., Feng, L., He, J., 2017. Brain-derived neurotrophic factor levels and depression during methamphetamine withdrawal. *J. Affect. Disord.* 221, 165–171.
- Renthal, W., Carle, T.L., Maze, I., Covington 3rd, H.E., Truong, H.T., Aibhai, I., Kumar, A., Montgomery, R.L., Olson, E.N., Nestler, E.J., 2008. Delta Fos B mediates epigenetic desensitization of the c-Fos gene after chronic amphetamine exposure. *J. Neurosci.* 28, 7344–7349.
- Rogers, J.L., De Santis, S., See, R.E., 2008. Extended methamphetamine self-administration enhances reinstatement of drug seeking and impairs novel object recognition in rats. *Psychopharmacology* 199, 615–624.
- SAMHSA, 2002. Results from the 2001 national household survey on drug abuse: volume 1. Summary of national findings. NCHS, Editor. Series H-17. Office of Applied Studies, Rockville, MD.
- Santos, P.L., Brito, R.G., Matos, J.P.S.C.F., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., 2017. Fos protein as a marker of neuronal activity: a useful tool in the study of the mechanism of action of natural products with analgesic activity. *Mol. Neurobiol.* doi:http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0658-4.
- Schmidt, H.D., Duman, R.S., 2007. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav. Pharmacol.* 18, 391–418.
- Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
- Somkuwar, S.S., Fannon, M.J., Staples, M.C., Zamora-Martínez, E.R., Navarro, A.I., Kim, A., Quigley, J.A., Edwards, S., Mandyam, C.D., 2016. Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct. Funct.* 221, 4319–4335.
- Spear, L.P., 2007. Assessment of adolescent neurotoxicity: rationale and methodological considerations. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 1–9.
- Steinkellner, T., Freissmuth, M., Sitte, H.H., Montgomery, T., 2011. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and D-amphetamine. *Biol. Chem.* 392, 103–115.
- Teixeira-Gomes, A., Costa, V.M., Feio-Azevedo, R., Bastos, M.L., Carvalho, F., Capela, J. P., 2015. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int. J. Dev. Neurosci.* 41, 44–62.
- Thanos, P.K., Kim, R., Delis, F., Ananth, M., Chachati, G., Rocco, M.J., Masad, I., Muniz, J. A., Grant, S.C., Gold, M.S., Cadet, J.L., Volkow, N.D., 2016. Chronic methamphetamine effects of brain structure and function in rats. *PLoS One* 11, e0155457.
- Thompson, P.M., Hayashi, K.M., Simon, S.L., Geaga, J.A., Hong, M.S., Sui, Y., Lee, J.Y., Toga, A.W., Ling, W., London, E.D., 2004. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *J. Neurosci.* 30, 6028–6036.
- Torney, J., Lasagna, L., 1960. Relation of thyroid function to acute and chronic effects of amphetamine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 128, 201–209.
- UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime, 2015. World Drug Report. United Nations Publication Sales No. E15.XI6. Vienna.

- von Bohlen Und Halbach, O., 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329, 409–420.
- Wojtowicz, J.M., Kee, N., 2006. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat. Protoc.* 1, 1399–1405.
- Yuan, C.J., Quirocho, J.M., Kim, A., Wee, S., Mandyam, C.D., 2011. Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 98–108.
- Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J.S., Behbehani, M., Tsien, J.Z., Xu, M., 2002. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat. Genet.* 30, 416–420.

ANEXO EXPERIMENTAL I

Pharmacological inhibition of cell proliferation prevents the antidepressant and increased neurogenic effects induced by repeated electroconvulsive shock treatment in rats

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

Resumen

El shock electroconvulsivo (ECS) es un tratamiento alternativo utilizado en psiquiatría que ofrece un efecto terapéutico seguro, rápido y potente en pacientes con depresión mayor. Aunque las bases moleculares de su efecto terapéutico no se conocen, se le ha dado especial atención al papel que determinados marcadores neuroplásticos en el hipocampo como la neurogénesis ejercen en su acción. Datos previos del grupo de investigación han demostrado: (1) la importancia de la duración del tratamiento ECS en su capacidad de inducción de incrementos en marcadores de formación celular en el hipocampo (sin efectos tras la aplicación aguda de 1 sesión de ECS y con un marcado aumento tras la aplicación repetida de 5 sesiones, 1 sesión al día) y; (2) la existencia de un curso temporal y paralelo entre el efecto antidepressivo y el incremento en marcadores neurogénicos, sugiriendo que la neurogénesis hipocampal podría mediar los efectos antidepressivos mediados por el ECS. Para confirmar esta hipótesis, el presente estudio evaluó si la inhibición farmacológica de la proliferación basal con el fármaco antineoplásico temozolamida (TMZ) podría prevenir los efectos beneficiosos del ECS a nivel comportamental (respuesta antidepressiva) y a nivel neuronal (incremento de la proliferación y supervivencia celular). Los resultados demuestran que el efecto antidepressivo inducido por la aplicación repetida del ECS (reducción de la inmovilidad hasta 3 días después de la última sesión de ECS), no se observa en los animales pretratados con TMZ. Además, en los animales tratados con TMZ no se observó el esperado incremento del nivel de proliferación celular basal y de supervivencia neuronal temprana inducido por el ECS en el hipocampo. Los datos demuestran que la inhibición de la formación de nuevas neuronas en ratas previene los efectos antidepressivos inducidos por el ECS. Parte de estos resultados fueron presentados en el 48 congreso de la Society for Neuroscience (García-Cabrerizo y García-Fuster, 2018).

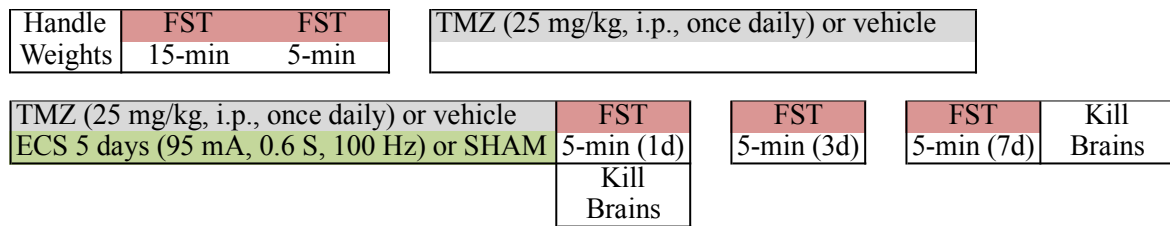


Figura 1. Diseño experimental. Previo al tratamiento, los animales se expusieron al test de natación forzada (FST) para determinar los niveles de inmovilidad basal (p. ej. medida del desespero conductual). Después de balancear por peso y nivel de inmovilidad, los animales se dividieron en dos grupos para recibir 2 ciclos de temozolamida (2 x TMZ; 10 días de TMZ, 25 mg/kg, i.p., en ciclos de 5 días y con dos días de descanso entre ciclos) o vehículo. Durante el segundo ciclo con TMZ o vehículo, 3 horas después del último pinchazo, exposición al shock electroconvulsivo (ECS (5d): 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) o exposición al ECS sin recibir corriente (SHAM). Una vez finalizada la aplicación del ECS, se evaluó el curso temporal del efecto antidepressivo (1, 3 y 7 días postECS). Los animales se sacrificaron por decapitación 1 y 8 días tras la última aplicación del ECS.

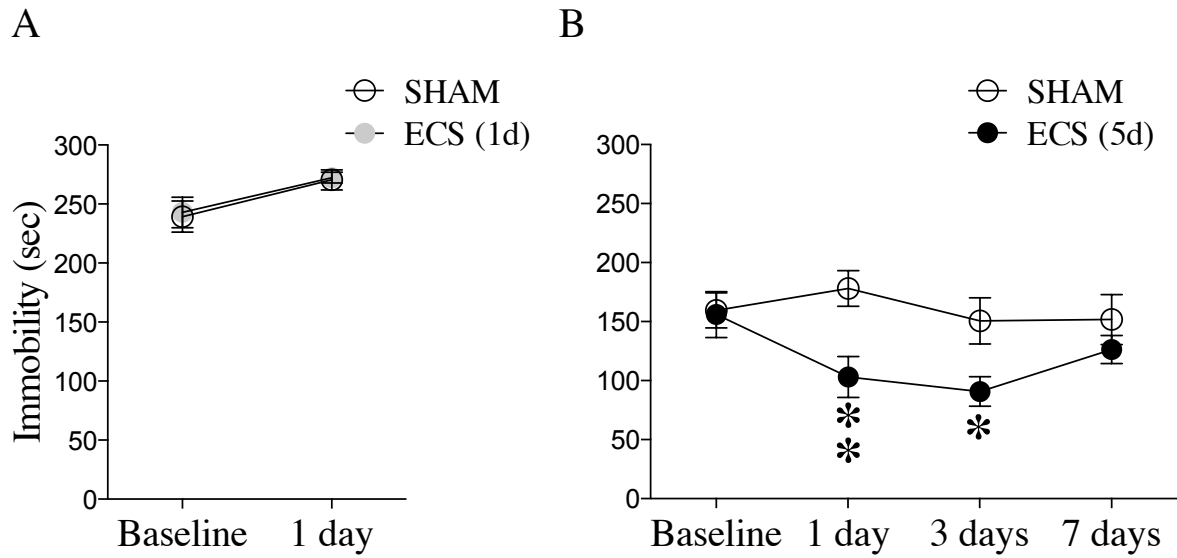


Figura 2. Efecto antidepresivo tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d)) medido en el test de natación forzada (FST). Los datos representan el promedio \pm SEM del tiempo (seg) inmóvil durante el test. A) Ausencia del efecto antidepresivo 1 día después tras la aplicación aguda ECS (1d). Grupos experimentales: SHAM (sin recibir shock electroconvulsivo; n=10) y ECS (1d) (95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 1 sesión; n=10). ANOVA de dos vías no detectó cambios significativos. B) Curso temporal del efecto antidepresivo 1, 3 y 7 días tras la aplicación repetida ECS (5d). Grupos experimentales: SHAM (sin recibir shock electroconvulsivo; n=9) y ECS (5d) (95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día; n=12). t-tests múltiples: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ al comparar el grupo tratado con ECS (5d) y el grupo control SHAM.

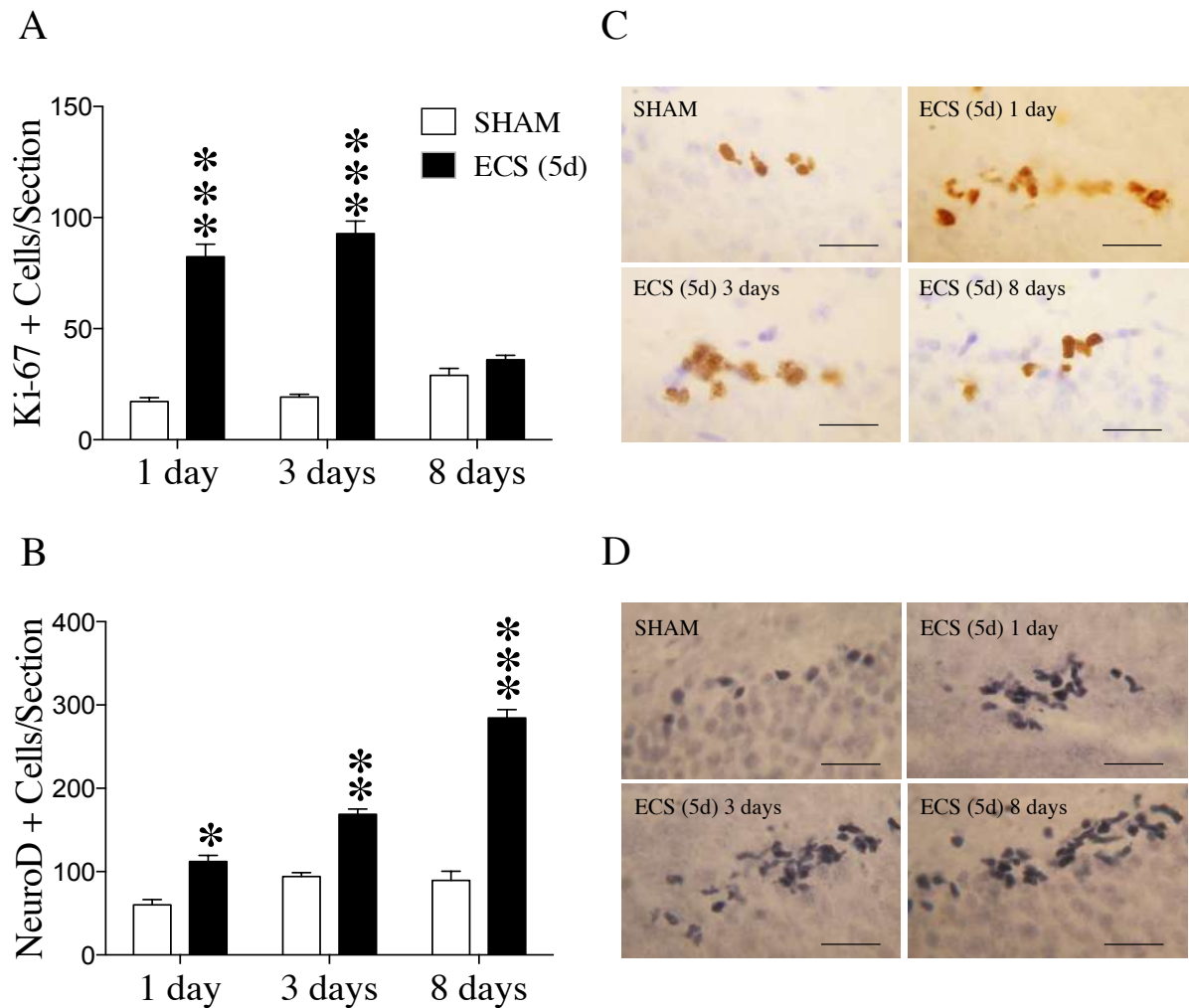


Figura 3. Aumento de la formación de nuevas células tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) en el giro dentado del hipocampo. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de células positivas por sección. A) Curso temporal de la proliferación celular (células Ki-67+ por sección) inducido por el ECS (5d). B) Curso temporal de la supervivencia neuronal temprana (células NeuroD+ por sección) inducido por el ECS (5d). Grupos experimentales: SHAM 1 día (n=5), 3 días (n=5) y 8 días (n=10) después de la última sesión y ECS (5d) 1 día (n=5), 3 días (n=5) y 8 días (n=10) después de la última sesión. ANOVA de dos vías seguido por el test de comparaciones múltiples de Sidak: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ al comparar los grupos tratados con ECS (5d) con los controles SHAM. Imágenes representativas tomadas con un microscopio de luz utilizando un objetivo de 63X para C) Ki-67 (marcaje marrón en la capa granular liliácea) y D) NeuroD (marcaje azul oscuro en la capa granular liliácea) de los diferentes grupos experimentales. Guía de 30 μ m.

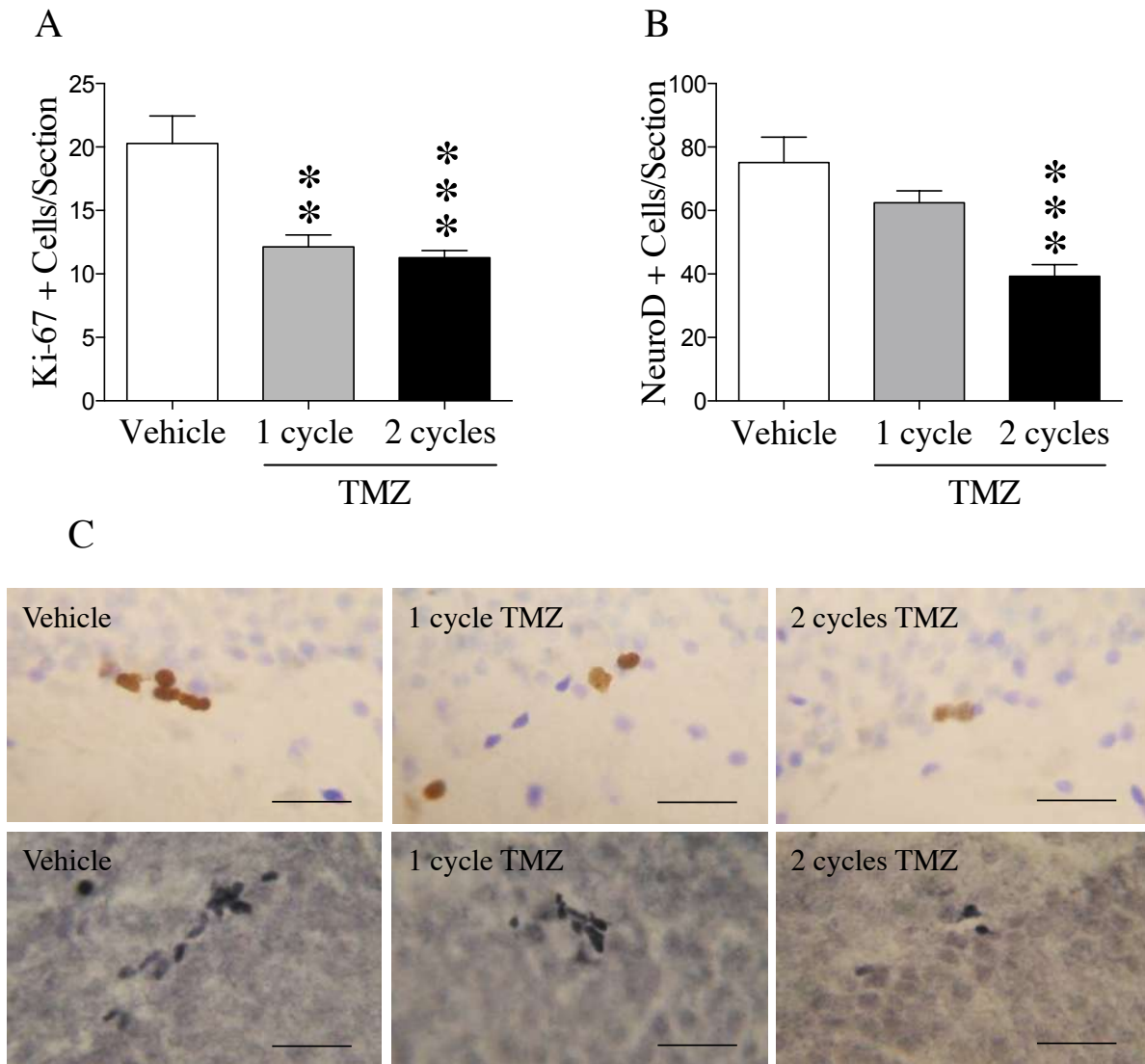
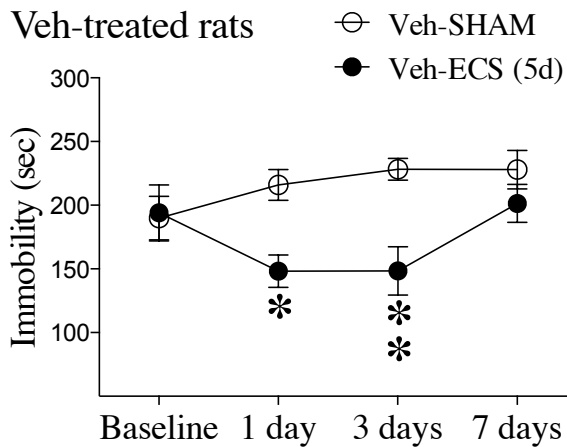


Figura 4. Inhibición de la formación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo tras la administración de temozolamida (TMZ) durante 1 ciclo (1 x TMZ; 5 días vehículo, DMSO + 5 días de TMZ, 25 mg/kg, i.p.) o 2 ciclos (2 x TMZ; 10 días de TMZ, 25 mg/kg, i.p., en ciclos de 5 días y con dos días de descanso entre ciclos). Los datos representan el promedio \pm SEM del número de células positivas por sección. Las ratas vehículo recibieron 10 días de DMSO (1 ml/kg, i.p.). A) Inhibición de la proliferación celular (células Ki-67+ por sección) tras 1 o 2 ciclos con TMZ. B) Inhibición de la supervivencia neuronal temprana (células NeuroD+ por sección) tras 1 o 2 ciclos con TMZ. Grupos experimentales: Vehículo (n=7), 1 ciclo TMZ (n=7) y 2 ciclos TMZ (n=7). ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$ al comparar los grupos tratados con TMZ con los controles vehículo. Imágenes representativas tomadas con un microscopio de luz utilizando un objetivo de 63X para C) Ki-67 (marcaje marrón en la capa granular liliácea) y D) NeuroD (marcaje azul oscuro en la capa granular liliácea) de los diferentes grupos experimentales. Guía de 30 μ m.

A



B

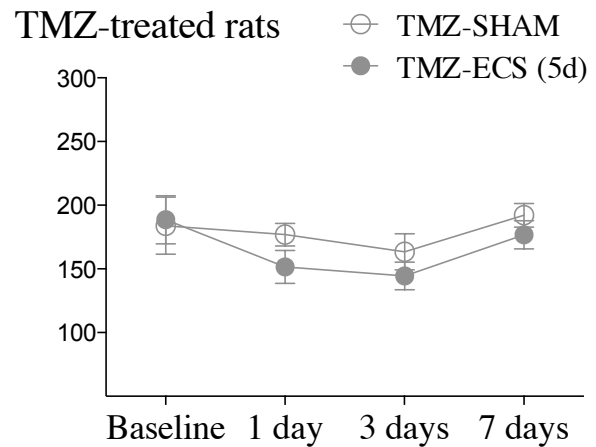


Figura 5. Bloqueo del efecto antidepresivo ejercido tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) por la administración de temozolamida (TMZ dos ciclos; 10 días de TMZ, 25 mg/kg, i.p., en ciclos de 5 días y con dos días de descanso entre ciclos). Los datos representan el promedio \pm SEM del tiempo (seg) inmóvil durante el test. A) Curso temporal del efecto antidepresivo (disminución de la inmovilidad) ejercido tras el tratamiento repetido por el ECS (Veh-ECS (5d)) 1 y 3 días después de la última sesión. Grupos experimentales: Veh-SHAM (dos ciclos con DMSO, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS sin corriente; n=8), Veh-ECS (5d) (dos ciclos con DMSO, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=11). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak $*p < 0,05$ y $**p < 0,01$ al comparar el grupo Veh-ECS (5d) con el grupo control Veh-SHAM. B) Ausencia del efecto antidepresivo inducido por el ECS en ratas tratadas con 2 ciclos de TMZ (TMZ-ECS (5d)). Grupos experimentales: TMZ-SHAM (dos ciclos con TMZ, 3 horas después del último pinchazo con el TMZ durante el segundo ciclo, exposición al ECS sin corriente; n=10) y TMZ-ECS (5d) (dos ciclos con TMZ, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=11). ANOVA de dos vías no detectó cambios significativos.

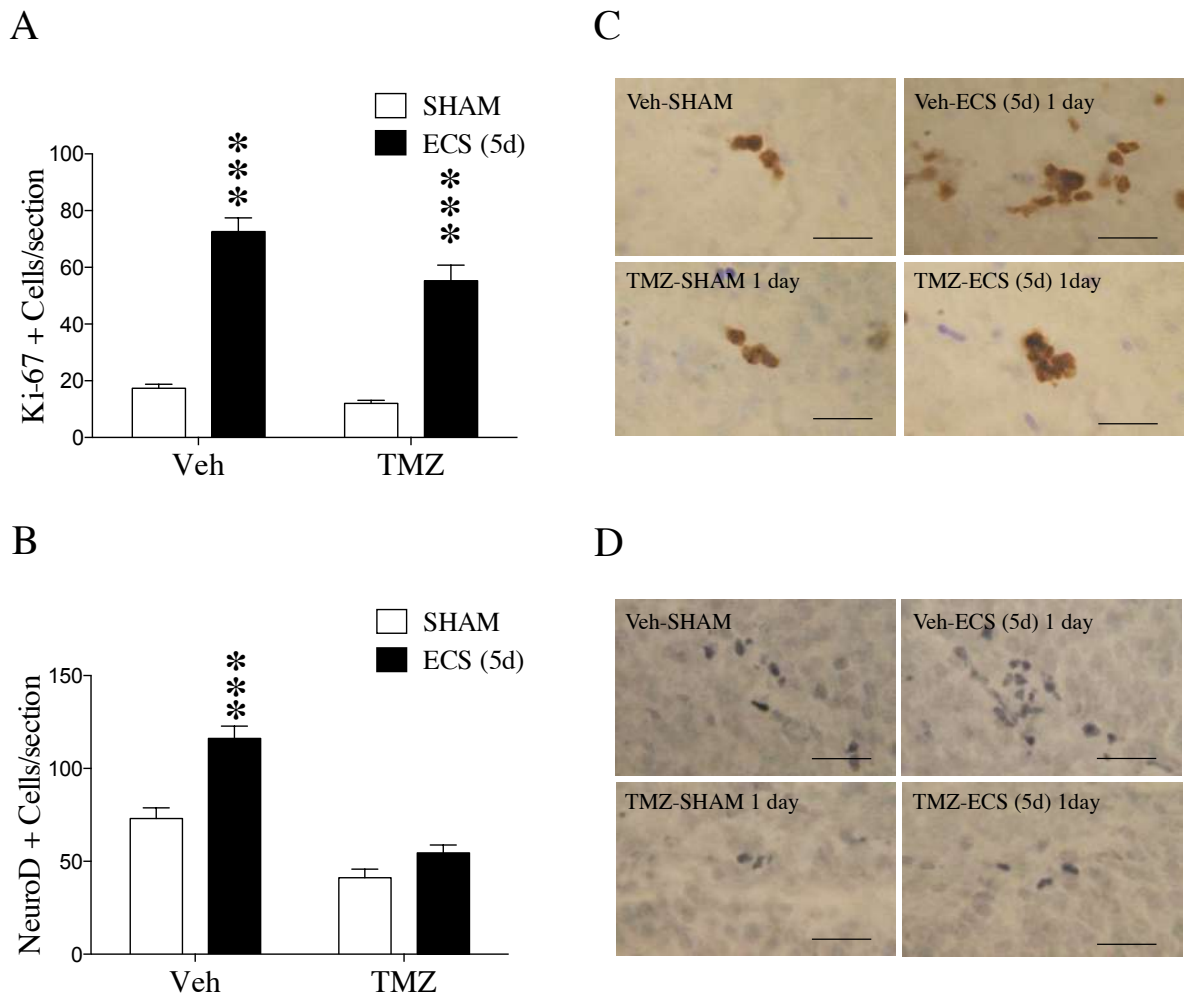


Figura 6. Bloqueo del aumento de la formación de nuevas células tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) por la administración de temozolamida (TMZ dos ciclos; 10 días de TMZ, 25 mg/kg, i.p., en ciclos de 5 días y con dos días de descanso entre ciclos) 1 día postratamiento. Los datos representan el promedio \pm SEM del número de células positivas por sección. A) Inhibición del aumento de proliferación celular (células Ki-67+ por sección) inducido por el ECS (5d) tras 2 ciclos con TMZ. B) Inhibición del aumento de supervivencia neuronal temprana (células NeuroD+ por sección) inducido por el ECS (5d) tras 2 ciclos con TMZ. Grupos experimentales: Veh-SHAM (dos ciclos con DMSO, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS sin corriente; n=5), Veh-ECS (5d) (dos ciclos con DMSO, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=5), TMZ-SHAM (dos ciclos con TMZ, 3 horas después del último pinchazo con el TMZ durante el segundo ciclo, exposición al ECS sin corriente; n=6) y TMZ-ECS (5d) (dos ciclos con TMZ, 3 horas después del último pinchazo con el vehículo durante el segundo ciclo, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=6). ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple de Sidak: *** $p < 0,001$ al comparar los grupos Veh-ECS (5d) con los grupos Veh-SHAM y *** $p < 0,001$ al comprar el grupo TMZ-ECS (5d) con el grupo control TMZ-SHAM. Imágenes representativas tomadas con un microscopio de luz utilizando un objetivo de 63X para C) Ki-67 (marcaje marrón en la capa granular liliácea) y D) NeuroD (marcaje azul oscuro en la capa granular liliácea) de los diferentes grupos experimentales. Guía de 30 μ m.

ANEXO EXPERIMENTAL II

Methamphetamine administration impedes the expected antidepressant-like effect induced by repeated electroconvulsive shock in adult rats

García-Cabrerizo R and García-Fuster MJ

Resumen

Los datos obtenidos en los estudios previos presentados en esta Tesis doctoral han demostrado que la administración de metanfetamina en la ventana de vulnerabilidad (adolescencia tardía, PND 54-57) produce daño celular a nivel hipocampal (reducción de marcadores de formación celular y regulación de los niveles de BDNF; véase Artículo IV), efectos que perduran hasta la etapa adulta tras un largo período de abstinencia (véase Artículo VII). Asimismo, la metanfetamina induce un aumento de los efectos negativos a nivel comportamental (fenotipo prodepresivo y proadictivo) durante la abstinencia prolongada (véase Artículo VI). En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar si el shock electroconvulsivo (ECS) era capaz de ejercer un efecto antidepressivo en ratas con una historia previa de metanfetamina durante la adolescencia tardía al ser reexpuestas de manera repetida a la droga durante la etapa adulta. Los resultados obtenidos demostraron, por un lado, que la administración de metanfetamina en la adolescencia tardía no indujo efectos inmediatos ni a largo plazo (tras una reexposición repetida a la droga) sobre el desespero conductual o la ansiedad. Sin embargo, mientras el ECS indujo un efecto antidepressivo en los animales control, no fue capaz de inducir el efecto esperado en animales previamente tratados con metanfetamina. Por otro lado, el ECS sí bloqueó la disminución de la proliferación celular (Ki-67) y la supervivencia neuronal temprana (NeuroD) inducida por la metanfetamina gracias al aumento de marcadores de formación celular en el giro dentado del hipocampo. Además, bloqueó los efectos neurotóxicos inducidos por la metanfetamina sobre las vías dopaminérgicas en el cuerpo estriado. Por lo tanto, el ECS es capaz de bloquear parte de los efectos negativos inducidos a nivel molecular por la metanfetamina como la disminución de marcadores de formación celular en el hipocampo y la desregulación dopaminérgica en el estriado. Parte de estos resultados fueron presentados en el 48 congreso de la Society for Neuroscience (García-Cabrerizo et al., 2018).

PND	48	49	50	54	55	56	57	58	59	61
	BrdU (50 mg/kg, i.p.) X2 daily (every 8h)			Methamphetamine (5mg/kg, i.p.) X3 daily (every 3h)				FST 15-min	FST-test 5-min	NSF 5-min
	WEIGHT			WEIGHT and TEMPERATURE					48 h food deprivation AFTER TEST (48 h)	WEIGHT
	91	92	93	94	95	96	97			
	Methamphetamine (5mg/kg, i.p.) or saline, 1 injection per day ECS (5 d) (95 mA, 0.6 s, 100 Hz, via earclip electrodes) or SHAM, 3 hours after injection						FST-test 5-min	Brains		
	WEIGHT									

Figura 1. Diseño experimental. Las ratas se trataron con BrdU (2 x 50 mg/kg, cada 8 horas, 3 días consecutivos; día postnatal PND 48-50) seguido de un paradigma en atracción con metanfetamina (METH) o salino (0,9 % NaCl, 1 ml/kg) durante la adolescencia tardía (5 mg/kg, i.p., 3 veces al día, 4 días, PND 54-57). Los efectos inmediatos de la metanfetamina sobre el fenotipo prodepresivo se evaluaron en el test de natación forzada (FST) a PND 59 y el campo abierto tras restringir a los animales el acceso a la comida 48 h antes del test (NFS) a PND 61. Tras 34 días en abstinencia forzada, los animales recibieron un reexposición repetida con metanfetamina (5 mg/kg, i.p., 1 vez al día, 5 días, PND 91-95) o salino (0,9 % NaCl, 1 ml/kg, 1 vez al día, 5 días, PND 91-95) en función de la administración recibida durante la adolescencia tardía. 3 horas después de cada inyección, los animales fueron expuestos al shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) vía clips auriculares o bien fueron conectado al ECS sin recibir corriente eléctrica (SHAM). A PND 96 se evaluó de nuevo el fenotipo prodepresivo en el FST y a PND 97 los animales se sacrificaron por decapitación.

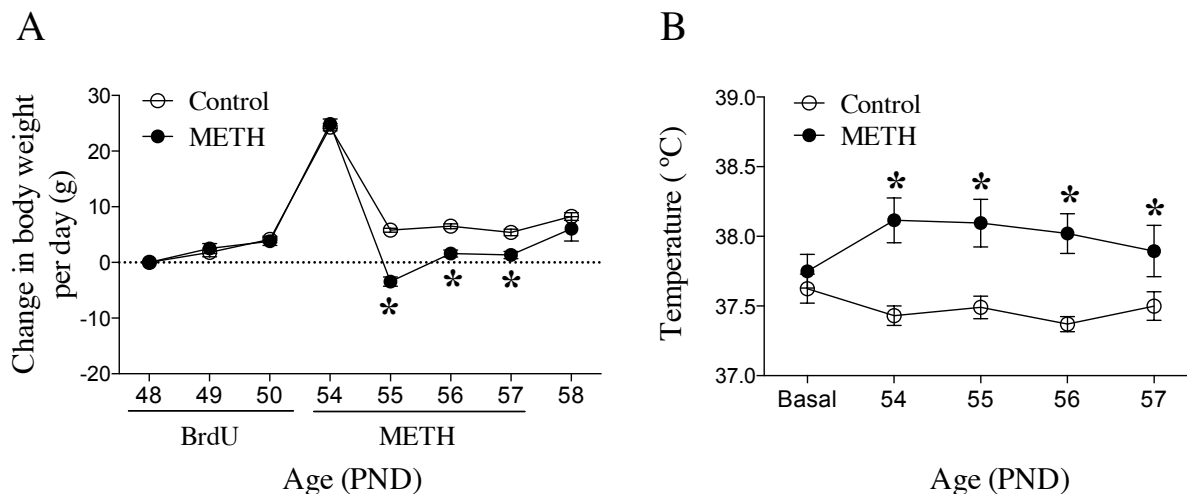
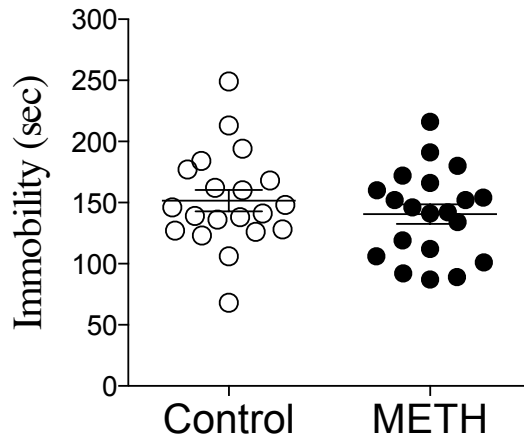


Figura 2. La administración de metanfetamina (METH) en ratas durante la adolescencia tardía (PND 54-57) induce una disminución en el peso corporal y un incremento en la temperatura rectal. Grupos experimentales: Control (0,9 % de salino, 1 ml/kg, i.p.; n=20) y METH (3 x 5 mg/kg, cada 3 horas, 4 días consecutivos; n=20). A) Cambio diario en el peso corporal (g) para los grupos experimentales previo al tratamiento con la droga (BrdU; 2 x 50 mg/kg, cada 8 horas, 3 días consecutivos; PND 48-50) y durante el tratamiento con metanfetamina (PND 54-57). ANOVA de dos vías seguido por el test de comparaciones múltiples de Sidak: * $p < 0,05$ al comparar el grupo control con el grupo METH. B) Cambio diario en la temperatura rectal (° C) medido 30 min después de la última administración de metanfetamina. ANOVA de dos vías seguido por el test de comparaciones múltiples de Sidak: como mínimo * $p < 0,05$ al comparar el grupo control con el grupo METH.

A

PND 59 - Forced-Swim Test



B

PND 61 - Novelty-Supressed Feeding

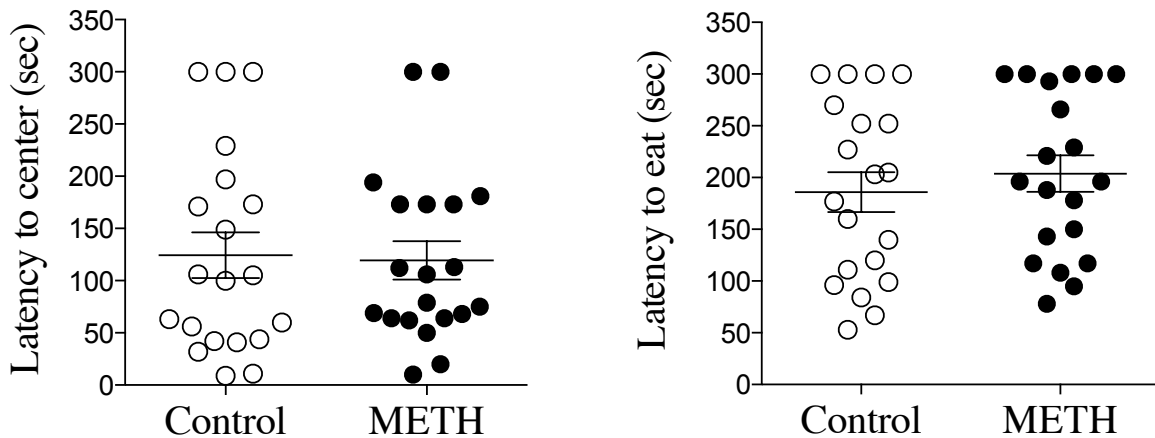
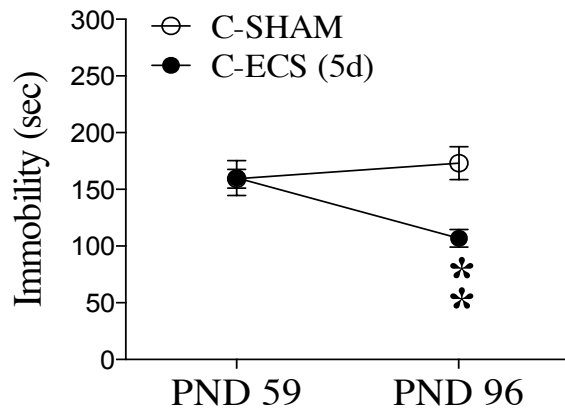


Figura 3. La administración de metanfetamina (METH) en ratas durante la adolescencia tardía (PND 54-57) no induce cambios inmediatos sobre el fenotipo prodepresivo. Los datos representan el promedio \pm SEM del tiempo (seg) inmóvil durante el FST (A) y el tiempo (seg) de latencia a visitar la zona central o al acercarse por primera vez a la comida en el campo abierto durante el NSF (B). Grupos experimentales: Control (0,9 % de salino, 1 ml/kg, i.p.; n=20) y METH (3 x 5 mg/kg, cada 3 horas, 4 días consecutivos; n=20). A) La administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía no modificó los niveles de desespero conductual en el FTS 2 días después de la última dosis (PND 59). Test-*t* de Student no detectó cambios significativos. B) La administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía no modificó los niveles de ansiedad en el NSF 4 días después de la última dosis (PND 61). Test-*t* de Student no detectó cambios significativos.

A

PND 96 - Control-treated rats



B

PND 96 - METH-treated rats

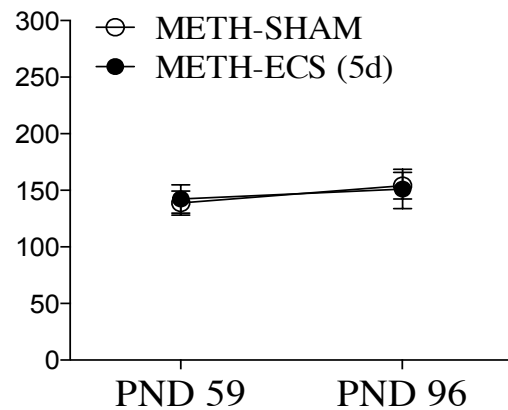


Figura 4. Bloqueo del efecto antidepresivo ejercido tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) inducido por la administración de metanfetamina (METH) durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y la reexposición en la etapa adulta (PND 91-95). Los datos representan el promedio \pm SEM del tiempo (seg) inmóvil durante el test. A) Efecto antidepresivo (disminución de la inmovilidad) ejercido tras el tratamiento repetido con el ECS (C-ECS (5d)) 1 día después de la última sesión (PND 96). Grupos experimentales: C-SHAM (0,9 % salino, 1 ml/kg, i.p., 1 vez al día, PND 91-95, 3 horas después del último pinchazo con el salino, exposición al ECS sin corriente; n=10), C-ECS (5d) (0,9 % salino, 1 ml/kg, i.p., 1 vez al día, PND 91-95, 3 horas después del último pinchazo con el salino, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=10). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak $**p < 0,01$ al comparar el grupo C-SHAM con el grupo control C-ECS (5d) a PND 96. B) Bloqueo del efecto antidepresivo inducido por el ECS en ratas tratadas con metanfetamina. Grupos experimentales: METH-SHAM (5 mg/kg, i.p., 1 vez al día, PND 91-95, 3 horas después del último pinchazo con la metanfetamina, exposición al ECS sin corriente; n=10) y METH-ECS (5d) (5 mg/kg, i.p., 1 vez al día, PND 91-95, 3 horas después del último pinchazo con la metanfetamina, exposición al ECS 5 sesiones 1 por día; n=10). ANOVA de dos vías de medidas repetidas no detectó cambios significativos.

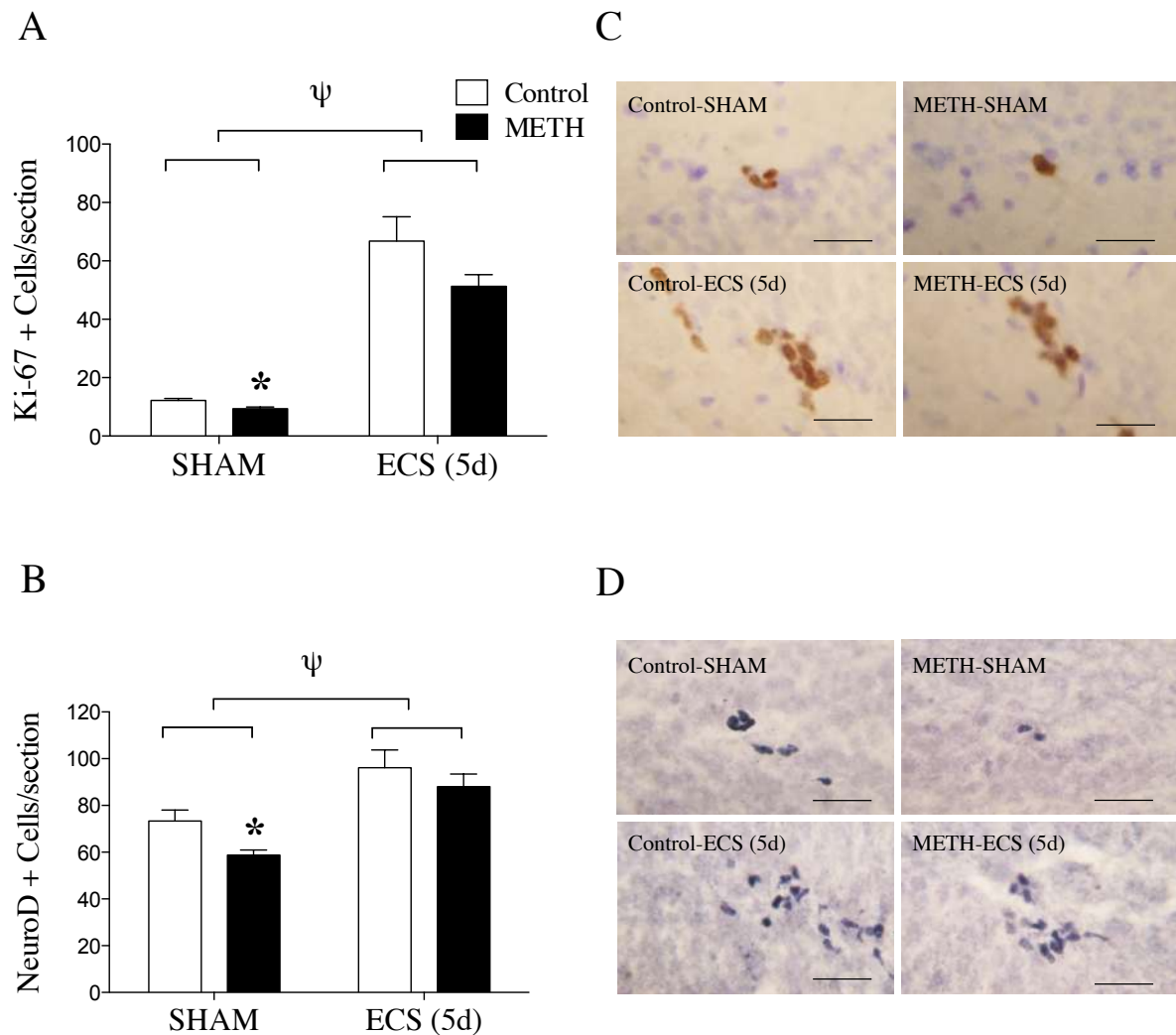


Figura 5. Ausencia de la disminución de marcadores de formación celular en el hipocampo tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) inducido por la administración de metanfetamina (METH) durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y la reexposición en la etapa adulta (PND 91-95). Los datos representan el promedio \pm SEM del número de células positivas por sección. A) Inhibición de la disminución de proliferación celular (células Ki-67+ por sección) inducida por la metanfetamina tras la aplicación repetida del ECS. B) Inhibición de la disminución de supervivencia neuronal temprana (células NeuroD+ por sección) inducida por la metanfetamina tras la aplicación repetida del ECS. Grupos experimentales: Control-SHAM (n=10), Control-ECS (5d) (n=10), METH-SHAM (n=10) y METH-ECS (5d) (n=10). ANOVA de dos vías seguido por el test de comparaciones múltiples de Sidak: $*p < 0,05$ al comparar los grupos Control-SHAM con los grupos METH-SHAM y $^{\psi}p < 0,05$ al comprar los grupos tratados con ECS con los grupos no tratados SHAM. Imágenes representativas tomadas con un microscopio de luz utilizando un objetivo de 63X para C) Ki-67 (marcaje marrón en la capa granular liliácea) y D) NeuroD (marcaje azul oscuro en la capa granular liliácea) de los diferentes grupos experimentales. Guía de 30 μ m.

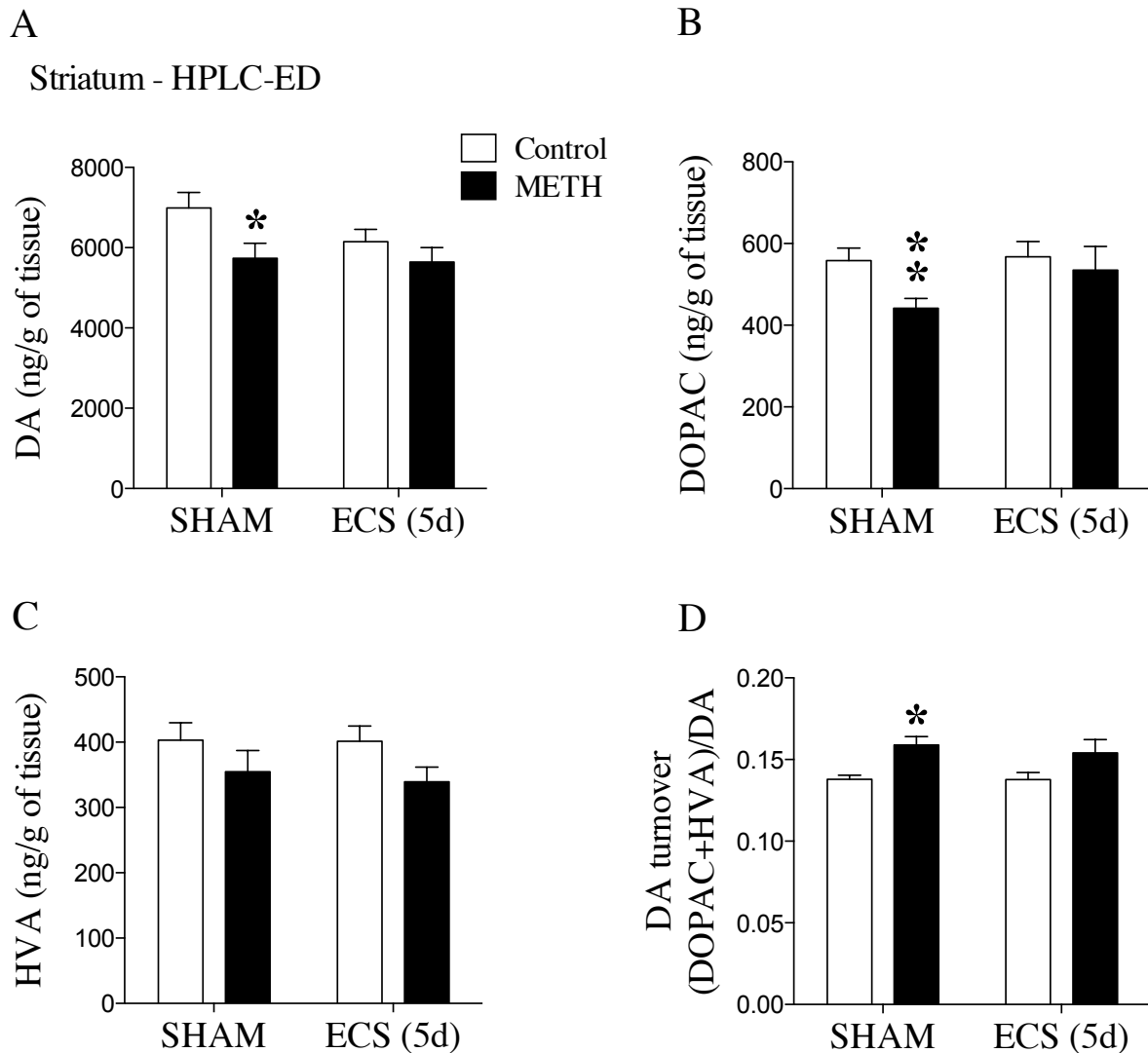


Figura 6. Ausencia de la disminución del contenido monoaminas en el cuerpo estriado tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) inducido por la administración de metanfetamina (METH) durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y la reexposición en la etapa adulta (PND 91-95). Los datos representan el promedio \pm SEM del contenido total en ng de dopamina (DA), 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) por gramo de tejido. A) Bloqueo de la disminución de DA inducido por la metanfetamina tras la aplicación del ECS. B) Bloqueo de la disminución de DOPAC inducido por la metanfetamina tras la aplicación del ECS. C) Contenido de HVA tras la administración de metanfetamina y la aplicación de ECS. D) Bloqueo del aumento en el recambio de dopamina (DA turnover) inducido por la metanfetamina tras la aplicación del ECS. Grupos experimentales: Control-SHAM (n=10), Control-ECS (5d) (n=10), METH-SHAM (n=10) y METH-ECS (5d) (n=10). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak $*p < 0,05$ al comparar el grupo Control-SHAM con el grupo control METH-SHAM para el recambio de DA. *t*-tests múltiples: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ al comparar el grupo Control-SHAM con el grupo control METH-SHAM para los niveles de DA y DOPAC.

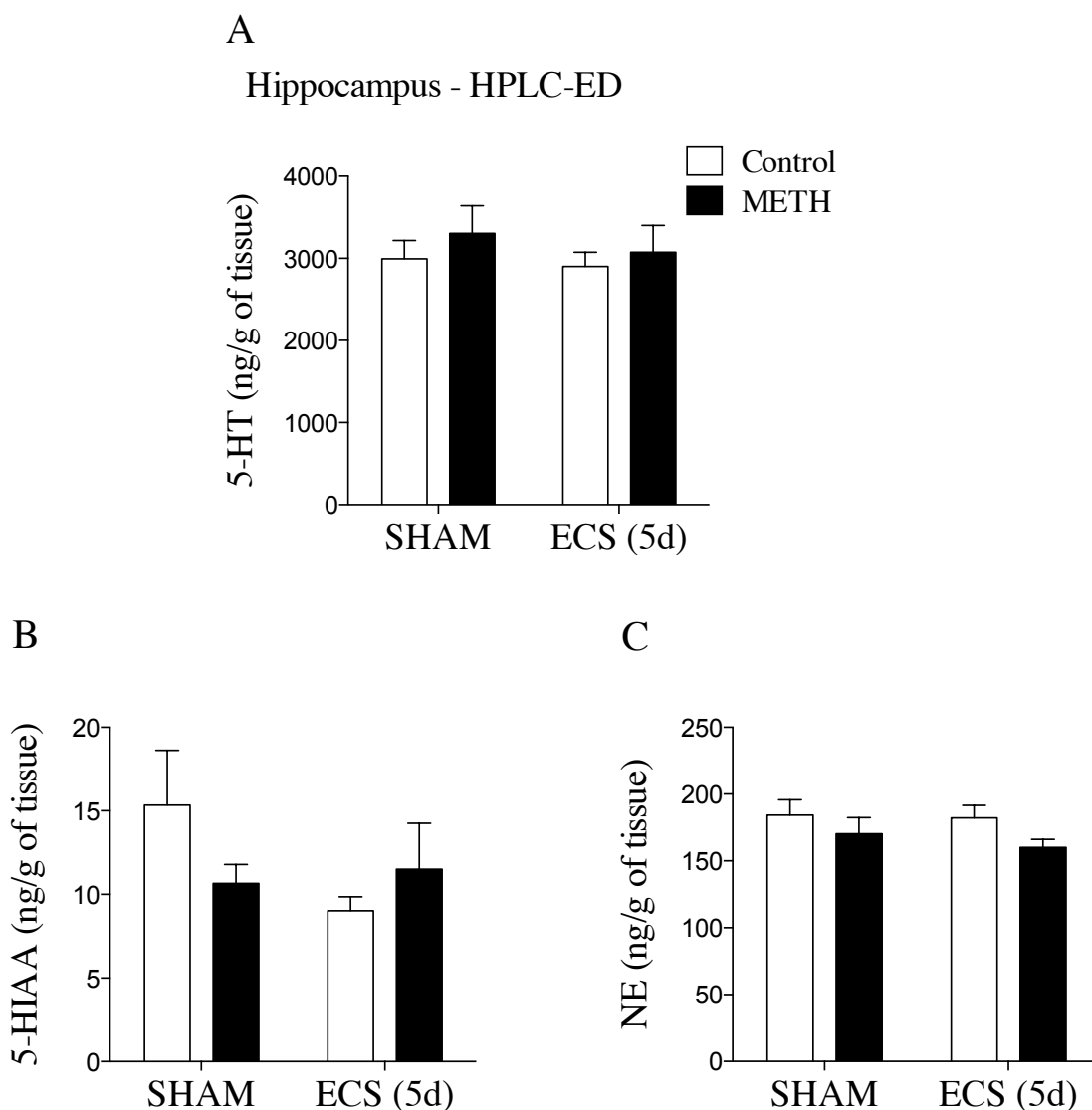


Figura 7. La administración de metanfetamina durante la adolescencia (PND 54-57) y la reexposición en la etapa adulta (PND 91-95) tras la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (ECS (5d) 95 mA, 0,6 s y 100 Hz; 5 sesiones 1 por día) no induce cambios en los niveles de monoaminas en el hipocampo. Los datos representan el promedio \pm SEM del contenido total en ng de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) y norepinefrina (NE) por gramo de tejido. A) Niveles de 5-HT en el hipocampo tras la administración de metanfetamina y la aplicación del ECS. B) Niveles de 5-HIAA en el hipocampo tras la administración de metanfetamina y la aplicación del ECS. C) Niveles de NE en el hipocampo tras la administración de metanfetamina y la aplicación del ECS. Grupos experimentales: Control-SHAM (n=10), Control-ECS (5d) (n=10), METH-SHAM (n=10) y METH-ECS (5d) (n=10). ANOVA de dos vías no detectó cambios significativos.

DISCUSIÓN

ANTECEDENTES

La mayoría de estudios presentes en la literatura científica apuntan a que el inicio temprano en el consumo de sustancias adictivas supone un factor de riesgo que predispone al desarrollo de un uso descontrolado en el consumo y a una futura adicción. Aunque algunos estudios muestran una clara correlación entre la edad de consumo y el desarrollo de la adicción, esto no garantiza que pueda ser un efecto casual. En algunos casos, el consumo regular de las drogas de abuso desarrolla conductas adictivas o de dependencia, a pesar de los numerosos efectos negativos que producen para la salud del individuo. Sin embargo, el desarrollo de dichas conductas no ocurre en todos los consumidores. Gran parte de estos utilizan las drogas de manera recreacional sin desarrollar una dependencia, debido en parte a una falta de efectos reforzantes por parte de las drogas. Por otro lado, otros sucumben a los efectos reforzantes, provocando el consumo periódico o diario de estas sustancias desarrollando una dependencia. La mayoría de consumidores, tal y como indican los estudios epidemiológicos, inician el consumo durante la fase adolescente, aumentando el riesgo de dependencia durante la fase adulta (UNODC, 2018). Aunque estos datos parecen consistentes tanto a nivel epidemiológico como experimental tras la administración de diversas drogas de abuso, se han observado ciertas diferencias en la susceptibilidad a los efectos negativos tras la administración de los psicoestimulantes (p. ej., cocaína *vs.* anfetaminas) (Brunell y Spear, 2006; Teixeira-Gomes et al., 2015). Estos datos ponen de manifiesto cierto grado de insensibilidad al consumo de las anfetaminas durante la adolescencia temprana y una mayor predisposición a los efectos negativos en la adolescencia tardía y/o etapa adulta, pudiendo mediar a largo plazo el desarrollo de conductas adictivas. Además, el consumo de las drogas está asociado a otras patologías aparte de la adicción, como son los trastornos de tipo afectivo (p. ej., depresión o ansiedad). Estas comorbilidades psiquiátricas asociadas al consumo pueden suponer un factor fundamental en el desarrollo de la dependencia a las drogas de abuso. En estudios recientes, se ha observado que la adicción a los psicoestimulantes y otras drogas de abuso modulan negativamente la neurogénesis en áreas del sistema límbico como es el hipocampo (Eisch y Harburg, 2006). Estas modulaciones pueden mediar gran parte los efectos depresivos inducidos tras el consumo de las drogas durante la abstinencia, alterando la susceptibilidad a los efectos negativos y la recaída al consumo (Barr et al., 2018).

VULNERABILIDAD A LAS ADICCIONES: NEUROADAPTACIONES INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE PSICOESTIMULANTES DURANTE LA ADOLESCENCIA

Para determinar si existía una ventana de especial vulnerabilidad a los efectos negativos (p. ej., posible neurotoxicidad) inducidos por los psicoestimulantes (cocaína, MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) se decidió realizar una serie de experimentos durante diferentes etapas de la adolescencia en cerebro de rata. Los resultados obtenidos de estos estudios mostraron un efecto diferencial de los efectos neurotóxicos inducidos por los psicoestimulantes (cocaína vs. derivados anfetamínicos) dependiendo de la edad de administración. Por un lado, la administración repetida de cocaína mostró un incremento del marcador multifuncional FADD y una disminución de la proliferación celular durante los primeros estadios de la adolescencia (Artículo I). Por otro lado, los diferentes derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) provocaron un incremento de los efectos neurotóxicos como una desregulación en los neurofilamentos (Artículo III) o una disminución de la proliferación y supervivencia celular asociada a la modulación de factores neurotróficos (Artículo IV) cuando se administró en los últimos estadios de la adolescencia o en la etapa adulta. Estas observaciones indicaron diferentes ventanas de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por la administración de los distintos psicoestimulantes, pudiendo reflejar diferencias en el estado de maduración del SNC y suponiendo un riesgo diferencial a largo plazo sobre el desarrollo de comorbilidades psiquiátricas en la etapa adulta.

La adolescencia temprana-media como un periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por la cocaína

Los experimentos realizados con cocaína muestran que la administración repetida de esta droga induce efectos diferenciales dependiendo de la etapa adolescente en la que se administre (p. ej., PND 33-39: aumento de FADD en el hipocampo, aumento de CB, y disminución de CB, en la corteza prefrontal; PND 40-46: disminución de los niveles de proliferación celular en el hipocampo e incremento del marcador apoptótico PARP-1) (Artículos I y II). En particular, la administración repetida de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) supuso un aumento del marcador multifuncional FADD en el hipocampo de rata (Artículo I). Este aumento de

FADD no estuvo asociado a una disminución de la forma fosforilada p-FADD, lo que sugirió una disminución del índice de neuroplasticidad (p. ej., posible aumento de los efectos neurotóxicos) durante la adolescencia temprana-media. Resultados previos han demostrado que la administración aguda de cocaína, pero no crónica, es capaz de incrementar los niveles de la proteína FADD en cerebro de roedores (García-Fuster et al., 2009; Álvaro-Bartolomé et al., 2011). Además, animales que presentan de manera basal un incremento de FADD mostraron una mayor propensión al consumo de cocaína en modelos de autoadministración (García-Fuster et al., 2009). El análisis de marcadores de la vía apoptótica en cerebros *post mortem* de adictos a la cocaína han mostrado en la corteza prefrontal una disminución del complejo Fas/FADD, así como del citocromo c, sugiriendo mecanismos contrarregulatorios o acciones antiapoptóticas (Álvaro-Bartolomé et al., 2011). En consonancia con esta observación, el balance entre la forma fosforilada y no fosforilada de FADD, utilizado como índice de neuroplasticidad (Ramos-Miguel et al., 2012) se encontró incrementado, mostrando un aumento de los efectos neuroplásticos en la adicción a la cocaína (Álvaro-Bartolomé et al., 2011). Las diferencias observadas entre los resultados presentados (Artículo I) y los datos existentes en la literatura obtenidos a partir de ratas adultas (García-Fuster et al., 2009; Álvaro-Bartolomé et al., 2011) ponen de manifiesto la relevancia de FADD en los efectos neurotóxicos y/o neuroadaptaciones inducidas por la cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39). Además, cuando la cocaína se administró en ventanas más tardías de la adolescencia (PND 40-46; PND 47-53), a pesar de no observarse modulaciones en los niveles de FADD, sí que se observaron otros efectos neurotóxicos (Artículo I). La administración repetida de cocaína durante la adolescencia media (PND 40-46) aumentó la fragmentación de PARP-1, asociada al daño neuronal en el hipocampo junto con una disminución del marcador Ki-67, indicativo de una menor tasa de proliferación celular basal en el giro dentado (Artículo I). Estos resultados van en línea con los datos publicados en otros trabajos en rata adulta, donde se ha observado un aumento de la muerte neuronal no asociada a la activación de la caspasa-3 tras el consumo de cocaína, debido al incremento de la fragmentación de PARP-1 en cerebros *post mortem* de adictos (Álvaro-Bartolomé et al., 2011). Estudios previos también han demostrado una disminución de la proliferación celular tras la administración de cocaína (Mandyam y Koob, 2012), aunque la mayoría de los estudios se han centrado en evaluar los efectos de la cocaína en ratas adultas. De especial interés es un estudio reciente que demuestra que la administración repetida de cocaína (mismo

paradigma que el utilizado en esta Tesis) induce disminuciones en la tasa de proliferación celular en asociación con un incremento en paralelo de los niveles de ARNm para el FADD en el giro dentado (García-Fuster et al., 2011). Otros estudios han demostrado resultados dispares en cuanto a los efectos de la cocaína sobre marcadores para la neurogénesis en ratas adultas. La administración repetida de cocaína durante la etapa adulta ha demostrado reducciones en la proliferación celular (Yamaguchi et al., 2004; Domínguez-Escribà et al., 2006; García-Fuster et al., 2010) sin alterar la supervivencia y maduración de la células existentes en la mayoría de experimentos realizados (Yamaguchi et al., 2004; Domínguez-Escribà et al., 2006; Deschaux et al., 2014), aunque en algunos estudios sí se han observado reducciones en la supervivencia celular a largo plazo durante la abstinencia (García-Fuster et al., 2010; Sudai et al., 2011).

Para determinar el periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por la cocaína en las distintas etapas durante la adolescencia, no solo fueron evaluados marcadores relacionados con la apoptosis/plasticidad y la neurogénesis hipocampal, sino que también se analizaron marcadores del sistema endocannabinoide, al cual se le ha descrito un papel importante en las propiedades adictivas inducidas por las drogas de abuso (Moreira y Lutz, 2008). Se han descrito como mínimo dos receptores con un papel relevante en el SNC, como son el receptor CB₁ y el CB₂. Aunque se conocen sus propiedades en la adicción a la cocaína (Maldonado et al., 2006), se han observado resultados muy variables tras la administración repetida de cocaína para ambos receptores, y poco se conoce del papel que ejercen durante la adolescencia. Los resultados mostrados en el presente estudio demuestran un incremento de los niveles del receptor CB₁ y una disminución de CB₂ a nivel proteico en la corteza prefrontal, pero no en el hipocampo, de rata tras la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39). La administración de cocaína en otros puntos de la adolescencia más tardía (PND 40-46; PND 47-53) no modificó los niveles de los receptores cannabinoides en ninguna de las regiones analizadas (Artículo II). Las discrepancias observadas en los estudios sobre los receptores cannabinoides dependen de la especie donde se analizan, del diseño experimental, de la dosis de cocaína administrada o de si el análisis se realiza a nivel postranscripcional (ARNm) o postraduccional (proteína). Por ejemplo, en estudios previos realizados a nivel postranscripcional, la cocaína redujo los niveles de CB₁ en la corteza de rata (González

et al., 2002) y los aumentó en la corteza prefrontal de ratón (Blanco et al., 2015), sin producir cambios significativos a nivel hipocampal (González et al., 2002). En cuanto a los niveles de expresión de CB₂, se ha observado un aumento tras la administración de cocaína en el cerebro de ratón (González et al., 2002). A nivel postraduccional, se han determinado incrementos de CB₁ en la corteza prefrontal de ratones (Blanco et al., 2015) y una reducción en esta misma región tanto en cerebros *post mortem* de adictos a la cocaína como en la corteza de ratones, sin observarse cambios a nivel de CB₂ (Álvaro-Bartolomé y García-Sevilla, 2013). Los aumentos observados en la presente Tesis sobre la expresión proteica de CB₁ (Artículo II) podrían comprometer la actividad neuronal a largo plazo (como se ha visto tras estimular el receptor durante la adolescencia temprana-media) provocando una desinhibición en la corteza prefrontal durante la etapa adulta debido a problemas en la maduración de neuronas GABAérgicas (Cass et al., 2014). La utilización de antagonistas para el receptor CB₁ como el AM251 o el SR141716 reducen los efectos reforzantes de la cocaína en modelos de autoadministración (Xi et al., 2008), poniendo de manifiesto la importancia de este receptor en la adicción a la cocaína. Por otro lado, la activación del receptor CB₂ es capaz de inhibir la liberación de dopamina y la autoadministración de cocaína (Zhang et al., 2014), además se ha observado una menor sensibilización locomotora y una menor autoadministración a la cocaína en animales transgénicos que sobreexpresan el receptor CB₂ (Aracil-Fernández et al., 2012). Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral (Artículo II) demuestran por tanto un papel opuesto entre los receptores CB₁ y CB₂ tras la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media, reforzando los argumentos de que la administración de la cocaína durante esta ventana adolescente parece inducir importantes efectos neurotóxicos y neuroadaptativos en diversas regiones del cerebro, y alterar así las respuestas a la cocaína en la etapa adulta.

Por tanto, el análisis conjunto de los resultados expuestos en los Artículos I y II muestran un incremento de los efectos negativos tras la administración de la cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) en diversas regiones como el hipocampo (Artículo I; incremento de FADD) y la corteza prefrontal (Artículo II; incremento de CB₁ y disminución de CB₂), sugiriendo que esta etapa temprana-media durante la adolescencia presenta cierta vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos y/o neuroplásticos inducidos por esta droga de abuso. Por esta razón, se decidió establecer este periodo durante la adolescencia (PND 33-39) para determinar los efectos inducidos

por la cocaína sobre la conducta (p. ej., fenotipo prodepresivo) y las adaptaciones neuronales (p. ej., neurogénesis hipocampal) que se originan a largo plazo durante la abstinencia.

La adolescencia tardía como un periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por los derivados anfetamínicos

En la presente Tesis Doctoral se han realizado estudios comparativos entre diferentes derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) a nivel de los posibles efectos neurotóxicos que inducen en cerebro de rata cuando son administrados en distintas etapas durante la adolescencia (temprana-media: PND 33-36 vs. tardía: PND 54-57).

Los experimentos realizados con el MDMA muestran que la administración repetida de esta droga induce un claro efecto neurotóxico durante la adolescencia, observado tanto a nivel de una pérdida de marcadores serotoninérgicos y GABAérgicos, así como mediante la pérdida de proteínas estructurales cerebrales (p. ej., neurofilamentos, NF) (Artículo III), la disminución de marcadores de neurogénesis hipocampal y del factor neurotrófico BDNF (Artículo IV). Además, como un posible mecanismo adaptativo y/o de defensa a la exposición repetida de MDMA se observó la regulación de proteínas adaptativas y/o neuroplásticas (Artículo III). En particular, se observó una reducción de los niveles para los receptores serotoninérgicos postsinápticos tras la administración MDMA tanto en la adolescencia temprana-media (PND 33-36; disminución del receptor 5-HT_{2A}) como en la adolescencia tardía (PND 54-57; disminución del receptor 5-HT_{2C}). La reducción de estos receptores puede ser debida a una internalización provocada por la elevada estimulación ejercida por el MDMA de manera directa e indirecta o bien por una menor expresión del receptor, provocando una clara desregulación en el recambio de los receptores (Ferguson, 2001). Además, estos efectos neurotóxicos diferenciales durante la adolescencia a nivel postsináptico tras la administración del MDMA pueden deberse en parte a cambios en los patrones de expresión de los diferentes receptores serotoninérgicos durante el propio desarrollo de la adolescencia (Li et al., 2004). Los resultados concuerdan con los efectos neurotóxicos demostrados en la literatura; dosis altas de MDMA disminuyen marcadores serotoninérgicos incluso una semana después de la última administración (Schmidt et al., 1986; Xie et al., 2006). Un marcador muy utilizado en la literatura científica para

determinar la neurotoxicidad serotoninérgica es el transportador presináptico SERT (McCann et al., 2005; Xie et al., 2006; Verrico et al., 2007), sin embargo, poco se conoce del efecto inducido por el MDMA sobre marcadores postsinápticos. Algunos estudios en ratas han demostrado reducciones de los niveles del receptor 5-HT_{2A} tras la administración de MDMA en varias regiones como el hipocampo (Scheffel et al., 1992) o la corteza (Reneman et al., 2002). Resultados similares han sido observados para la expresión del ARNm del receptor 5-HT_{2C} en el hipocampo (Yau et al., 1997), datos que van en línea con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral. Actualmente se debate si estas pérdidas serotoninérgicas inducidas por el MDMA son debidas a un incremento de la muerte neuronal o a una desregulación de las neuronas serotoninérgicas (Biezonski y Meyer, 2011). Además, estas alteraciones en las fibras serotoninérgicas pueden recuperarse parcialmente como se ha observado en modelos de roedores (Green, 2003) o pueden ser permanentes como se ha observado en primates no humanos (Hatzidimitriou et al., 1999). También se han observado alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión. Se inmunodetectó el enzima glutamato descarboxilasa (GAD2) como marcador específico para neuronas GABAérgicas, el cual se observó disminuido tanto en la adolescencia temprana-media (PND 33-36) como en la tardía (PND 54-57) tras la administración crónica del MDMA. Este resultado concuerda con los datos publicados por otros autores donde se demuestra una neurodegeneración GABAérgica tras administrar el MDMA (Armstrong y Noguchi, 2004; Perrine et al., 2010).

El análisis de los neurofilamentos en el hipocampo mostró importantes reducciones en los contenidos de NF-L y NF-M tras la administración crónica de MDMA en ambas edades durante la adolescencia (Artículo III). Varios estudios previos han demostrado una desregulación de los neurofilamentos tras la exposición a distintas drogas de abuso como los opiáceos (García-Sevilla et al., 1997), cocaína (Beitner-Johnson et al., 1992) o metanfetamina (Sanchez et al., 2003), pero poco se sabía hasta el momento de su regulación tras la administración del MDMA. Estos resultados demuestran una alteración de la estructura neuronal, pudiendo afectar la integridad de las conexiones neuronales en respuesta al MDMA. Además, se observó que la administración aguda de MDMA fue capaz de disminuir los niveles de los NF-L y M durante la adolescencia tardía (PND 54-57), demostrando una mayor sensibilidad a los efectos neurotóxicos de carácter estructural durante esta etapa, o por otro lado indicativo

de una menor susceptibilidad durante la adolescencia más temprana (Artículo III). La pérdida de neurofilamentos que comprometen la estructura del citoesqueleto puede inducir la apoptosis programada (Kothakota et al., 2016), al igual que la estimulación del receptor 5-HT_{2A} postsináptico por parte del MDMA (Capela et al., 2007).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral sobre el análisis de marcadores de destino celular mostraron una disminución de FADD tras la administración crónica de MDMA (Artículo III), asociado a un aumento del índice de neuroplasticidad (p-FADD/FADD), lo que posiblemente sugiere una inhibición de la vía apoptótica extrínseca y un incremento de las acciones neuroplásticas. Para comprender mejor el estado de la apoptosis se analizaron proteínas de la vía apoptótica intrínseca. Se observó una disminución de proteínas activadoras de la apoptosis como Bax y el citocromo c en ambas etapas de la adolescencia. Además, se vio una menor degradación de PARP-1, indicando una disminución de daño en el ADN celular. Esta inhibición de la vía intrínseca va en la misma dirección de lo observado en la vía extrínseca, lo que indicaría una menor activación de las caspasas y por lo tanto una menor fragmentación de PARP-1, mediando efectos contrarregulatorios para detener o revertir los efectos neurotóxicos inducidos por el MDMA. La puesta en marcha de mecanismos antiapoptóticos o neuroplásticos tras la administración de drogas se ha descrito en varias ocasiones (Ramos-Miguel et al., 2012) y además, se han asociado a modulaciones conductuales relacionadas con la adicción como la sensibilización (Ramos-Miguel et al., 2010).

La administración crónica de MDMA disminuyó los niveles de proliferación celular (células Ki-67 positivas) en ambas etapas y la supervivencia celular (células BrdU positivas) durante la adolescencia tardía (PND 54-47). Estos resultados van en línea con los publicados por otros autores, donde se han observado alteraciones en los niveles de marcadores para la neurogénesis, especialmente afectando a la supervivencia celular, tras la administración de altas dosis de MDMA durante la adolescencia (Hernández-Rabaza et al., 2006; Catlow et al., 2010) y la etapa adulta (Hernandez-Rabaza et al., 2010). Las alteraciones en los niveles de proliferación celular han sido más variables. En algunos estudios, dosis elevadas de MDMA durante la adolescencia han incrementado los niveles de proliferación (Catlow et al., 2010) o no los han modificado (Domínguez-Escribà et al., 2006). También, se han observado disminuciones en la proliferación celular de manera dosis dependiente en ratones que fueron administrados con MDMA durante 30 días (Cho et al., 2007). Esta discrepancia

en los valores de proliferación celular observados entre los estudios y los datos presentados en la presente Tesis Doctoral pueden deberse a diferencias en la especie, en el paradigma de administración, así como en el marcador utilizado (BrdU *vs.* Ki-67), debido a que el marcaje con la molécula exógena BrdU utilizado para determinar la proliferación depende de la dosis y la frecuencia de administración, en cambio el marcador Ki-67 utilizado en el presente estudio es un marcador de expresión endógeno.

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, los factores neurotróficos juegan un papel importante en las neuroadaptaciones inducidas por las drogas psicoestimulantes y están relacionados con la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Mattson et al., 2004). Los resultados de la presente Tesis Doctoral mostraron una regulación diferencial de la proteína BDNF en función del tipo de droga psicoestimulante, la dosis y la edad de administración. En concreto, la administración crónica de MDMA redujo los niveles de BDNF (forma precursora y madura) en ambas etapas de la adolescencia (Artículo IV), en paralelo a los efectos descritos anteriormente sobre marcadores de neurogénesis hipocampal y sugiriendo un papel importante de esta molécula en la plasticidad hipocampal, tal y como se ha demostrado en otros experimentos (Somkuwar et al., 2016)

En cuanto a la administración de metanfetamina, solo se han evaluado los posibles efectos neurotóxicos a nivel de la regulación de la neurogénesis hipocampal y marcadores asociados durante dos etapas de la adolescencia (temprana-media: PND 33-36 *vs.* tardía: PND 54-57). Los resultados del Artículo IV muestran que la metanfetamina fue capaz de reducir los niveles de proliferación celular exclusivamente cuando se administró durante la adolescencia tardía (PND 54-57), sin disminuir los niveles de supervivencia celular de manera estadísticamente significativa, a pesar de observarse una marcada disminución. Experimentos realizados en modelos de administración forzada o autoadministración de metanfetamina han demostrado un impacto negativo sobre distintos marcadores para la neurogénesis, inhibiendo la proliferación, diferenciación y la supervivencia celular. Estos datos son un indicativo del posible incremento de muerte celular inducido por la metanfetamina (Hildebrandt et al., 1999; Teuchert-Noodt et al., 2000; Yuan et al., 2011) o de reducciones en el número de progenitores neuronales asociados a una menor división de los neuroblastomas que conlleva a una menor presencia de progenitores que sobrevivirán como neuronas inmaduras (Mandyam et al., 2008; Mandyam y Koob, 2012; Recinto

et al., 2012). Por otro lado, la metanfetamina aumentó los niveles del precursor de BDNF durante la adolescencia tardía (PND 54-57), lo que sugiere posibles respuestas neuroadaptativas que podrían ser importantes en los procesos neuronales responsables del comportamiento adictivo (Graham et al., 2007).

Finalmente, la administración de d-anfetamina no modificó los niveles de proliferación ni de supervivencia celular en ninguna de las etapas de la adolescencia estudiadas (Artículo IV). Aunque no se han observado cambios significativos, la administración aguda de d-anfetamina indujo un marcado incremento en la proliferación celular durante la adolescencia tardía (PND 54-57). Los efectos de la d-anfetamina sobre marcadores de neurogénesis no han sido tan estudiados en la literatura científica como con otras drogas psicoestimulantes. De hecho, y en línea con los presentes resultados, la gran mayoría de estudios llevados a cabo han sido realizados en ratas adultas, demostrando una ausencia de efectos negativos a nivel de la proliferación o supervivencia celular tras la administración crónica de la droga (Barr et al., 2010). Además, un estudio donde se evaluó el efecto de la administración crónica de d-anfetamina durante la adolescencia hasta la etapa adulta reportó un aumento de la supervivencia celular sin producir modificaciones en los niveles de proliferación (Dabe et al., 2013). Por otro lado, la administración crónica de d-anfetamina aumentó los niveles de BDNF (forma precursora y madura) durante la adolescencia tardía (PND 54-47), sugiriendo un papel importante de la forma madura de este factor neurotrófico en la supervivencia celular (Artículo IV) o la neurogénesis (Rossi et al., 2006; Graham et al., 2007). Esto podría estar asociado a los efectos beneficiosos observados en dosis terapéuticas de d-anfetamina utilizadas en el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Dabe et al., 2013).

En global, los resultados obtenidos en ambos estudios (Artículos III y IV), van en el mismo sentido a lo propuesto por otros estudios (Teixeira-Gomes et al., 2015), y demuestran cierto grado de insensibilidad o una mejor adaptación a los efectos negativos inducidos por los derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) durante las etapas más tempranas de la adolescencia. Por tanto, para evaluar los posibles efectos inducidos por los derivados anfetamínicos (p. ej., metanfetamina) durante la abstinencia sobre la conducta (p. ej., fenotipo prodepresivo y proadictivo) y las adaptaciones neuronales (p. ej., neurogénesis hipocampal) se decidió

utilizar la adolescencia tardía (PND 54-57) o la etapa adulta, como un periodo de mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por estos compuestos.

CONSECUENCIAS DERIVADAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PSICOESTIMULANTES: EFECTOS CONDUCTUALES Y MOLECULARES

En base a los resultados obtenidos en el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral, se decidió utilizar la cocaína y la metanfetamina para determinar las consecuencias derivadas de su administración a nivel conductual y molecular. Visto que la administración de los distintos psicoestimulantes produce efectos neurotóxicos de manera diferencial dependiendo de la edad de administración (cocaína PND 33-39 *vs.* derivados anfetamínicos PND 54-57), se utilizaron estas etapas selectivas de mayor vulnerabilidad para determinar las consecuencias a largo plazo de la cocaína y la metanfetamina. En general, los resultados principales derivados de estos estudios demostraron un incremento de los efectos negativos a largo plazo tras el consumo de estos psicoestimulantes. En particular, la cocaína administrada durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) indujo en la etapa adulta un fenotipo prodepresivo (p. ej., comorbilidad inducida por la droga) pero solo tras una reexposición aguda a la droga (véase Artículo V *vs.* Artículo I, sin reexposición), hecho asociado a una disminución de la actividad neuronal en el estriado dorsal (Artículo V). Por otra parte, la administración repetida de metanfetamina en la etapa adolescente tardía (PND 54-57; Anexo Experimental II) o en la etapa adulta (Artículo VI) no indujo cambios en los niveles de desespero conductual durante la abstinencia prolongada, pero aumentó de la sintomatología proanhedónica y proactiva (Artículo VI), asociado a disregulaciones en los sistemas de neurotransmisión (p. ej., principalmente dopaminérgicos) y marcadores de neuroplasticidad (Artículo VI, Anexo Experimental II).

Consecuencias derivadas de la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39)

Los resultados mostrados en el Artículo V demuestran que la administración de cocaína durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) no indujo efectos inmediatos sobre la sintomatología depresiva medida en el test de natación forzada 24 horas después de la última administración (PND 40). Por otro lado, para determinar las consecuencias derivadas de la administración de cocaína (PND 33-39) a largo plazo en

la etapa adulta se realizaron dos trabajos. En el primer estudio (Artículo I) se observó que ninguno de los dos paradigmas de administración repetida de cocaína (7 vs. 14 días) durante la etapa de vulnerabilidad adolescente (PND 33-39 o PND 33-46) indujo efectos a largo plazo sobre el desespero conductual evaluado en el test de natación forzada en la etapa adulta (PND 64). Sin embargo, posteriormente se desarrolló otro estudio (Artículo V), donde se ampliaron los análisis comportamentales y se evaluó además el efecto de la reexposición aguda a la cocaína en la etapa adulta (PND 71) en animales con una historia de cocaína durante la adolescencia (PND 33-39). Cuando se evaluaron los efectos a largo plazo, tras un periodo de 31 días de abstinencia forzada, los animales con una historia previa de cocaína durante la adolescencia que fueron reexpuestos a la cocaína (grupos Coc +coc) de manera aguda en la etapa adulta (PND 71) mostraron un incremento del desespero conductual (aumento del tiempo de inmovilidad) al compararlo con los animales que no recibieron cocaína durante la adolescencia (Sal +coc). Además, las ratas que fueron reexpuestas de manera aguda al suero salino en la etapa adulta (PND 71) (p. ej., condiciones similares al Artículo I) no mostraron cambios en los niveles de desespero conductual (Coc +sal vs. Sal +sal), replicando los datos obtenidos en el Artículo I, y sugiriendo que es necesario una reexposición a la cocaína en la etapa adulta para observar los efectos negativos prodepresivos derivados de la exposición en la etapa adolescente (véase discusión más detallada en los Artículos I y V). Para caracterizar mejor el fenotipo prodepresivo se evaluaron otros aspectos comportamentales de las conductas afectivas, como la ansiedad y la anhedonia (Artículo V). Los resultados demuestran que la cocaína durante la adolescencia no indujo un mayor estado proansigénico en el campo abierto en la rata adulta (PND 73), aunque sí redujo el consumo de sacarosa (PND 77), indicando un fenotipo proanhedónico. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Zilkha y colaboradores (Zilkha et al., 2014), y refuerzan la importancia de evaluar otros aspectos de carácter emocional que pueden estar afectados y aportan una valiosa información acerca del fenotipo prodepresivo inducido por el consumo de psicoestimulantes. El incremento del desespero conductual (tras la reexposición aguda a la cocaína) junto con el aumento de la anhedonia, refuerzan la idea de que el consumo de cocaína durante los primeros estadios de la adolescencia supone un incremento de los efectos negativos a largo plazo durante la etapa adulta. Para determinar si estos efectos negativos perduraron a lo largo del tiempo, los animales fueron reexpuestos de nuevo de forma aguda a la cocaína (PND 98). En este punto no se observaron diferencias

significativas en el desespero conductual en los animales con una historia previa de cocaína, indicativo de una disipación del efecto negativo asociado a la reexposición con la droga (véase discusión más detallada en el Artículo V).

A nivel molecular, se observó que los efectos neurotóxicos inmediatos inducidos por la cocaína cuando se administró de manera repetida durante la adolescencia temprana-media (PND 33-39) y evaluados a PND 40 (p. ej., aumento de FADD, incremento del receptor CB₁ o una disminución de la proliferación celular y del receptor CB₂) no perduraron en el tiempo (PND 64), indicativo de una transitoriedad y normalización de estos efectos negativos moleculares a largo plazo (Artículo I). En esta misma línea, la administración de cocaína (PND 33-39) no indujo cambios a largo plazo en los niveles de proliferación celular hipocampal (Artículo I) ni tras la reexposición aguda con cocaína en PND 71 (Artículo V). A pesar de estos resultados negativos, y como ya se ha comentado anteriormente, la neurogénesis hipocampal se encuentra inhibida tras la administración de distintas drogas de abuso, entre ellas la cocaína, (Mandyam y Koob, 2012), así como en estados depresivos (Jacobs et al., 2000), pero su regulación puede depender de varios factores. Por ejemplo, un estudio reciente, que sigue el mismo paradigma de administración de cocaína durante la etapa en la adolescencia (PND 33-39) que en la presente Tesis, mostró disminuciones en los niveles de proliferación y supervivencia celular a largo plazo (PND 77) (García-Fuster et al., 2017). Sin embargo, estos experimentos estaban realizados en animales criados en base a su bajo nivel de respuesta en ambientes novedosos (bLR) y que habían sido expuestos a varias sesiones de condicionamiento de Pavlov (p. ej., conducta dirigida a la recompensa), por lo que los efectos negativos inducidos a largo plazo por la cocaína sobre la proliferación celular podrían estar atribuidos a cambios neuroplásticos en respuesta al aprendizaje de la conducta (García-Fuster et al., 2017).

A pesar de que la cocaína administrada en la adolescencia no indujo cambios en el hipocampo a largo plazo (p. ej., ausencia de modulación de la proliferación celular), y vistos los resultados conductuales recién descritos (p. ej., aumento en el desespero conductual y conducta proanhedónica; Artículo V) se analizaron otras regiones de interés. En particular, se decidió analizar el estriado dorsal, región de gran relevancia en el procesamiento de los estímulos placenteros, así como el refuerzo a las distintas sustancias. Los resultados principales demostraron una disminución de los niveles de activación neuronal, medidos por los niveles de activación del gen de expresión

temprana c-Fos, tras la reexposición aguda de cocaína (PND 71) en animales previamente expuestos a cocaína en la adolescencia (PND 33-39). Los resultados obtenidos en el presente estudio (Artículo V) muestran una disminución de la actividad neuronal en el estriado dorsal como posible consecuencia de una reorganización en los circuitos de recompensa en animales con un fenotipo prodepresivo que han tenido una historia previa con la droga y han sido reexpuestos a ella en la etapa adulta (véase discusión más detallada en el Artículo V).

En conjunto, los resultados muestran que la administración de cocaína durante la adolescencia (PND 33-39) favorece el desarrollo de conductas negativas a largo plazo, como un incremento del estado amotivacional (aumento de la anhedonia), especialmente tras una reexposición a la cocaína en la etapa adulta (aumento del desespero conductual), y disminuye la activación neuronal en el estriado dorsal. Estos datos sugieren que la administración de cocaína durante la adolescencia aumenta la susceptibilidad a sufrir futuras comorbilidades psiquiátricas y adaptaciones neurales persistentes que pueden desencadenar y/o participar en los mecanismos de recaída.

Consecuencias derivadas de la administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y/o la etapa adulta

Para determinar las consecuencias a nivel comportamental y molecular inducidas por la administración de metanfetamina en la adolescencia tardía o la etapa adulta se realizaron tres estudios. A nivel conductual la metanfetamina administrada en la etapa adolescente tardía (PND 54-57) no mostró efectos inmediatos sobre los niveles de desespero conductual (PND 59) ni de ansiedad (PND 61) (véase Anexo Experimental II). A diferencia de lo observado en otros estudios, los primeros estadios de la abstinencia están asociados a la aparición de síntomas negativos tras el cese del consumo, especialmente tras una administración en atracón. El estado de euforia desaparece dando paso a un incremento de los efectos negativos como la ansiedad, depresión, confusión o problemas cognitivos entre otros efectos (Newton et al., 2005). En animales de experimentación, el consumo de metanfetamina durante la adolescencia se ha asociado a un incremento del fenotipo prodepresivo (Joca et al., 2014; Rud et al., 2016) y a un incremento en el deterioro cognitivo (Loxton y Canales, 2017) a largo plazo, aunque en algunos estudios estos datos han sido inconsistentes, mostrando efectos antidepresivos (Armstrong et al., 2001; Schutová et al., 2010). Las posibles diferencias entre los resultados que se observan en la literatura y los presentados en el

presente estudio (Anexo Experimental II) pueden ser debidas a las distintas edades de los animales a la hora de testar los efectos prodepresivos. La mayoría de estos estudios analizan las consecuencias comportamentales a largo plazo, no inmediatamente en animales jóvenes adultos. La insensibilidad de los animales más jóvenes a los efectos negativos asociados al consumo de los psicoestimulantes como las anfetaminas observados en la presente Tesis doctoral podría ser la respuesta a la ausencia de efectos comportamentales inmediatos (Teixeira-Gomes et al., 2015). Por otro lado, la abstinencia prolongada tras el consumo de metanfetamina está asociada a la aparición de diversas consecuencias a nivel molecular y comportamental (neurotoxicidad, búsqueda compulsiva de la droga o la recaída) (Krasnova y Cadet, 2009). Los resultados de la presente Tesis mostraron que la metanfetamina administrada en la etapa adolescente tardía (PND 54-57) no indujo efectos a largo plazo tras reexposición repetida a la droga (PND 91-95) sobre los niveles de desespero conductual (PND 96) (véase Anexo Experimental II). Además, en línea con estos resultados, se realizó otro estudio (Artículo VI), donde la administración de metanfetamina en ratas adultas tampoco indujo efectos sobre el desespero conductual tras 25 días de abstinencia. Sin embargo, estos datos mostraron un incremento de la anhedonia (p. ej., disminución del consumo voluntario de sacarosa) en ratas previamente expuestas a metanfetamina (para más detalles, véase Artículo VI). Además, los animales que mostraron un menor consumo de sacarosa en el test de libre elección en botella permanecieron más tiempo inmóviles en el test de natación forzada, mostrando una asociación entre estas dos variables (Artículo VI), y sugiriendo, en línea con los datos observados en la literatura, un aumento del fenotipo proanhedónico durante la abstinencia a la metanfetamina (Iijima et al., 2013; Koob, 2014). El incremento de los efectos negativos durante la fase de abstinencia puede provocar la vuelta al consumo de la droga, favoreciendo mayores índices de recaída para contrarrestar los efectos negativos (Koob y Le Moal, 2006). En este sentido, estos animales fueron expuestos a un modelo de consumo voluntario de metanfetamina para evaluar su fenotipo proadictivo. Este modelo de doble elección en botella ha sido propuesto como un método alternativo para determinar la recaída al consumo (Wheeler et al., 2009), observándose resultados similares a los obtenidos en modelos de autoadministración intravenosa (Cruickshank y Dyer, 2009). En concreto, los animales que recibieron la metanfetamina, y que presentan un mayor fenotipo proanhedónico, mostraron un incremento en el consumo voluntario de metanfetamina durante la abstinencia. Estos resultados concuerdan con los publicados por otros grupos,

donde se ha observado un incremento del consumo oral voluntario de metanfetamina tras largos periodos de abstinencia (Doyle et al., 2015; Hajheidari et al., 2015) y refuerzan el papel de los efectos negativos que emergen durante la abstinencia y que pueden mediar las recaídas al consumo.

La abstinencia prolongada a metanfetamina no solo se ha asociado con un incremento de la sintomatología proanhedónica y proadictiva, sino con multitud de cambios neuroplásticos e hipofunciones de los sistemas de neurotransmisión que pueden alterar estas respuestas comportamentales (Koob y Volkow, 2010). El análisis del contenido de monoaminas en regiones del sistema límbico como son el hipocampo y el cuerpo estriado desveló una reducción de los niveles de monoaminas indicando una hipofunción de estas vías a largo plazo tras la administración de la metanfetamina (véase Artículo VI y Anexo Experimental II). En concreto se observaron reducciones de los niveles de 5-HT y NE en el hipocampo y de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado tras varios días de abstinencia a metanfetamina. Estos resultados demostraron un efecto neurotóxico a largo plazo inducido por la administración de la metanfetamina en distintas regiones del cerebro, y acorde a la literatura del campo (Moszczynska y Callan, 2017). Por otro lado, en estos animales se estudiaron otros marcadores a nivel molecular en varias regiones cerebrales para evaluar los posibles efectos neurotóxicos que acompañan a la pérdida monoaminérgica. Por ejemplo, en estos animales se observó una disminución de la proteína multifuncional FADD, causando un incremento del índice p-FADD/FADD en el hipocampo (véase Artículo VI), sugiriendo un incremento de la plasticidad neuronal o la puesta en marcha de mecanismos adaptativos de reparación para contrarrestar los daños inducidos por la metanfetamina. En este sentido, se han observado resultados adaptativos similares para otras drogas de abuso, como por ejemplo para adictos a opiáceos (Ramos-Miguel et al., 2009) o a cocaína (Álvaro-Bartolomé et al., 2011), e incluso en animales tras la administración de MDMA (Artículo III). Además, esta disminución de FADD hipocampal puede estar asociada a la reducción de memoria, aprendizaje y funciones ejecutivas observada en la abstinencia a la metanfetamina (Moszczynska y Callan, 2017), tal y como se ha observado en estudios donde se ha asociado la disminución en los niveles de FADD con el deterioro cognitivo (Ramos-Miguel et al., 2017; Hernández-Hernández et al., 2018). Asimismo, los animales con una historia previa de metanfetamina mostraron una asociación entre el volumen de metanfetamina consumido

de manera voluntaria con los cambios a nivel de FADD en el hipocampo, sugiriendo un papel importante de este marcador en las adaptaciones comportamentales y moleculares llevadas a cabo durante la abstinencia (Artículo VI).

Por otro lado, se evaluaron las posibles consecuencias neurotóxicas inducidas por la administración de metanfetamina en la adolescencia tardía (PND 54-57) a nivel de marcadores de la neurogénesis hipocampal tras un período prolongado de abstinencia forzada (PND 91, véase Artículo VII; y PND 97, véase Anexo Experimental II). Los resultados del Artículo VII muestran una disminución en la supervivencia celular (disminución de células BrdU positivas; 41-43 días de edad) sin mostrar alteraciones en la proliferación celular (células Ki-67 positivas) ni en la supervivencia neuronal temprana (células neuroD positivas) en la etapa adulta (PND 91). Además, la reexposición aguda a la metanfetamina durante la etapa adulta (PND 91) en animales que nunca habían recibido metanfetamina produjo una marcada reducción en la proliferación celular, indicativo de los posibles efectos negativos inmediatos inducidos por la metanfetamina, y que podrían inducir las reducciones duraderas observadas a nivel de la supervivencia celular. Esta reducción en la proliferación celular tras la reexposición aguda a la droga no se observó en animales con una historia previa con la metanfetamina (PND 54-57), mostrando cierta insensibilidad a los efectos negativos agudos (véase Artículo VII). Por otro lado, tras recibir metanfetamina en la adolescencia (PND 54-57), cuando los animales, son reexpuestos de manera repetida durante 5 días a metanfetamina en la etapa adulta (PND 91-95) se observaron disminuciones tanto en la proliferación celular (Ki-67) como en la supervivencia neuronal temprana (NeuroD, véase Anexo Experimental II). Los efectos duraderos de la metanfetamina sobre la neurogénesis hipocampal podrían estar relacionados con la aparición de efectos negativos emergentes como se ha visto en un estudio publicado por Loxton y Canales (2017), donde se ha demostrado que la administración de metanfetamina durante la adolescencia produce efectos negativos a largo plazo sobre el deterioro cognitivo y la neurogénesis (Loxton y Canales, 2017) o como se ha mostrado en el Artículo VI de la presente Tesis Doctoral. Por lo tanto, terapias que mejoren los déficits en la neurogénesis durante la abstinencia a la metanfetamina podrían tener una gran relevancia terapéutica para revertir los efectos negativos asociados a este consumo (fenotipo proanhedónico y/o proadictivo). Visto que la administración de la metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) produjo una disminución en

los niveles de supervivencia celular a largo plazo (células entre 41-43 días de vida), se evaluaron los niveles de BDNF, dado su papel importante en la regulación de los diferentes estadios de la neurogénesis (Lee et al., 2000; Somkuwar et al., 2016). Los resultados mostraron una disminución en los niveles de la forma madura de BDNF tras la reexposición aguda a la metanfetamina, al igual que tras 34 días de abstinencia prolongada (Artículo VII). Tanto la reducción de la proliferación celular observada tras la reexposición aguda como la reducción de la supervivencia celular tras 34 días de abstinencia a la metanfetamina, sugieren un posible efecto inducido por el BDNF. Se ha observado que reducciones en los niveles de BDNF presentes en el suero de pacientes drogadictos a la metanfetamina están asociadas a un aumento del riesgo de padecer depresión durante la abstinencia (Ren et al., 2017), por lo que cabe pensar que las disminuciones en los niveles de BDNF y de neurogénesis podrían tener un impacto negativo sobre la sintomatología amotivacional observada durante la fase de abstinencia. Además, se ha observado una regulación en paralelo de los niveles de la forma madura de BDNF con la expresión de c-Fos en el hipocampo tras la administración de metanfetamina (PND 54-57); al igual que una reducción de Fos B (Artículo VII), sugiriendo un incremento de los efectos neurotóxicos a largo plazo (Palop et al., 2003; Kuroda et al., 2010) (véanse más detalles de la discusión en el Artículo VII).

Por tanto, los resultados obtenidos de estos tres estudios (Artículos VI y VII, Anexo Experimental II) demuestran consecuencias importantes a nivel comportamental y molecular derivadas de la administración previa de metanfetamina. El incremento del fenotipo proanhedónico y proadictivo (Artículo VI) podría estar asociado a las neuroadaptaciones descritas en estos estudios (Artículos VI y VII, Anexo Experimental II), por lo tanto, la aplicación de tratamientos que puedan mejorar y/o revertir estas neuroadaptaciones (p. ej., la neurogénesis) podrían disminuir las consecuencias comportamentales derivadas del consumo de la metanfetamina y mejorar así los índices de recaída al consumo durante la abstinencia.

EL ECS MEJORA CIERTOS MARCADORES MOLECULARES ALTERADOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE METANFETAMINA

El presente estudio (Anexo Experimental II) trató de evaluar si los animales con una historia previa de metanfetamina durante la adolescencia (PND 54-57) se beneficiarían durante la etapa adulta del posible efecto antidepresivo inducido por la aplicación repetida del shock electroconvulsivo (Anexo Experimental I) al ser reexpuestos de manera concomitante a la metanfetamina (PND 91-95). Los resultados comportamentales (Anexo Experimental II) mostraron que la exposición a la metanfetamina durante la adolescencia tardía (PND 54-57) y la posterior reexposición repetida en la etapa adulta (PND 91-95) no indujo cambios a nivel del desespero conductual (véase Anexo Experimental II y discusión previa). Sin embargo, la exposición a metanfetamina (adolescencia y reexposición en rata adulta) impide observar el efecto antidepresivo esperado inducido por el shock electroconvulsivo (p. ej., disminución del tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada a PND 96, Anexo Experimental II). Hasta el momento, no se han encontrado estudios donde se utilice un diseño experimental similar al mostrado en el presente trabajo. En referencia a otro derivado anfetamínico, existe un estudio realizado en polluelos de gallinas donde los efectos comportamentales inducidos por la d-anfetamina se bloquearon mediante la administración de fármacos antidepresivos y antihistamínicos (Schrold, 1972). El bloqueo de estos efectos comportamentales inducidos por la d-anfetamina puede deberse al impedimento de la acumulación de la d-anfetamina en neuronas serotoninérgicas, a una inhibición de la liberación de neurotransmisor por parte de la droga, al bloqueo de los receptores serotoninérgicos que impiden la liberación del neurotransmisor o a una combinación de todas estas acciones. Sin embargo, el bloqueo que ejerce la metanfetamina sobre el efecto antidepresivo inducido por el ECS (Anexo Experimental II) va en contra a lo observado por Schrold (1972). Estas diferencias pueden deberse al mayor potencial que tiene la metanfetamina para ejercer efectos negativos a nivel neurotóxico en comparación con la d-anfetamina (Artículo IV), o la diferencia en el tipo de antidepresivo utilizado, ya que la utilización de un antidepresivo farmacológico puede inhibir el metabolismo hepático (Dingell y Bass, 1969) alterando las concentraciones de la droga y sus metabolitos neurotóxicos en el SNC (Teixeira-Gomes et al., 2015). Otro factor importante sería el mecanismo de acción por el cual el antidepresivo ejerce su acción. En este sentido, el ECS media sus acciones

antidepresivas, al menos en parte, a través de la activación de la neurogénesis hipocampal (véanse experimentos derivados de la presente Tesis Doctoral en los que la administración de un inhibidor farmacológico de la proliferación celular como es la temozolamida, bloquea los efectos inducidos por el shock electroconvulsivo a nivel antidepresivo y sobre marcadores para la neurogénesis; Anexo Experimental I). Por tanto, dado que la metanfetamina administrada durante la adolescencia tardía (PND 54-57) produce a largo plazo reducciones sobre los niveles neurogénicos en el hipocampo (Artículo VII y Anexo Experimental II), se evaluó si el shock electronvulsivo podría mejorar estas deficiencias. Los resultados obtenidos mostraron que el shock por electronconvulsión previene el impacto negativo inducido por la metanfetamina en la neurogénesis hipocampal, ya que bloqueó la reducción de la proliferación celular (células Ki-67 positivas) y la supervivencia neuronal temprana (células NeuroD positivas) 48 horas después de la última administración de metanfetamina (PND 97) (Anexo Experimental II). Estos resultados sugieren un efecto positivo de la aplicación repetida del shock electronvulsivo sobre la disminución de marcadores para la neurogénesis inducidos tras la administración de metanfetamina.

Además, el ECS también fue capaz de mejorar la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina sobre marcadores dopaminérgicos en el cuerpo estriado (Artículo VI y Anexo Experimental II). En particular, el análisis dopaminérgico realizado en el cuerpo estriado mostró que la aplicación repetida del shock electronvulsivo bloqueó la disminución de DA, DOPAC y el balance en el recambio de DA (Anexo Experimental II). Estos datos han demostrado un efecto protector por parte del shock electronvulsivo sobre el sistema de neurotransmisión dopaminérgico inducido tras la administración de metanfetamina. En algunos estudios realizados en animales de experimentación se ha observado un aumento de la sensibilidad a fármacos dopaminérgicos, aunque esta mejora en el sistema de neurotransmisión no se debe a un aumento de la síntesis, metabolismo o recambio del neurotransmisor (Modigh, 1976). La hipersensibilidad o mejora del sistema dopaminérgico tras la aplicación del shock electronvulsivo podría deberse principalmente a aumentos en el número de receptores dopaminérgicos D₁ en el estriado (Newman y Lerer, 1988). En cuanto al sistema serotoninérgico, no se han observado cambios a nivel de la 5-HT y sus metabolitos tras la administración de metanfetamina o la aplicación repetida del shock electronvulsivo (Anexo Experimental II). Por otro lado, algunos estudios han demostrado la ausencia de cambios duraderos en

la concentración de 5-HT y sus metabolitos tras el shock electroconvulsivo (Mokhtar et al., 1997), aunque se ha reportado un aumento de la sensibilidad de los autorreceptores presinápticos 5-HT_{1A} (importante en el tratamiento y la patología depresiva), al igual que una disminución de los receptores postsinápticos 5-HT_{2A} (elevados en pacientes con depresión), sugiriendo un importante mecanismo antidepressivo.

Estos resultados demuestran que el shock electroconvulsivo tras la administración de metanfetamina en la adolescencia tardía (PND 54-57) y la etapa adulta (PND 91-95), bloquea los efectos negativos a nivel neurogénico y dopaminérgico. Además, aunque la metanfetamina no indujo cambios sobre el desespero conductual (un solo aspecto del fenotipo prodepresivo), podrían existir déficits en otros aspectos relacionados con la depresión o el estado amotivacional como es la anhedonia o la ansiedad (véase p. ej., Artículo VI), sobre los cuales el ECS pudiera inducir mejoras. Como se ha comentado anteriormente (Artículo VI), la evaluación de la sintomatología prodepresiva requiere de diversas pruebas a nivel comportamental que otorguen información a otros niveles sobre más aspectos relacionados con el estado motivacional.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los principales hallazgos de la presente Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes conclusiones:

1. La administración de los diferentes psicoestimulantes (cocaína, MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) indujo efectos negativos diferenciales sobre la toxicidad cerebral dependiendo de la edad de desarrollo de la rata durante la exposición a la droga.
 - a. La administración repetida de cocaína durante la adolescencia temprana-media indujo cambios a nivel del hipocampo (desregulación de FADD, aumento de la fragmentación de PARP-1 y disminución de la proliferación celular) y de la corteza prefrontal (desregulación de los receptores cannabinoides), lo que sugiere que las primeras etapas de la adolescencia son más sensibles a los efectos negativos inducidos por esta droga.
 - b. La administración repetida de los diferentes derivados anfetamínicos (MDMA, metanfetamina y d-anfetamina) durante la adolescencia tardía y/o etapa adulta produjo daños en la plasticidad hipocampal (proliferación y supervivencia celular, contenido de BDNF), lo que sugiere que las etapas más posteriores durante el desarrollo son más sensibles a los efectos negativos inducidos por estas drogas.
2. La administración de cocaína o metanfetamina en el periodo de mayor vulnerabilidad durante el desarrollo indujo efectos negativos de carácter afectivo (p. ej., comorbilidad psiquiátrica) y cambios moleculares persistentes en la etapa adulta.
 - a. La exposición a la cocaína durante la adolescencia aumentó los efectos negativos de carácter emocional tras una reexposición aguda a la droga en ratas adultas, mientras que disminuyó la activación neuronal en el estriado dorsal, lo que sugiere una reorganización funcional de los circuitos cerebrales que podría ser responsable de las consecuencias negativas a largo plazo inducidas por la cocaína.

- b. La administración de metanfetamina durante la adolescencia tardía y/o etapa adulta produjo un incremento de los efectos negativos de carácter emocional (p. ej., incremento de la anhedonia) y del consumo voluntario de la droga, mientras que indujo cambios moleculares duraderos en la supervivencia celular del hipocampo, lo que sugiere un papel de la neurogénesis hipocampal en las consecuencias negativas inducidas por la metanfetamina.
3. La aplicación de un tratamiento como el shock electroconvulsivo en animales con una historia previa de metanfetamina durante la adolescencia tardía y que fueron reexpuestos en la etapa adulta a la droga, previno el impacto negativo inducido por la administración de la metanfetamina sobre la neurogénesis hipocampal, lo que sugiere un efecto beneficioso de este tratamiento mejorando los efectos neurotóxicos inducidos por la metanfetamina.

En general, la presente Tesis Doctoral ha mostrado diferentes periodos de vulnerabilidad adolescente a los efectos neurotóxicos inducidos por los psicoestimulantes que pueden conducir al desarrollo a largo plazo de comorbilidades psiquiátricas asociadas a desregulaciones en la neurogénesis hipocampal.

CONCLUSIONS

Els principals descobriments de la present Tesi Doctoral van donar lloc a les següents conclusions:

1. L'administració dels diferents psicoestimulants (cocaïna, MDMA, metamfetamina y d-amfetamina) van induir efectes negatius diferencials sobre la toxicitat cerebral depenent de l'edat de desenvolupament de la rata durant l'exposició a la droga.
 - a. L'administració repetida de cocaïna durant l'adolescència primerenca-mitjana va induir canvis a nivell de l'hipocamp (desregulació de FADD, augment de la fragmentació de PARP-1 i disminució de la proliferació cel·lular) i de l'escorça prefrontal (desregulació del receptors cannabinoides), la qual cosa suggereix que les primeres etapes de l'adolescència son més sensibles als efectes negatius induïts per aquesta droga.
 - b. L'administració repetida dels diferents derivats amfetamínics (MDMA, metamfetamina y d-amfetamina) durant l'adolescència tardana i/o etapa adulta va produir danys en la plasticitat hipocampal (proliferació i supervivència cel·lular, contingut de BDNF), la qual cosa suggereix que les etapes més posteriors durant el desenvolupament són més sensibles als efectes negatius induïts per aquestes drogues.
2. L'administració de cocaïna o metamfetamina en el període de major vulnerabilitat durant el desenvolupament va induir efectes negatius de caràcter afectiu (p. ex., comorbiditats psiquiàtriques) i canvis moleculars persistents en l'etapa adulta.
 - a. L'exposició a la cocaïna durant l'adolescència va augmentar els efectes negatius de caràcter emocional després d'una reexposició aguda a la droga en rates adultes, mentre que va disminuir l'activació neuronal en l'estriat dorsal, la qual cosa suggereix una reorganització funcional dels circuits cerebrals que podria ser responsable de les conseqüències negatives a llarg termini induïdes per la cocaïna.
 - b. L'administració de metamfetamina durant l'adolescència tardana i/o etapa adulta va produir un increment dels efectes negatius de caràcter

emocional (p. ex., increment de la anhedonia) i del consum voluntari de la droga, mentre que va induir canvis moleculars permanents en la supervivència cel·lular de l'hipocamp, la qual cosa suggereix un paper de la neurogènesi hipocampal en les conseqüències negatives induïdes per la metamfetamina

3. L'aplicació d'un tractament com el xoc electroconvulsiu en animals amb una història prèvia de metamfetamina durant l'adolescència tardana i que varen ser reexposat a la droga a l'etapa adulta, va prevenir l'impacte negatiu induït per l'administració de la metamfetamina en la neurogènesi hipocampal, la qual cosa suggereix un efecte beneficiós d'aquest tractament millorant els efectes neurotòxics induït per la metamfetamina.

En general, la present Tesi Doctoral ha mostrat diferents períodes de vulnerabilitat adolescent als efectes neurotòxics induïts pels psicoestimulants que poden conduir al desenvolupament a llarg termini de comorbiditats psiquiàtriques associades a desregulacions en la neurogènesi hipocampal.

CONCLUSIONS

The main findings of this Ph.D. work gave rise to the following conclusions:

1. The administration of different psychostimulants (cocaine, MDMA, methamphetamine and d-amphetamine) induced differential negative effects on brain toxicity depending on the rat's developmental age during drug exposure.
 - a. Repeated cocaine administration during early-mid adolescence impaired hippocampal (dysregulated FADD, increased PARP-1 cleavage and impaired cell proliferation) and prefrontal cortex plasticity (dysregulates cannabinoid receptors), suggesting that early stages of adolescence are more sensitive to the negative effects induced by this drug.
 - b. Repeated administration of different amphetamine-like compounds (MDMA, methamphetamine and d-amphetamine) during late adolescence and/or adulthood impaired hippocampal plasticity (cell proliferation and survival, BDNF content), suggesting that later stages during development are more sensitive to the negative effects induced by these drugs.
2. The administration of cocaine or methamphetamine at the vulnerable age period during development induced negative affect (i.e., psychiatry comorbidity) and persistent molecular changes in adulthood.
 - a. Adolescent cocaine exposure enhanced negative affect following drug re-exposure in adult rats, while it decreased neuronal activation in dorsal striatum, suggesting a functional reorganization of brain circuits might be responsible for the long-term negative consequences induced by cocaine.
 - b. Methamphetamine administration during late adolescence and/or adulthood induced negative affect (i.e., increased anhedonia) and voluntary drug intake, while induced enduring molecular changes on hippocampal cell survival, suggesting a role for hippocampal neurogenesis in the negative consequences induced by methamphetamine.

3. The concomitant application of a repeated electroconvulsive shock treatment prevented the negative impact induced by methamphetamine administration on hippocampal neurogenesis, suggesting a beneficial effect of this treatment ameliorating the molecular neurotoxic effects of methamphetamine.

Overall, this Doctoral Thesis has shown differential periods of adolescent vulnerability to the neurotoxic effects induced by psychostimulants that can lead to the long-term development of psychiatric comorbidities associated with dysregulations of hippocampal neurogenesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrous DN, Koehl M, M.L. M (2005) Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Ádori C, Andó RD, Ferrington L, Szekeres M, Vas S, Kelly PAT, Hunyady L, Bagdy G (2010) Elevated BDNF protein level in cortex but not in hippocampus of MDMA-treated Dark Agouti rats: A potential link to the long-term recovery of serotonergic axons. *Neurosci Lett* 478:56-60.
- Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A, Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang WJ, Peter ME (2005) Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKI α regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19:321-332.
- Alles GA, Prinzmetal M (1933) The comparative physiological actions of dl- β -phenylisopropylamines II. Bronchial effect. *J Pharmacol Exp Ther* 48:161-174.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Álvaro-Bartolomé M, García-Sevilla JA (2013) Dysregulation of cannabinoid CB1receptor and associated signaling networks in brains of cocaine addicts and cocaine-treated rodents. *Neuroscience* 247:294-308.
- Álvaro-Bartolomé M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, García-Sevilla JA (2011) Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience* 196:1-15.
- Amiaz R, Levy D, Vainiger D, Grunhaus L, Zangen A (2009) Repeated high-frequency transcranial magnetic stimulation over the dorsolateral prefrontal cortex reduces cigarette craving and consumption. *Addiction* 104:653-660.
- Amrein I, Isler K, Lipp HP (2011) Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: Influence of chronological age and life history stage. *Eur J Neurosci* 34:978-987.
- Anón (1937) Council on pharmacy and chemistry. *J Am Med Assoc* 109:2141.
- Antelman SM, Eichler AJ, Black CA, Kocan D (1980) Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science* 207:329-331.
- Aracil-Fernández A, Trigo JM, García-Gutiérrez MS, Ortega-Álvaro A, Ternianov A, Navarro D, Robledo P, Berbel P, Maldonado R, Manzanares J (2012) Decreased cocaine motor sensitization and self-administration in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. *Neuropsychopharmacology* 37:1749-1763.
- Armstrong BD, Noguchi KK (2004) The neurotoxic effects of 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: An in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology* 25:905-914.
- Armstrong V, Nazarian A, Zavala AR, Krall CM, Crawford CA, McDougall SA (2001) Effects of acute and repeated methamphetamine treatment on the ultrasonic vocalizations of postnatal rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70:273-278.
- Arnett J (1992) Reckless Behavior in Adolescence: A Developmental Perspective. *Dev Rev* 12:339-373.
- Arnett J (1994) Sensation seeking: A new conceptualization and a new scale. *Pers Individ Dif* 16:289-296.
- Arnett J (1995) Divergent realities: The emotional lives of mothers, fathers and adolescents.
- Asociación Americana de Psiquiatría (2013) Manual Diagnóstico y Estadístico de los Transtornos Mentales. 5ª edición. Washington, DC: APA.
- Badiani A, Browman KE, Robinson TE (1995) Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. *Brain Res* 674:291-298.
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1998) Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. *J Neurosci* 18:10579-10593.
- Badiani A, Oates MM, Day HEW, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1999) Environmental modulation of amphetamine-induced c-fos expression in D1 versus D2 striatal neurons. *Behav Brain Res* 103:203-209.
- Bagchi SP, Reilly MA (1983) Intraneuronal dopaminergic action of cocaine and some of its metabolites and analogs. *Neuropharmacology* 22:1289-1295.
- Banerjee PS, Aston J, Khundakar AA, Zetterström TSC (2009) Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene *Arc* in the juvenile and adult brain. *Eur J Neurosci* 29:465-476.
- Barnabé-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149-5160.
- Barr AM, Markou A (2005) Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:675-706.

- Barr CS, Schwandt ML, Newman TK, Higley JD (2004) The use of adolescent nonhuman primates to model human alcohol intake: Neurobiological, genetic, and psychological variables. *Ann N Y Acad Sci* 1021:221-233.
- Barr JL, Bray B, Forster GL (2018) The Hippocampus as a Neural Link between Negative Affect and Vulnerability for Psychostimulant Relapse. *Hippocampus - Plast Funct.*
- Barr JL, Renner KJ, Forster GL (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* 59:395-405.
- Baumeister R, F. Heatherton T, Tice D (1994) *Losing Control: How and Why People Fail at Self-Regulation.*
- Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ (1992) Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 12:2165-2176.
- Belluzzi J, Lee A, Oliff H, Leslie F (2004) Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 174:389-395.
- Ben-Shachar D, Belmaker RH, Grisaru N, Klein E (1997) Transcranial magnetic stimulation induces alterations in brain monoamines. *J Neural Transm* 104:191-197.
- Ben-Shachar D, Gazawi H, Riboyad-Levin J, Klein E (1999) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation alters beta-adrenergic and 5-HT₂ receptor characteristics in rat brain. *Brain Res* 816:78-83.
- Berger U V., Gu XF, Azmitia EC (1992) The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur J Pharmacol* 215:153-160.
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, Newman AH, Javitch JA, Weinstein H, Gether U, Loland CJ (2008) The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* 11:780-789.
- Biezonski DK, Meyer JS (2011) The Nature of 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-Induced Serotonergic Dysfunction: Evidence for and Against the Neurodegeneration Hypothesis. *Curr Neuropharmacol* 9:84-90.

- Black YD, Green-Jordan K, Eichenbaum HB, Kantak KM (2004) Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behav Brain Res* 151:225-238.
- Blanco E, Pavón FJ, Palomino A, Luque-Rojas MJ, Serrano A, Rivera P, Bilbao A, Alen F, Vida M, Suárez J, De Fonseca FR (2015) Cocaine-induced behavioral sensitization is associated with changes in the expression of endocannabinoid and glutamatergic signaling systems in the mouse prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:1-10.
- Bolaños CA, Nestler EJ (2004) Neurotrophic Mechanisms in Drug Addiction. *NeuroMolecular Med* 5:069-084.
- Bolwig TG (2011) How does electroconvulsive therapy work? Theories on its mechanism. *Can J Psychiatry* 56:13-18.
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2001) Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol* 134:1263-1270.
- Braet C, Vlierberghe L Van, Vandevivere E, Theuwis L, Bosmans G (2013) Depression in early, middle and late adolescence: Differential evidence for the cognitive diathesis-stress model. *Clin Psychol Psychother* 20:369-383.
- Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM, Kennedy DN, Makris N, Berke JD, Goodman JM, Kantor HL, Gastfriend DR, Riorden JP, Mathew RT, Rosen BR, Hyman SE (1997) Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron* 19:591-611.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Brozka H, Pistikova A, Radostova D, Vales K, Svoboda J, Grzyb AN, Stuchlik A (2017) Adult neurogenesis reduction by a cytostatic treatment improves spatial reversal learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 141:93-100.
- Brunell SC, Spear LP (2006) Effects of acute ethanol or amphetamine administration on the acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186:579-586.
- Burke AR, Miczek KA (2014) Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: Role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)* 231:1557-1580.

- Büttner A (2011) Review: The neuropathology of drug abuse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:118-134.
- Capela JP, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F (2007) Ecstasy induces apoptosis via 5-HT_{2A}-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology* 28:868-875.
- Carlyle WC, McClain JB, Tzafiriri AR, Bailey L, Brett G, Markham PM, Stanley JRL, Edelman ER, Sciences CB, Technologies E, Park LT (2015) HHS Public Access. *162:561-567*.
- Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP (2004) Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 25:273-279.
- Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, Carvalho F, De Lourdes Bastos M (2012) Toxicity of amphetamines: An update. *Arch Toxicol* 86:1167-1231.
- Cass DK, Flores-Barrera E, Thomases DR, Vital WF, Caballero A, Tseng KY (2014) CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex. *Mol Psychiatry* 19:536-543.
- Castilla-Ortega E, Blanco E, Serrano A, Ladrón De Guevara-Miranda D, Pedraz M, Estivill-Torrús G, Pavón FJ, Rodríguez De Fonseca F, Santín LJ (2016) Pharmacological reduction of adult hippocampal neurogenesis modifies functional brain circuits in mice exposed to a cocaine conditioned place preference paradigm. *Addict Biol* 21:575-588.
- Catlow BJ, Badanich KA, Sponaugle AE, Rowe AR, Song S, Rafalovich I, Sava V, Kirstein CL, Sanchez-Ramos J (2010) Effects of MDMA («ecstasy») during adolescence on place conditioning and hippocampal neurogenesis. *Eur J Pharmacol* 628:96-103.
- Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260-265.
- Cho KO, Kim SK, Rhee GS, Kwack SJ, Cho DH, Sung KW, Kim SY (2007) Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine treatment suppresses cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Eur J Pharmacol* 566:120-123.
- Christiansen SH, Woldbye DPD (2010) Regulation of the galanin system by repeated electroconvulsive seizures in mice. *J Neurosci Res* 88:3635-3643.
- Ciraulo DA, Knapp C, Rotrosen J, Sarid-Segal O, Ciraulo AM, LoCastro J, Greenblatt

- DJ, Leiderman D (2005a) Nefazodone treatment of cocaine dependence with comorbid depressive symptoms. *Addiction* 100:23-31.
- Ciraulo DA, Sarid-Segal O, Knapp CM, Ciraulo AM, Locastro J, Bloch DA, Montgomery MA, Leiderman DB, Elkashef A (2005b) Efficacy screening trials of paroxetine, pentoxifylline, riluzole, pramipexole and venlafaxine in cocaine dependence. *Addiction* 100:12-22.
- Colado MI, Camarero J, Mehan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR (2001) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134:1711-1723.
- Counotte DS, Smit AB, Pattij T, Spijker S (2011) Development of the motivational system during adolescence, and its sensitivity to disruption by nicotine. *Dev Cogn Neurosci* 1:430-443.
- Cruickshank CC, Dyer KR (2009) A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 104:1085-1099.
- Cryan JF, Hoyer D, Markou A (2003) Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biol Psychiatry* 54:49-58.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR (2008) Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res Rev* 58:192-208.
- D'Sa C, Duman RS (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 4:183-194.
- Dabe EC, Majdak P, Bhattacharya TK, Miller DS, Rhodes JS (2013) Chronic d-amphetamine administered from childhood to adulthood dose-dependently increases the survival of new neurons in the hippocampus of male C57BL/6J mice. *Neuroscience* 231:125-135.
- Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH (2001) Methamphetamine neurotoxicity: Necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Rev* 36:1-22.
- Davis L, Uezato A, Newell JM, Frazier E (2008) Major depression and comorbid substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry* 21:14-18.
- Dawes M a, Antelman SM, Vanyukov MM, Giancola P, Tarter RE, Susman EJ,

- Mezzich a, Clark DB (2000) Developmental sources of variation in liability to adolescent substance use disorders. *Drug Alcohol Depend* 61:3-14.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003) Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.
- DeCarolis NA, Eisch AJ (2010) Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: A critical evaluation. *Neuropharmacology* 58:884-893.
- Degoulet M, Rouillon C, Rostain JC, David HN, Abiraini JH (2008) Modulation by the dorsal, but not the ventral, hippocampus of the expression of behavioural sensitization to amphetamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:497-508.
- 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.
- Dingell J V., Bass AD (1969) Inhibition of the hepatic metabolism of amphetamine by desipramine. *Biochem Pharmacol* 18:1535-1538.
- Domínguez-Escribà L, Hernández-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ (2006) Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 24:586-594.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2010) Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn* 72:114-123.
- Doyle SE, Feng H, Garber G, Menaker M, Lynch WJ (2015) Effects of circadian disruption on methamphetamine consumption in methamphetamine-exposed rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232:2169-2179.
- Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Conley RR (2005) Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. *Biol Psychiatry* 58:315-324.
- Eichhammer P, Johann M, Kharraz A, Binder H, Pittrow D, Wodarz N, Hajak G (2003) High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation decreases cigarette smoking. *J Clin Psychiatry* 64:951-953.
- Eisch AJ, Harburg GC (2006) Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16:271-286.
- Elkis H, Friedman L, Wise A, Meltzer HY (1995) Meta-analyses of studies of

- ventricular enlargement and cortical sulcal prominence in mood disorders. Comparisons with controls or patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52:735-746.
- Elliott BM, Faraday MM, Phillips JM, Grunberg NE (2004) Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:21-28.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2009) Tests of Causal Links Between Alcohol Abuse or Dependence and Major Depression. *Arch Gen Psychiatry* 66:260-266.
- Filip M, Frankowska M, Jastrzębska J, Wydra K, Przegaliński E (2013) Preclinical studies on comorbidity between depression and psychostimulant addiction. *Pharmacol Reports* 65:1529-1534.
- Fleckenstein AE, Gibb JW, Hanson GR (2000) Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: Pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 406:1-13.
- Fleischmann A, Prolov K, Abarbanel J, Belmaker RH (1995) The effect of transcranial magnetic stimulation of rat brain on behavioral models of depression. *Brain Res* 699:130-132.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Gatley SJ, Logan J (2001) [11]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nucl Med Biol* 28:561-572.
- Freo U (1996) Cerebral metabolic effects of serotonin drugs and neurotoxins. *Life Sci* 59:877-891.
- Freud S (1984) Uber Coca: Freud's Cocaine Discoveries. *J Subst Abuse Treat* 1:205-217.
- Galineau L, Belzung C, Kudas E, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S (2005) Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) exposure induces long-term alterations in the dopaminergic and serotonergic functions in the rat. *Dev Brain Res* 154:165-176.
- Galluzzi L et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25:486-541.
- García-Cabrerizo R, Bis-Humbert C, García-Fuster MJ (2018) *Methamphetamine administration impedes the expected antidepressant-like effect induced by repeated*

- electroconvulsive shock in adult rats*. Presentado en el congreso anual de la Society for Neuroscience, San Diego, CA, EE.UU.
- García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ (2018) *Pharmacological inhibition of cell proliferation prevents the antidepressant and increased neurogenic effects induced by repeated electroconvulsive shock treatment in rats*. Presentado en el congreso anual de la Society for Neuroscience, San Diego, CA, EE.UU.
- García-Fuster MJ, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2009) Effect of cocaine on Fas-associated protein with death domain in the rat brain: Individual differences in a model of differential vulnerability to drug abuse. *Neuropsychopharmacology* 34:1123-1134.
- García-Fuster MJ, Díez-Alarcía R, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2014) FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: Basal contents and effects of psychotropic treatments. *Neuroscience* 277:541-551.
- García-Fuster MJ, Flagel 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.
- García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2015) Monoamine receptor agonists, acting preferentially at presynaptic autoreceptors and heteroreceptors, downregulate the cell fate adaptor FADD in rat brain cortex. *Neuropharmacology* 89:204-214.
- García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2016) Effects of anti-depressant treatments on FADD and p-FADD protein in rat brain cortex: enhanced anti-apoptotic p-FADD/FADD ratio after chronic desipramine and fluoxetine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 233:2955-2971.
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA (2007) Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: Regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology* 32:399-411.
- García-Fuster MJ, Parsegian A, Watson SJ, Akil H, Flagel SB (2017) Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis selectively in adult bred low-responder rats. *Psychopharmacology (Berl)*.
- García-Fuster MJ, Perez JA, Clinton SM, Watson SJ, Akil H (2010) Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to

- drug abuse. *Eur J Neurosci* 31:79-89.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2008) Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase I α , G α i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55:886-899.
- García-Sevilla JA, Ventayol P, Busquets X, La Harpe R, Walzer C, Guimón J (1997) Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *Neuroreport* 8:1561-1565.
- Gawin FH, Kleber HD (1986) Psychiatric Diagnosis in Cocaine Abusers Clinical Observations Abstinence Cocaine. *Arch Gen Psychiatry* 43:107-113.
- González S, Fernández-Ruiz J, Sparpaglione V, Parolaro D, Ramos JA (2002) Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels. *Drug Alcohol Depend* 66:77-84.
- Gozzi A, Tessari M, Dacome L, Agosta F, Lepore S, Lanzoni A, Cristofori P, Pich EM, Corsi M, Bifone A (2011) Neuroimaging evidence of altered fronto-cortical and striatal function after prolonged cocaine self-administration in the rat. *Neuropsychopharmacology* 36:2431-2440.
- Grace CE, Schaefer TL, Herring NR, Skelton MR, McCrea AE, Vorhees C V, Williams MT (2008) (+)-Methamphetamine increases corticosterone in plasma and BDNF in brain more than forced swim or isolation in neonatal rats. *Synapse* 62:110-121.
- Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10:1029-1037.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci* 87:6912-6916.
- Green AR (2003) The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «Ecstasy»). *Pharmacol Rev* 55:463-508.
- Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F, Sutton RL (2008) Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience* 154:530-540.

- Grinspoon L, Bakalar JB (1981) Coca and cocaine as medicines: An historical review. *J Ethnopharmacol* 3:149-159.
- Grover S, Mattoo SK, Gupta N (2005) Theories on mechanism of action of electroconvulsive therapy. *Ger J Psychiatry* 8:70-84.
- Grunhaus L, Dannon PN, Schreiber S, Dolberg OH, Amiaz R, Ziv R, Lefkifker E (2000) Repetitive transcranial magnetic stimulation is as effective as electroconvulsive therapy in the treatment of nondelusional major depressive disorder: An open study. *Biol Psychiatry* 47:314-324.
- Haerian BS (2013) BDNF rs6265 polymorphism and drug addiction: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics* 14:2055-2065.
- Hajheidari S, Miladi-Gorji H, Bigdeli I (2015) Effect of the environmental enrichment on the severity of psychological dependence and voluntary methamphetamine consumption in methamphetamine withdrawn rats. *Neurosci Lett* 584:151-155.
- Hall CS (1934) Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *J Comp Psychol* 17:89-108.
- Hall D, Dhillia A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M (2003) Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 73:370-376.
- Harrison AA, Liem YTB, Markou A (2001) Fluoxetine combined with a serotonin-1A receptor antagonist reversed reward deficits observed during nicotine and amphetamine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 25:55-71.
- Hatzidimitriou G, McCann UD, Ricaurte GA (1999) Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *J Neurosci* 19:5096-5107.
- Hausmann a, Weis C, Marksteiner J, Hinterhuber H, Humpel C (2000) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation enhances c-fos in the parietal cortex and hippocampus. *Mol Brain Res* 76:355-362.
- Henry SI, Jeffry RS (1990) *Cocaína. Nuevos enfoques en investigación y tratamiento*. 1ª edición. Barcelona.
- Hernández-Hernández E, Miralles A, Esteban S, García-Fuster MJ (2018) Repeated treatment with the α 2-adrenoceptor agonist UK-14304 improves cognitive performance in middle-age rats: Role of hippocampal Fas-associated death domain. *J Psychopharmacol* 32:248-255.

- Hernández-Rabaza V, Domínguez-Escribà L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ (2006) Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine («ecstasy») impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* 51:967-973.
- Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ (2008) The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem* 90:553-559.
- Hernandez-Rabaza V, Navarro-Mora G, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Marin MP, Garcia-Verdugo JM, Renau-Piqueras J, Canales JJ (2010) Neurotoxicity and persistent cognitive deficits induced by combined MDMA and alcohol exposure in adolescent rats. *Addict Biol* 15:413-423.
- Herrero MJ, Domingo-Salvany A, Torrens M, Brugal MT, De Hoz LDLF, Gómez RB, Anta GB, Portela MJB, Lacasa D, Fernández F, González-Saiz F, Royuela L, Vallejo F, Pulido J, Sánchez F, Silva TC (2008) Psychiatric comorbidity in young cocaine users: Induced versus independent disorders. *Addiction* 103:284-293.
- Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (1999) A single neonatal dose of methamphetamine suppresses dentate granule cell proliferation in adult gerbils which is restored to control values by acute doses of haloperidol. *J Neural Transm* 106:549-558.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598.
- Iijima M, Koike H, Chaki S (2013) Effect of an mGlu2/3 receptor antagonist on depressive behavior induced by withdrawal from chronic treatment with methamphetamine. *Behav Brain Res* 246:24-28.
- Jacobs B, van Praag H, Gage F (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry a no. *Mol Psychiatry* May:262-269.
- Ji R-R, Schlaepfer TE, Aizenman CD, Epstein CM, Qiu D, Huang JC, Rupp F (1998) Repetitive transcranial magnetic stimulation activates specific regions in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 95:15635-15640.
- Joca L, Zuloaga DG, Raber J, Siegel JA (2014) Long-term effects of early adolescent methamphetamine exposure on depression-like behavior and the hypothalamic vasopressin system in mice. *Dev Neurosci* 36:108-118.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG (1998) Mechanisms of

- amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* 18:1979-1986.
- Justice AJH, De Wit H (2000) Acute Effects of d -Amphetamine During the Early and Late Follicular Phases of the Menstrual Cycle in Women. *Pharmacol Biochem Behav* 66:509-515.
- Kalechstein AD, Newton TF, Leavengood AH (2002) Apathy syndrome in cocaine dependence. *Psychiatry Res* 109:97-100.
- Katoh-Semba R, Asano T, Ueda H, Morishita R, Takeuchi IK, Inaguma Y, Kato K (2002) Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J* 16:1328-1330.
- Keck ME, Welt T, Post A, Müller MB, Toschi N, Wigger A, Landgraf R, Holsboer F, Engelmann M (2001) Neuroendocrine and behavioral effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology* 24:337-349.
- 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.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kinney GG, Taber MT, Gribkoff VK (2000) The augmentation hypothesis for improvement of antidepressant therapy: is pindolol a suitable candidate for testing the ability of 5HT1A receptor antagonists to enhance SSRI efficacy and onset latency? *Mol Neurobiol* 21:137-152.
- Kleven MS, Woolverton WL, Seiden LS (1988) Lack of long-term monoamine depletions following repeated or continuous exposure to cocaine. *Brain Res Bull* 21:233-237.
- Kluger BM, Triggs WJ (2007) Use of transcranial magnetic stimulation to influence behavior. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:491-497.
- Kokotos ET, Azmitia EC (1994) Mdma (Ecstasy) inhibition of mao type a and type b: Comparisons with fenfluramine and fluoxetine (prozac). *Neuropsychopharmacology* 10:231-238.
- Kole MHP, Fuchs E, Ziemann U, Paulus W, Ebert U (1999) Changes in 5-HT(1A) and NMDA binding sites by a single rapid transcranial magnetic stimulation procedure in rats. *Brain Res* 826:309-312.

- Kongsakon R, Papadopoulos KI, Saguansiritham R (2005) Mirtazapine in amphetamine detoxification: A placebo-controlled pilot study. *Int Clin Psychopharmacol* 20:253-256.
- Koob GF (2014) Frameworks of Alcohol Addiction: Alcohol Addiction as a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Neurobiol Alcohol Depend* 4:3-28.
- Koob GF, Le Moal M (2006) What is Addiction. 1^a edición. Elsevier.
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217-238.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (2016) Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin : Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science* 353:294-298.
- Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev* 60:379-407.
- Kuroda KO, Ornthanalai VG, Kato T, Murphy NP (2010) FosB null mutant mice show enhanced methamphetamine neurotoxicity: Potential involvement of FosB in intracellular feedback signaling and astroglial function. *Neuropsychopharmacology* 35:641-655.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Langleben DD, Ruparel K, Elman I, Busch-Winokur S, Pratiwadi R, Loughhead J, O'Brien CP, Childress AR (2008) Acute effect of methadone maintenance dose on brain fMRI response to heroin-related cues. *Am J Psychiatry* 165:390-394.
- Larson EB, Roth ME, Anker JJ, Carroll ME (2005) Effect of short- vs. long-term estrogen on reinstatement of cocaine-seeking behavior in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82:98-108.
- Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27:19-31.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP (2000) Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* 15:99-108.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is

- required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.
- Lee JE (1997) NeuroD and neurogenesis. *Dev Neurosci* 19:27-32.
- Leventhal AM, Kahler CW, Ray LA, Stone K, Young D, Chelminski I, Zimmerman M (2008) Anhedonia and amotivation in psychiatric outpatients with fully remitted stimulant use disorder. *Am J Addict* 17:218-223.
- Li QH, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y, Watanabe Y (2004) Unique Expression Patterns of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors in the Rat Brain during Postnatal Development: Western Blot and Immunohistochemical Analyses. *J Comp Neurol* 469:128-140.
- Lillethorup TP, Iversen P, Fountain J, Wegener G, Doudet DJ, Landau AM (2015) Electroconvulsive shocks decrease α 2-adrenoceptor binding in the Flinders rat model of depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:404-412.
- Little PJ, Kuhn CM, Wilson WA, Swartzwelder HS (1996) Differential effects of ethanol in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1346-1351.
- Loxton D, Canales JJ (2017) Long-term cognitive, emotional and neurogenic alterations induced by alcohol and methamphetamine exposure in adolescent rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 74:1-8.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A (2000) Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47:1043-1049.
- Malberg J, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Malberg JE (2004) Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci* 29:196-205.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29:225-232.
- Mamounas L a, Blue ME, Siuciak J a, Altar C a (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* 15:7929-7939.
- 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.
- Mandyam CD, Wee S, Crawford EF, Eisch AJ, Richardson HN, Koob GF (2008)

- Varied Access to Intravenous Methamphetamine Self-Administration Differentially Alters Adult Hippocampal Neurogenesis. *Biol Psychiatry* 64:958-965.
- Markou A (1998) Neurobiological Similarities in Depression and Drug Dependence: A Self-Medication Hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18:135-174.
- Markou A, Kenny PJ (2002) Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories. *Neurotox Res* 4:297-313.
- Markou A, Koob GF (1991) Postcocaine anhedonia. An animal model of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 4:17-26.
- Markou A, Koob GF (1992) Construct validity of a self-stimulation threshold paradigm: Effects of reward and performance manipulations. *Physiol Behav* 51:111-119.
- Martínez-Turrillas R, Moyano S, Del Río J, Frechilla D (2006) Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «ecstasy») on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 402:126-130.
- Martinez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Frankel WG, Cooper T, Kleber HD, Fischman MW, Laruelle M (2004) Cocaine and dependence and D2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: Relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:1190-1202.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: A dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589-594.
- McCann U, Szabo Z, Scheffel U, Dannals R, Ricaurte G (1998) Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA (“Ecstasy”) on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* 352:1433-1437.
- McCann UD, Szabo Z, Seckin E, Rosenblatt P, Mathews WB, Ravert HT, Dannals RF, Ricaurte GA (2005) Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. *Neuropsychopharmacology* 30:1741-1750.
- McGrath JC, Lilley E (2015) Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): New requirements for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 172:3189-3193.
- Menargues A, Obach R, Garcia-Sevilla JA (1990) Modulation by antidepressant drugs

- of CNS postsynaptic α 2-adrenoceptors mediating mydriasis in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341:101-107.
- Meredith GE, Callen S, Scheuer DA (2002) Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res* 949:218-227.
- Modigh K (1976) Long-term effects of electroconvulsive shock therapy on synthesis, turnover and uptake of brain monoamines. *Psychopharmacology (Berl)* 49:179-185.
- Mokhtar a S, Morgan CJ, Bradley DM, Badawy a a (1997) No early effects of electroconvulsive therapy on tryptophan metabolism and disposition in endogenous depression. *Biol Psychiatry* 42:201-205.
- Moreira FA, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13:196-212.
- Moszczynska A, Callan SP (2017) Minireviews Molecular , Behavioral , and Physiological Consequences of Methamphetamine Neurotoxicity : Implications for Treatment. 2:474-488.
- Müller MB, Toschi N, Kresse a E, Post A, Keck ME, Muller MB, Toschi N, Kresse a E, Post A, Keck ME (2000) Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23:205-215.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction (vol 2, pg 119, 2001). *Nat Rev Neurosci* 2:215.
- Nestler EJ (2004a) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47:24-32.
- Nestler EJ (2004b) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 25:210-218.
- Nestler EJ (2008) Transcriptional mechanisms of addiction: Role of Δ FosB. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363:3245-3255.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993) Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11:995-1006.
- Newman ME, Lerer B (1988) Chronic electroconvulsive shock and desimipramine reduce the degree of inhibition by 5-HT and carbachol of forskolin-stimulated

- adenylate cyclase in rat hippocampal membranes. *Eur J Pharmacol* 148:257-260.
- Newton TF, De La Garza R, Fong T, Chiang N, Holmes TH, Bloch DA, Anderson A, Elkashef A (2005) A comprehensive assessment of the safety of intravenous methamphetamine administration during treatment with selegiline. *Pharmacol Biochem Behav* 82:704-711.
- Nokia MS, Anderson ML, Shors TJ (2012) Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain. *Eur J Neurosci* 36:3521-3530.
- Noonan MA, Choi KH, Self DW, Eisch AJ (2008) Withdrawal from Cocaine Self-Administration Normalizes Deficits in Proliferation and Enhances Maturity of Adult-Generated Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 28:2516-2526.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (2018) Informe Mundial sobre las Drogas. *United Nations publication, sales No. E.18.XI.9.Viena*.
- Pagnin D, de Queiroz V, Pini S, Cassano GB (2004) Efficacy of ECT in depression: a meta-analytic review. *J ECT* 20:13-20.
- Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu G-Q, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci* 100:9572-9577.
- Park SM, Schickel R, Peter ME (2005) Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* 17:610-616.
- Parsons LH, Smith AD, Justice JB (1991) Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 9:60-65.
- Paterson NE, Markou A (2007) Animal models and treatments for addiction and depression co-morbidity. *Neurotox Res* 11:1-32.
- Paterson NE, Myers C, Markou A (2000) Effects of repeated withdrawal from continuous amphetamine administration on brain reward function in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 152:440-446.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain*. Amsterdam: Elsevier.
- Perrine SA, Ghoddoussi F, Michaels MS, Hyde EM, Kuhn DM, Galloway MP (2010) MDMA administration decreases serotonin but not N-acetylaspartate in the rat brain. *Neurotoxicology* 31:654-661.

- Petrides G, Fink M, Husain MM, Knapp RG, Rush AJ, Mueller M, Rummans TA, O'Connor KM, Rasmussen KG, Bernstein HJ, Biggs M, Bailine SH, Kellner CH (2001) ECT remission rates in psychotic versus nonpsychotic depressed patients: A report from CORE. *J ECT* 17:244-253.
- Pierce RC, Bari AA (2001) The role of neurotrophic factors in psychostimulant-induced behavioral and neuronal plasticity. *Rev Neurosci* 12:95-110.
- Pinna M, Manchia M, Oppo R, Scano F, Pillai G, Loche AP, Salis P, Minnai GP (2018) Clinical and biological predictors of response to electroconvulsive therapy (ECT): a review. *Neurosci Lett* 669:32-42.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379-391.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327—336.
- Ramos-Miguel A, Álvaro-Bartolomé M, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA (2012) Role of Multifunctional FADD (Fas-Associated Death Domain) Adaptor in Drug Addiction. *Addict – From Pathophysiol to Treat*:201-226.
- Ramos-Miguel A, Esteban S, García-Sevilla JA (2010) The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: Role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:49-64.
- Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA (2009) Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: Relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways. *Neuroscience* 161:23-38.
- Ramos-Miguel A, García-Sevilla JA, Barr AM, Bayer TA, Falkai P, Leurgans SE, Schneider JA, Bennett DA, Honer WG, García-Fuster MJ (2017) Decreased cortical FADD protein is associated with clinical dementia and cognitive decline in an elderly community sample. *Mol Neurodegener* 12:1-14.
- Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA (2011) Correlation of rat cortical Fas-associated death domain (FADD) protein phosphorylation with the severity of spontaneous morphine abstinence syndrome: Role of α 2-adrenoceptors and extracellular signal-regulated kinases. *J Psychopharmacol* 25:1691-1702.

- Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2016) Rang y Dale Farmacología, 8ª edición. Elsevier.
- Raybuck JD, Lattal KM (2014) Differential effects of dorsal hippocampal inactivation on expression of recent and remote drug and fear memory. *Neurosci Lett* 569:1-5.
- Recinto P, Samant ARH, Chavez G, Kim A, Yuan CJ, Soleiman M, Grant Y, Edwards S, Wee S, Koob GF, George O, Mandyam CD (2012) Levels of neural progenitors in the hippocampus predict memory impairment and relapse to drug seeking as a function of excessive methamphetamine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 37:1275-1287.
- Ren W, Luan X, Zhang J, Guttea P, Cai Y, Zhao J, Gu Y, Wu C, Su H, Tao J, Xie Y, Lv D, Feng L, He J (2017) Brain-derived neurotrophic factor levels and depression during methamphetamine withdrawal. *J Affect Disord* 221:165-171.
- Reneman L, Endert E, de Bruin K, Lavalaye J, Feenstra MG, de Wolff F a, Booij J (2002) The acute and chronic effects of MDMA («ecstasy») on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* 26:387-396.
- Renoir T, Pang TY, Lanfumey L (2012) Drug withdrawal-induced depression: Serotonergic and plasticity changes in animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 36:696-726.
- Ricaurte GA, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1988) Toxic effects of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res* 446:165-168.
- Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR (1984) Nerve terminal degeneration after a single injection of D-amphetamine in iprindole-treated rats: relation to selective long-lasting dopamine depletion. *Brain Res* 291:378-382.
- Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res* 235:93-103.
- Ridding MC, Rothwell JC (2007) Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nat Rev Neurosci* 8:559-567.
- Ríos B, Vicente N (2001) Mecanismo de acción de la terapia electroconvulsiva en la depresión. *Actas Esp Psiquiatr* 29:199-207.
- Rivera PD, Raghavan RK, Yun S, Latchney SE, Mcgovern M, Garc EF, Birnbaum SG, Eisch AJ (2015) Retrieval of Morphine-Associated Context Induces cFos in Dentate Gyrus Neurons. *Hippocampus* 414:409-414.

- Robins LN, Helzer JE, Weissman MM, Orvaschel H, Gruenberg E, Burke JD, Regier DA (1984) Lifetime Prevalence of Specific Psychiatric Disorders in Three Sites. *Arch Gen Psychiatry* 41:949-958.
- Rogers JL, See RE (2007) Selective inactivation of the ventral hippocampus attenuates cue-induced and cocaine-primed reinstatement of drug-seeking in rats. *Neurobiol Learn Mem* 87:688-692.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24:1850-1856.
- Rossini PM, Rossi S (2007) Transcranial magnetic stimulation: Diagnostic, therapeutic, and research potential. *Neurology* 68:484-488.
- Rothman RB, Baumann MH (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479:23-40.
- Rud MA, Do TN, Siegel JA (2016) Effects of early adolescent methamphetamine exposure on anxiety-like behavior and corticosterone levels in mice. *Neurosci Lett* 633:257-261.
- Rudnick G, Wall SC (1992) The molecular mechanism of «ecstasy» [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1817-1821.
- Ryan LJ, Martone ME, Linder JC, Groves PM (1988) Cocaine, in contrast to D-amphetamine, does not cause axonal terminal degeneration in neostriatum and agranular frontal cortex of Long-Evans rats. *Life Sci* 43:1403-1409.
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castrén E (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 23:349-357.
- Sanchez V, Zeini M, Camarero J, O'Shea E, Bosca L, Green AR, Colado MI (2003) The nNOS inhibitor, AR-R17477AR, prevents the loss of NF68 immunoreactivity induced by methamphetamine in the mouse striatum. *J Neurochem* 85:515-524.
- Santarelli L, Saxe M, Gross CT, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME (2000)

- Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* 164:1236-1242.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192:348-356.
- Scheffel U, Lever JR, Stathis M, Ricaurte GA (1992) Repeated administration of MDMA causes transient down-regulation of serotonin 5-HT₂ receptors. *Neuropharmacology* 31:881-893.
- Schmidt CJ, Wu L, Lovenberg W (1986) Methylenedioxymethamphetamine: A potentially neurotoxic amphetamine analogue. *Eur J Pharmacol* 124:175-178.
- Schramm-Sapota NL, Cha YM, Chaudhry S, Wilson WA, Swartzwelder HS, Kuhn CM (2007) Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 191:867-877.
- Schrold J (1972) Behavioural Effects of d-Amphetamine in Young Chicks Treated with p-C1-Phenylalanine. *Psychopharmacology (Berl)* 23:115-124.
- Schutová B, Hrubá L, Pometlová M, Rokyta R, Šlamberová R (2010) Responsiveness to methamphetamine in adulthood is altered by prenatal exposure in rats. *Physiol Behav* 99:381-387.
- Segi-Nishida E (2011) Exploration of new molecular mechanisms for antidepressant actions of electroconvulsive seizure. *Biol Pharm Bull* 34:939-944.
- Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA (1993) Amphetamine: Effects on Catecholamine Systems and Behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:639-676.
- Sengupta P (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 4:624-630.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003) The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)* 168:3-20.
- Shen F, Meredith GE, Napier TC (2006) Amphetamine-induced place preference and conditioned motor sensitization requires activation of tyrosine kinase receptors in the hippocampus. *J Neurosci* 26:11041-11051.
- Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997) Antidepressant-Like Effect of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56:131-137.
- Slattery DA, Markou A, Cryan JF (2007) Evaluation of reward processes in an animal

- model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 190:555-568.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Somkuwar SS, Fannon MJ, Staples MC, Zamora-Martinez ER, Navarro AI, Kim A, Quigley JA, Edwards S, Mandyam CD (2016) Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct Funct* 221:4319-4335.
- Sonsalla PK, Jochnowitz ND, Zeevalk GD, Oostveen JA, Hall ED (1996) Treatment of mice with methamphetamine produces cell loss in the substantia nigra. *Brain Res* 738:172-175.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 4:417-63.
- Srisurapanont M, Jarusuraisin N, Kittirattanapaiboon P, Kao U (2014) Treatment for amphetamine dependence and abuse. *Cochrane Database Syst Rev* 2014.
- Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4:289-312.
- 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.
- Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* 15:4102-4108.
- Teixeira-Gomes A, Costa VM, Feio-Azevedo R, Bastos M de L, Carvalho F, Capela JP (2015) The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. *Int J Dev Neurosci* 41:44-62.
- Tendolkar I, van Beek M, van Oostrom I, Mulder M, Janzing J, Voshaar RO, van Eijndhoven P (2013) Electroconvulsive therapy increases hippocampal and amygdala volume in therapy refractory depression: A longitudinal pilot study. *Psychiatry Res - Neuroimaging* 214:197-203.
- Teuchert-Noodt G, Dawirs RR, Hildebrandt K (2000) Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm* 107:133-143.

- Thomas RM, Hotsenpiller G, Peterson DA (2007) Acute Psychosocial Stress Reduces Cell Survival in Adult Hippocampal Neurogenesis without Altering Proliferation. *J Neurosci* 27:2734-2743.
- Thompson AM, Swant J, Gosnell BA, Wagner JJ (2004) Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience* 127:177-185.
- Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M (2005) Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 78:1-22.
- Tourneur L, Chiocchia G (2010) FADD: A regulator of life and death. *Trends Immunol* 31:260-269.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4354.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Cardenas L, Herrmann N, Busto UE (2002) Probing Brain Reward System Function in Major Depressive Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 59:409.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, Busto UE (2005) Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. *Arch Gen Psychiatry* 62:1228-1236.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addict Biol* 12:227-462.
- UNODC (2018) Informe Mundial sobre las Drogas. Conclusiones y consecuencias en materia de políticas. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.
- Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HEW, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001) Amphetamine and cocaine induce different patterns of c- fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *Eur J Neurosci* 13:1977-1983.
- Vaidya JG, Grippo AJ, Johnson AK, Watson D (2004) A comparative developmental study of impulsivity in rats and humans: the role of reward sensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 1021:395-398.
- Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Acute Ethanol Withdrawal (Hangover) and Social Behavior in Adolescent and Adult Male and Female Sprague-Dawley Rats.

- Alcohol Clin Exp Res 28:40-50.
- Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2002) Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol Behav* 77:107-114.
- Verrico CD, Miller GM, Madras BK (2007) MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: Implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 189:489-503.
- Volkow ND, Swanson JM (2003) Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry* 160:1909-1918.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, Vitkun S, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Hitzemann R, Shea CE (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827-830.
- Vorhees C V., Reed TM, Morford LRL, Fukumura M, Wood SL, Brown CA, Skelton MR, McCrea AE, Rock SL, Williams MT (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). *Neurotoxicol Teratol* 27:117-134.
- Weiss F, Markou A, Lorang MT, Koob GF (1992) Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreasing during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res* 593:314-318.
- Wheeler JM, Reed C, Burkhart-Kasch S, Li N, Cunningham CL, Janowsky A, Franken FH, Wiren KM, Hashimoto JG, Scibelli AC, Phillips TJ (2009) Genetically correlated effects of selective breeding for high and low methamphetamine consumption. *Genes, Brain Behav* 8:758-771.
- Wills TA, Vaccaro D, McNamara G, Hirky AE (1996) Escalated substance use: a longitudinal grouping analysis from early to middle adolescence. *J Abnorm Psychol* 105:166-180.
- Wise RA, Munn E (1995) Withdrawal from chronic amphetamine elevates baseline intracranial self-stimulation thresholds. *Psychopharmacology (Berl)* 117:130-136.
- Wojtowicz JM, Kee N (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 1:1399.
- Xi ZX, Spiller K, Pak AC, Gilbert J, Dillon C, Li X, Peng XQ, Gardner EL (2008) Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects:

- Experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. *Neuropsychopharmacology* 33:1735-1745.
- Xie T, Tong L, McLane MW, Hatzidimitriou G, Yuan J, McCann U, Ricaurte G (2006) Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology* 31:2639-2651.
- 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.
- Yau JLW, Noble J, Seckl JR (1997) Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: Role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience* 78:111-121.
- Yeh S, Souza E De (1991) Lack of neurochemical evidence for neurotoxic effects of repeated cocaine administration in rats on brain monoamine neurons. *Drug Alcohol Depend* 27:51-61.
- Yetnikoff L, Reichard RA, Schwartz ZM, Parsely KP, Zahm DS (2014) Protracted maturation of forebrain afferent connections of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* 522:1031-1047.
- Yu H, Chen ZY (2011) The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* 32:3-11.
- Yuan CJ, Quirocho JMD, Kim A, Wee S, Mandyam CD (2011) Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle. *Pharmacol Biochem Behav* 100:98-108.
- Zhang H-Y, Gao M, Liu Q-R, Bi G-H, Li X, Yang H-J, Gardner EL, Wu J, Xi Z-X (2014) Cannabinoid CB₁ receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci* 111:E5007-E5015.
- Zilkha N, Feigin E, Barnea-Ygael N, Zangen A (2014) Induction of depressive-like effects by subchronic exposure to cocaine or heroin in laboratory rats. *J Neurochem* 130:575-582.

