

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I
PARASITOLOGIA

EFFECTOS DE LA COCAÍNA Y DEL TOLUENO SOBRE LA
NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE RATA.

LAURA DOMÍNGUEZ ESCRIBÀ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de novembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Enrique Lanuza Navarro
- Dra. María Salomé Sirerol Piquer
- Dr. Juan Antonio Barcia Albacar
- Dr. Francisco Javier Romero Gómez
- Dr. Juan Salvador Nácher Roselló

Va ser dirigida per:

Dr. José Manuel García Verdugo

Dr. Ulises Alfonso Gómez Pinedo

©Copyright: Servei de Publicacions
Laura Domínguez Escribà

Dipòsit legal: V-1049-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7785-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

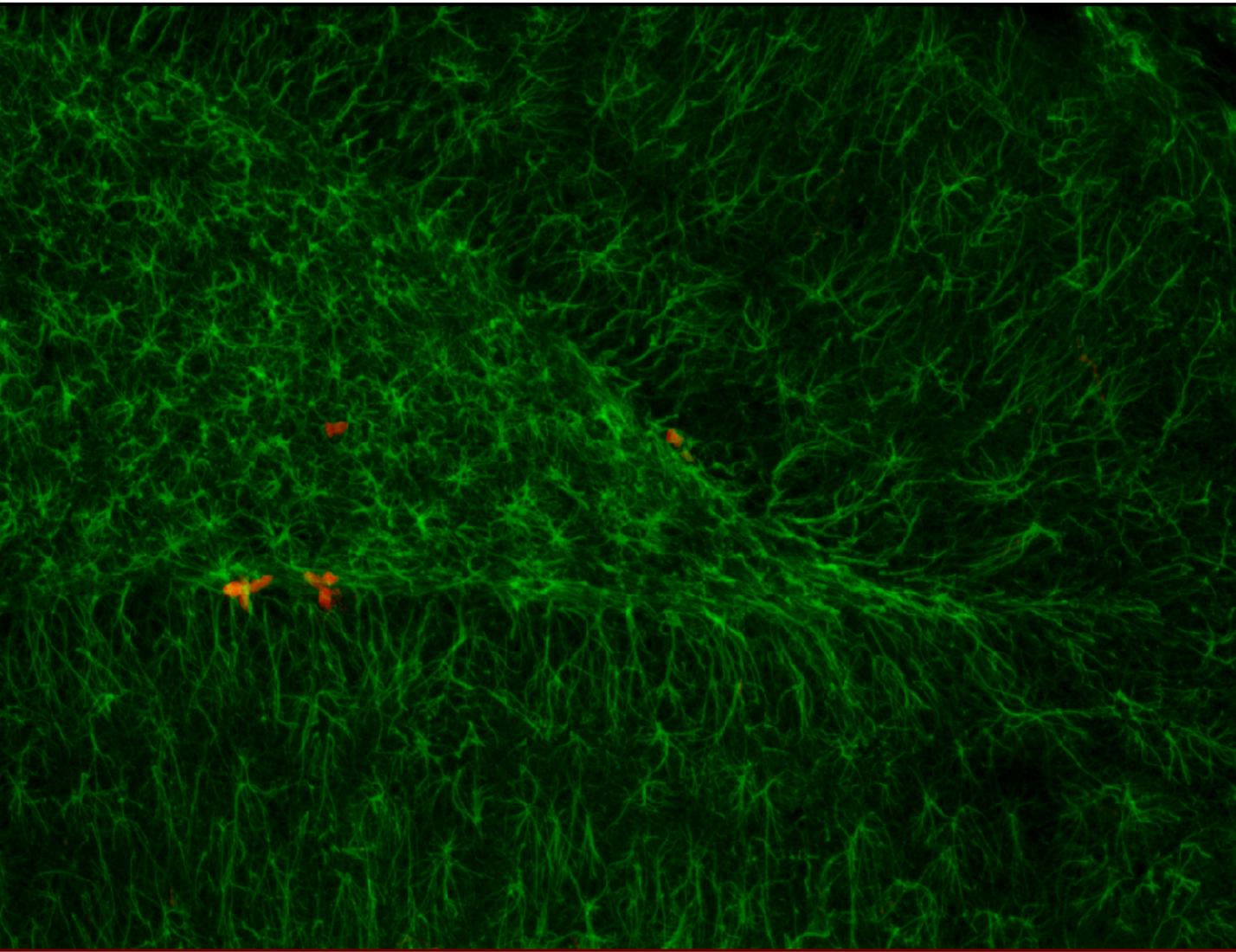
C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata.



Laura Domínguez Escribà
Valencia, 2009

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Biològiques
Departament de Biologia Cel.lular i Parasitologia.



**EFFECTOS DE LA COCAÍNA Y DEL TOLUENO
SOBRE LA NEUROGÉNESIS EN EL
HIPOCAMPO DE RATA.**

Laura Domínguez Escribà

A ma mare, mon pare i la meua àvia.

A la meua padrina, al tendre record
de les seues ganes de viure.

"Los hombres deberían saber que del cerebro, y nada más que del cerebro, vienen las alegrías, el placer, la risa y la diversión, las penas, el dolor, el abatimiento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro, de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos, oímos y sabemos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es insípido... Y gracias a este órgano nos volvemos locos y deliramos, y los miedos y terrores nos asaltan... Debemos soportar todo esto cuando el cerebro no está sano... Y en este sentido soy de la opinión de que esta víscera ejerce en el ser humano el mayor poder."

Hipócrates, 460-377 a. C.

ÍNDICE

RESUMEN	18
CAPÍTULO – 1: INTRODUCCIÓN	23
1.1. ORIGEN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA	24
1.2. NEUROGÉNESIS ADULTA Y ZONAS NEUROGÉNICAS.....	25
1.2.1. LA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ).....	27
1.2.2. LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA.....	29
1.2.2.1. ORGANIZACIÓN DE LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA.....	29
1.2.2.2. CONEXIONES Y FUNCIONALIDAD.....	31
1.2.2.3. TIPOS CELULARES.....	35
1.3. PROLIFERACIÓN.....	42
1.4. MIGRACIÓN NEURONAL.....	43
1.5. DIFERENCIACIÓN E INTEGRACIÓN.....	43
1.6. REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO.....	51
1.6.1. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES.....	52
1.6.1.1. GLUTAMATO.....	52
1.6.1.2. DOPAMINA.....	52
1.6.1.3. SEROTONINA.....	52

1.6.1.4. GABA (ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO).....	55
1.6.1.5. ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	56
1.6.2. FACTORES TRÓFICOS.....	57
1.6.3. REGULACIÓN POR CÉLULAS GLIALES.....	58
1.6.4. REGULACIÓN POR MUERTE CELULAR.....	59
1.6.5. CONDICIONES DE ESTRÉS.....	60
1.6.6. AGENTES ANTIOXIDANTES.....	61
1.7. NEUROGÉNESIS, HIPOCAMPO Y MEMORIA.....	62
1.7.1. NEUROGÉNESIS Y MEMORIA.....	64
1.7.2. HIPOCAMPO Y MEMORIA.....	65
1.8. EFECTO DE LAS DROGAS SOBRE LA NEUROGÉNESIS.....	68
1.8.1. ALCOHOL.....	68
1.8.2. ANFETAMINA Y EL MDMA (3,4-METILENEDIOXIMETAMFETAMINA).....	70
1.8.3. OPIOIDES.....	71
1.8.4. NICOTINA.....	73
1.8.5. CANNABIS.....	74
1.9. DROGAS ESTIMULANTES: LA COCAÍNA	76
1.9.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN.....	76
1.9.2. FORMAS DE COCAÍNA.....	78
1.9.3. METABOLISMO DE LA COCAÍNA.....	79
1.9.3.1. FARMACOCINÉTICA.....	79

1.9.3.2. FARMACODINÁMICA.....	81
1.9.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD.....	84
1.10.SOLVENTES ORGÁNICOS: EL TOLUENO.....	87
1.10.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN.....	87
1.10.2. FORMAS DE EXPOSICIÓN.....	92
1.10.2.1. EXPOSICIÓN LABORAL Y RECREATIVO.....	92
1.10.2.2. INHALACIÓN INTENCIONAL Ó RECREATIVA.....	94
1.10.2.3. EXPOSICIÓN AMBIENTAL.....	95
1.10.3. METABOLISMO DEL TOLUENO.....	96
1.10.3.1. FARMACOCINÉTICA.....	97
1.10.3.2. FARMACODINÁMICA.....	98
1.10.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD.....	101
1.10.4.1. ESTRÉS OXIDATIVO.....	102
1.10.4.2. EFECTOS AGUDOS.....	105
1.10.4.3. EFECTOS DE EXPOSICIÓN CRÓNICA.....	106
1.10.4.4. EXPOSICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN.....	110
1.10.4.5.EFECTOS TRÁS LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA.....	111

CAPÍTULO – 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	113
2.1.JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	114
2.1.1. COCAÍNA.....	114
2.1.2. TOLUENO.....	115
2.2.HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	116
2.3. OBJETIVOS GENERALES.....	117
2.4. OBJETIVOS CONCRETOS.....	118
2.5.DISEÑO EXPERIMENTAL.....	120
CAPÍTULO – 3: MATERIAL Y MÉTODOS	123
3.1.ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO.....	124
3.2.DOSIS DE LAS DROGAS ADMINISTRADAS.....	127
3.2.1. COCAÍNA.....	128
3.2.2. TOLUENO.....	129
3.3.TRATAMIENTOS E INYECCIÓN DE BrdU.....	133
3.3.1. COCAÍNA.....	133
3.3.2. TOLUENO.....	136
3.3.2.1. ESTUDIOS DEL EFECTO CRÓNICO DEL TOLUENO.....	137
3.3.2.2. ESTUDIOS DE LA EXPOSICIÓN DEL TOLUENO SOBRE EL DESARROLLO.....	141
3.4.PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	151

3.4.1. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	152
3.4.2. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	156
3.5. ESTUDIOS CON LC/MS/MS: MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y DE LA INTOXICACIÓN POR TOLUENO.....	158
3.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	160
CAPÍTULO – 4: RESULTADOS.....	168
4.1. COCAÍNA.....	169
4.1.1. EXPOSICIÓN.....	168
4.1.2. PROLIFERACIÓN.....	168
4.1.3. SUPERVIVENCIA.....	171
4.1.4. MADURACIÓN.....	173
4.1.5. MUERTE CELULAR.....	185
4.2. TOLUENO.....	187
4.2.1. EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE 24 DÍAS.....	187
4.2.1.1. EXPOSICIÓN.....	187
4.2.1.2. PROLIFERACIÓN.....	193
4.2.1.3. SUPERVIVENCIA.....	195
4.2.1.4. MADURACIÓN.....	198
4.2.1.5. MUERTE CELULAR.....	202
4.2.2. EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE EL DESARROLLO.....	208

4.2.2.1. EXPOSICIÓN.....	208
4.2.2.2. PROLIFERACIÓN.....	214
4.2.2.3. SUPERVIVENCIA.....	216
4.2.2.4. MADURACIÓN.....	220
4.2.2.5. MUERTE CELULAR.....	224
4.2.2.6. ESTUDIOS DE CONDUCTA.....	234
CAPÍTULO – 5: DISCUSIÓN.....	248
5.1.COCAÍNA	252
5.2.TOLUENO.....	259
CAPÍTULO – 6: CONCLUSIONES.....	284
6.1.COCAÍNA.....	285
6.2.TOLUENO.....	285
6.2.1 EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE 24 DÍAS.....	285
6.2.2 EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE EL DESARROLLO.....	286
BIBLIOGRAFÍA.....	291

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura-1. Neurogénesis adulta en la SVZ.....	29
Figura-2. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl.....	32
Figura-3. Conexiones hipocámpicas	35
Figura-4. Neurogénesis adulta en la SGZ.....	40
Figura-5. Estadios del crecimiento dendrítico	46
Figura-6. Fases de la neurogénesis y marcadores	49
Figura-7. Estructura de la cocaína	76
Figura-8. Hoja de la cocaína.....	77
Figura-9. Bloqueo del receptor DA por la cocaína	83
Figura-10. Estructura química del tolueno.....	87
Figura-11. Mecanismos de acción del tolueno sobre diferentes receptores.....	100
Figura-12. Mecanismos de formación del metabolito 8-OHdGua inducido por estrés oxidativo.....	104
Figura-13. Alteraciones de la microglía causadas por el tolueno	110
Figura-14. Fotografías de la cámara de intoxicación	131
Figura-15. Diagrama del Experimento 1-PROLIFERACIÓN	133
Figura-16. Diagrama del Experimento 2-SUPERVIVENCIA	134

Figura-17. Diagrama del Experimento 3-MADURACIÓN	135
Figura-18. Diagrama del Experimento 1-PROLIFERACIÓN	138
Figura-19. Diagrama del Experimento 2-SUPERVIVENCIA	139
Figura-20. Diagrama del Experimento 3-MADURACIÓN	140
Figura-21. Representación esquemática de los cuadrantes utilizados para la prueba de campo abierto	144
Figura-22. Representación esquemática de la posición de los objetos para la prueba de reconocimiento de objetos	146
Figura-23.-Representación esquemática de la posición de los objetos para la prueba de reconocimiento de lugar	147
Figura-24. Claves espaciales empleadas para la prueba de reconocimiento de lugar	148
Figura-25. Protocolo experimental para el estudio del efecto del tolueno durante el desarrollo.....	150
Figura-26. Categorías establecidas a partir de la expresión de DCX	162
Figura-27. Categorías establecidas a partir de la inmunohistoquímica de OX-42	163
Figura-28. Efecto de la cocaína sobre la proliferación celular	170
Figura-29. Efecto de la cocaína sobre el marcador Ki-67	171
Figura-30. Efectos de la cocaína sobre la supervivencia celular	173
Figura-31. Efectos de la cocaína sobre la maduración celular	174
Figura-32. Efectos de la cocaína sobre el marcador DCX.....	176
Figura-33. Efectos de la cocaína sobre los diferentes tipos celulares DCX+, tras 8 días de tratamiento.....	179

Figura-34. Efectos de la cocaína sobre los diferentes tipos celulares DCX+, tras 24 días de tratamiento.....	180
Figura-35. Efectos de la cocaína sobre la maduración neuronal.....	182
Figura-36. Fotomicrografías al microscopio electrónico mostrando los botones sinápticos en CA3	184
Figura-37. Gráfica de TUNEL para los experimentos con cocaína	186
Figura-38. Tiempo de exposición	188
Figura-39. Fotografías de los síntomas de intoxicación por tolueno	190
Figura-40. Valores obtenidos para el ácido hipúrico tras el experimento de tolueno durante 24 días.....	192
Figura-41. Efectos de la intoxicación con tolueno durante 24 días sobre la proliferación.....	194
Figura-42. Efecto sobre las células BrdU+ del experimento de supervivencia tras la intoxicación con tolueno durante 24 días	195
Figura-43. Efectos sobre el marcador DCX del experimento de supervivencia causados por la intoxicación con tolueno durante 24 días	197
Figura-44. Efectos sobre el número de células BrdU+ del experimento de maduración producidos por la intoxicación con tolueno durante 24 días	198
Figura-45. Células DCX+, dibujadas en la cámara clara, tras la exposición al tolueno.....	200
Figura-46. Efectos sobre la exposición al tolueno durante 24 días sobre la longitud y el número de dendritas DCX+.....	201
Figura-47. Muerte celular tras la intoxicación con tolueno durante 24 días	203
Figura-48. Alteraciones morfológicas de las células microgliales.....	204
Figura-49. Alteraciones ultraestructurales en el DG tras un tratamiento con tolueno durante 24 días.....	206

Figura-50. Aumento de los niveles de 8-OHdGua tras la exposición a tolueno durante 24 días.....	208
Figura-51. Tiempo de exposición al tolueno durante 72 días.....	209
Figura-52. Valores obtenidos para el ácido hipúrico tras el experimento de tolueno durante 24 días.....	211
Figura-53. Crías intoxicadas con tolueno durante su gestación y etapa postnatal temprana....	212
Figura-54. Niveles del marcador BrdU tanto para el grupo de madres como de las crías del experimento de intoxicación de tolueno durante el desarrollo	215
Figura-55. Efectos sobre las células BrdU/NeuN para el grupo de madres tratadas durante 72 días.....	217
Figura-56. Efectos sobre las células BrdU/NeuN para las crías expuestas al tolueno durante sudesarrollo y etapa postnatal temprana.....	218
Figura-57. Efecto del tolueno sobre la inmunohistoquímica fluorescente de BrdU/NeuN en la corteza de las crías.....	219
Figura-58. Efecto de la intoxicación con tolueno durante 72 días sobre el marcador DCX.....	222
Figura-59. Efecto de la intoxicación con tolueno durante el desarrollo y la etapa postnatal temprana sobre el marcador DCX.....	223
Figura-60. Los niveles de caspasa muestran la muerte celular producida por la intoxicación con tolueno durante el desarrollo.....	225
Figura-61. Efectos del tolueno sobre el grupo de las madres para el marcador OX-42.....	226
Figura-62. Efectos del tolueno sobre el grupo de las crías para el marcador OX-42.....	227
Figura-63. Valores de la microglía tras un tratamiento con tolueno durante el desarrollo y la etapa postnatal temprana	228
Figura-64. Aumento de la gliosis tras exposición al tolueno durante 72 días para el grupo de las madres	229

Figura-65. Aumento de la gliosis tras exposición al tolueno durante 72 días para el grupo de las crías.....	230
Figura-66. Estudio de la ultraestructura del DG tras un tratamiento con tolueno durante el desarrollo.....	232
Figura-67. Valores obtenidos para el 8-OHdGua tras la exposición al tolueno durante 72 días.....	236
Figura-68. Resultados obtenidos para el test del campo abierto, en el experimento de tolueno durante el desarrollo.....	238
Figura-69. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de objetos para el grupo de las madres expuestas al tolueno durante 72 días.....	240
Figura-70. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de objetos para el grupo de las crías.....	240
Figura-71. Efectos de la exposición al tolueno sobre el índice de memoria del DG.....	242
Figura-72. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de lugar para las madres expuestas al tolueno durante 72 días.....	244
Figura-73. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de lugar para las crías expuestas al tolueno durante su desarrollo y la etapa postnatal temprana.....	246
Figura-74. Secuencia de eventos que ocurren durante el daño que lleva a la muerte neuronal.....	265
Figura-75. Relación entre la microglía activada y la neurona en una situación de estrés oxidativo.....	268
Figura-76. Interacción existente entre las principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno con los sistemas de defensa antioxidante.....	273

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla-1. Principales sistemas de memoria.....	62
Tabla-2. Farmacocinética de la cocaína respecto a la vía de administración.....	80
Tabla-3. Productos comerciales en los que aparecen solventes orgánicos.....	91
Tabla-4. Comparación de los efectos agonistas y antagonistas del etanol y el tolueno.....	99
Tabla-5. Estructuras estudiadas en los botones sinápticos de la CA3.....	185

ABREVIATURAS

- 5-HT: serotonina.
- 8-OHdGua: 8-hidroxideoxiguanosina
- BrdU: 5'-bromo-2-deoxiuridina.
- DA: dopamina.
- DAB: diaminobenzidina
- DCX: doblecortina.
- DG: giro dentado
- EGF: factor de crecimiento epidérmico.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos – 2.
- GCL: capa granular del hipocampo.
- GABA: ácido γ -aminobutírico.
- GD: día de gestación.
- IGF-1: factor de crecimiento insulina-1.
- KA: Ácido kaínico.
- LH: hormona luteinizante.
- MDMA: 3,4-metilenedioximetamfetamina o éxtasis.
- Mol,Mol L, ML: capa molecular.
- NAcc: núcleo accumbens.
- NIDA: Instituto Nacional de Drogas de Abuso.
- NMDA: N-metil-D-aspartato.
- NO: óxido nítrico.
- NOS: óxido nítrico sintetasa.
- NT: neurotransmisor.
- OX-42 = CD11b: “cluster” de diferenciación.
- PCNA: antígeno nuclear de células proliferativas.
- PFA: paraformaldehído.
- PSA-NCAM: “Polysialated Neural Cell Adhesion Molecule”.
- RMS: camino migratorio rostral.
- SGZ: capa subgranular del giro dentado del hipocampo.

SNC: sistema nervioso central.

SOD: superóxido dismutasa.

SVZ: zona subventricular de los ventrículos laterales.

THC: Δ -9- Tetrahidrocannabinol.

TUNEL: “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling”.

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.



RESUMEN



RESUMEN

En el presente proyecto se ha estudiado el efecto de dos drogas adictivas, como son el tolueno y la cocaína, sobre la neurogénesis hipocámpica. Los experimentos diseñados para ambas drogas abordaron el estudio de la neurogénesis, a través de la medida de proliferación, supervivencia, diferenciación y migración. Además de analizar el efecto ultraestructural que ambas drogas causan sobre el giro dentado. De forma más exhaustiva se estudió el efecto producido por una administración crónica del tolueno durante el desarrollo, y por último, el estudio de la afectación de este tratamiento sobre la memoria y el aprendizaje.

En los experimentos con cocaína, se estudió el efecto sobre la proliferación, supervivencia y maduración, tras una exposición a corto plazo (8 días) y largo plazo (24 días) a la cocaína. Para ello, se realizó un experimento de proliferación, en el que se determinó que tanto a los 8 días como a los 24 días de tratamiento se producía una reducción de la tasa de proliferación celular. En el segundo experimento, se determinó que la exposición crónica a la cocaína no alteraba la supervivencia de las nuevas células generadas. En el tercer experimento, se observó que el tratamiento con cocaína no afectaba la amplitud de las arborizaciones dendríticas, ni modificaba el desarrollo neuronal. Mediante el uso del microscopio electrónico se observó que no existían cambios en las diferentes características analizadas, relativas a la ultraestructura de los botones

sinápticos de la proyección de las fibras musgosas del CA3 provenientes del giro dentado hipocámpico.

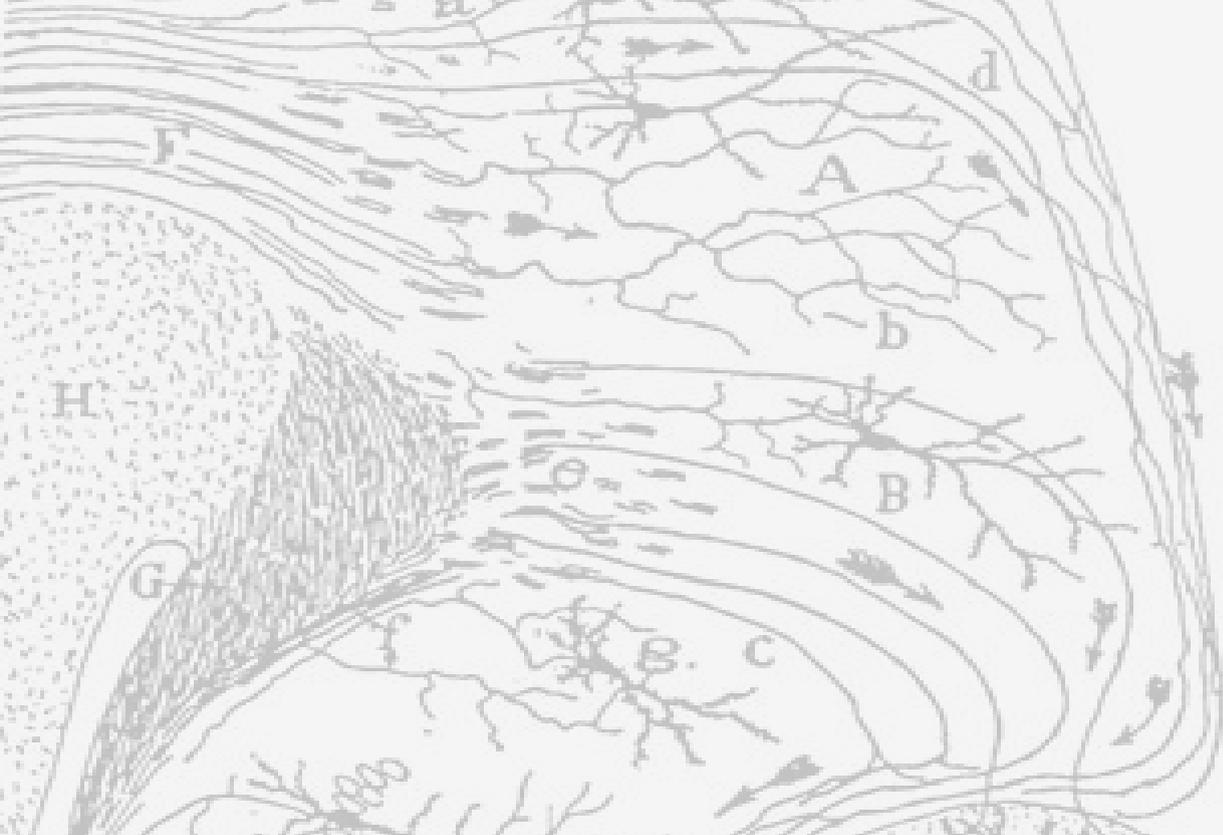
Los experimentos con tolueno se realizaron bajo dos protocolos de administración diferentes. En el primero, los animales inhalaban tolueno durante 24 días, mientras que en el segundo se estudió el efecto de una exposición crónica al tolueno durante 72 y los efectos en sus crías, que fueron expuestas al tolueno durante su gestación y en la etapa postnatal temprana mediante la leche materna.

De estos experimentos con tolueno se pudo concluir que el solvente induce estrés oxidativo en el cerebro del animal, que a su vez produce un aumento de la muerte celular, y como respuesta se produce un aumento de la supervivencia celular, de la maduración, una activación de la microglía, y una astrogliosis reactiva. Además, el análisis de la ultraestructura del giro dentado de los animales expuestos al tolueno, mostró la desorganización de la capa granular, la modificación de la morfología de las células granulares, y variaciones en su tamaño. Aunque no se encontraron diferencias en los nichos neurogénicos entre animales control y los tratados con tolueno.

Como complemento a los análisis hechos se realizaron estudios de conducta, para el experimento de exposición al tolueno durante 72 días. Estos estudios mostraron que no se producía una hiperactivación en la actividad locomotora tanto de las madres como de las crías expuestas al tolueno. Además, se realizaron pruebas de reconocimiento de lugar y de

objetos, que mostraron resultados diferentes para las madres y las crías. Las ratas madres, expuestas al tolueno durante su etapa adulta, no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede concluir que no vieron afectadas sus capacidades cognitivas ni de percepción. En cambio, en las crías expuestas al solvente durante su desarrollo, sí que se vieron afectadas ambas capacidades.

En conclusión, la cocaína y el tolueno bajo estos modelos de exposición y dosificación empleados, tienen efectos evidentes sobre la neurogénesis en el hipocampo, aunque será necesario seguir investigando para conocer con mayor detalle los efectos de ambas drogas sobre la neurogénesis y el hipocampo.



INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO – 1: INTRODUCCIÓN

1.1. ORIGEN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA

A principios del siglo XX, científicos como Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1904), postulaban que el Sistema Nervioso Central era incapaz de regenerarse en la vida postnatal. Cabe mencionar que, en este tiempo, estas afirmaciones tenían sus fundamentos metodológicos en el análisis histológico de tejidos mediante técnicas de tinciones argénticas o de anilinas (Nissl), por lo que estas observaciones eran coherentes para su época. La mayor parte de los investigadores de principio de siglo pasado, describían las neuronas como células con arborizaciones dendríticas, pero si en el análisis de su morfología se evidenciaban alteraciones en su tamaño (eran células pequeñas), se las consideraban como células indiferenciadas o, si existía alguna duda, se clasificaban directamente como artefactos de la preparación histológica.

Los primeros datos sobre neurogénesis adulta en mamíferos, proceden de investigaciones que se realizaron hace más de tres décadas en roedores, donde se demostró la existencia de dos zonas diferenciadas donde las células se dividían y producían neuronas (Altman, 1962, 1969). Pero esta idea no fue aceptada hasta los 90s, reconociéndose la existencia de células con capacidad de originar diferentes estirpes de células nerviosas (Reynolds *et al.*, 1992, Doetsch, 2002).

1.2. NEUROGÉNESIS ADULTA Y ZONAS NEUROGÉNICAS

Actualmente podemos definir la neurogénesis adulta como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de las células progenitoras, incluyendo la proliferación y diferenciación neuronal específica de los progenitores neuronales, además de la maduración e integración funcional de las neuronas en sus circuitos (Ming y Song, 2005).

Durante la evolución, la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto ha disminuido, mientras que se ha incrementado la complejidad cerebral. Así, los vertebrados inferiores pueden regenerar tejidos y/o regiones enteras del cerebro, mientras que en los vertebrados superiores, esta regeneración está confinada a pocas zonas cerebrales (Kempermann *et al.*, 2004). La neurogénesis adulta ha sido descrita en diferentes vertebrados, como peces (Zupanc y Horschke, 1995), reptiles (López-García, 1988; Pérez-Cañellas, 1996), pájaros (Barnea y Nottebohm, 1994; Alvarez-Buylla *et al.*, 1998), roedores (Altman y Das, 1965), primates (Gould *et al.*, 1997; Pencea *et al.*, 2001; Mirescu y Gould, 2004; Kempermann *et al.*, 2004) e incluso en humanos (Eriksson, 1998).

Las regiones a las que llamamos neurogénicas dentro del cerebro, lo son porque implican dos condiciones: en primer lugar, la presencia de células precursoras inmaduras a partir de las cuales pueden desarrollarse nuevas neuronas; y en segundo lugar, un microambiente que sea permisivo para que

el proceso de neurogénesis tenga lugar. Hasta el momento, en el cerebro de los mamíferos adultos se han descrito principalmente dos zonas responsables de la neurogénesis que son: los bulbos olfatorios y el hipocampo. Resulta interesante destacar que no siempre existe correlación topográfica entre la existencia de células madre y la aparición de nuevas neuronas. Así, mientras en el hipocampo las células madre y las nuevas neuronas coexisten, en la otra región, el bulbo olfatorio, las nuevas neuronas proceden de la zona que rodea los ventrículos laterales, denominada zona subventricular (SVZ) (Lois *et al.*, 1994), concretamente en la pared lateral del ventrículo. Desde esta región, las nuevas células tienen que migrar hasta alcanzar el bulbo olfatorio, constituyendo el camino migratorio rostral (RMS, del inglés Rostral Migratory Stream), que en ratones tiene entre 5 y 6 milímetros de recorrido (Lois *et al.*, 1994) y una vez situadas en el bulbo olfatorio se diferencian a neuronas. Actualmente, también sabemos que existe una migración hacia el cuerpo caloso, donde preferentemente se diferencian en oligodendrocitos (Menn *et al.*, 2006).

1.2.1. LA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ):

A partir de estudios de microscopía electrónica, reconstrucciones celulares y diversos marcadores moleculares, se ha establecido la organización precisa de la SVZ en roedores (Doetsch *et al.*, 2002), como el primer paso para la identificación de la célula madre (Fig. 1). De este modo, se han encontrado cuatro tipos celulares (Doetsch, 1997; Álvarez-Buylla y Lim, 2004) que son los siguientes:

- **Las células A (Migradoras):** son las neuronas inmaduras (neuroblastos). Poseen un proceso apical largo en un extremo y otro generalmente corto, en el polo opuesto. Estas células son incapaces de auto-renovarse. Suelen aparecer en grupos o rosetas de células formando cadenas, separadas por espacios extracelulares para facilitar la movilidad. También se expresan marcadores específicos como PSA-NCAM (“*Polysialated Neural Cell Adhesion Molecule*”), Tuj-1 (beta tubulina III) y así como el factor de transcripción Dlx-2.

- **Las células B (Astrocitos):** correspondientes a las células precursoras primarias (o células madres), poseen un gran capacidad para dividirse que les permite formar neuroesferas *in vitro*. Al dividirse, pueden dar lugar a otra célula igual a la madre o generar unas células transitorias con elevada tasa de división, llamadas células C. Los astrocitos son positivos para marcadores de proteínas de filamentos intermedios: vimentina, nestina y GFAP (proteína de la glía fibrilar acídica). En la actualidad las células B se dividen en dos subtipos:

- *Astroцитos tipo B1*: que contactan con la cavidad ventricular mediante un cilio corto y rectilíneo, llamado cilio primario, que se extiende a través de otro tipo celular, las células tipo E, para contactar con el lumen del ventrículo.

- *Astroцитos tipo B2*: no contactan con la cavidad ventricular.

- **Las células C (Precursores)**: son las células precursoras ya que se dividen de forma rápida y transitoria, dando lugar a células de tipo A (Fig.1), y se caracterizan por ser el tipo celular con mayor tasa proliferativa de la SVZ. Se encuentran formando grupos de dos o tres células adheridas a las cadenas de células de tipo A. Son también positivas para el factor de transcripción Dlx-2 como las células tipo A, pero se diferencian de ellas por ser negativas para el marcador PSA-NCAM.

- **Las células E (Ependimarias)**: no se han observado procesos mitóticos en ellas, pero poseen un papel importante en los nichos neurogénicos y en la migración de las nuevas neuronas al bulbo olfatorio. Inmunohistoquímicamente, este tipo de células son positivas para vimentina, S-100 y CD-24. Pueden describirse dos tipos diferentes:

- *Células Ependimarias E1*: estas células poseen muchos cilios y microvellosidades (Mirzadeh *et al.*, 2008).

- *Células Ependimarias E2 (células biciliadas)*: su característica más distintiva son sus largos cuerpos basales, además poseen únicamente dos cilios, parcialmente invaginados (Mirzadeh *et al.*, 2008).

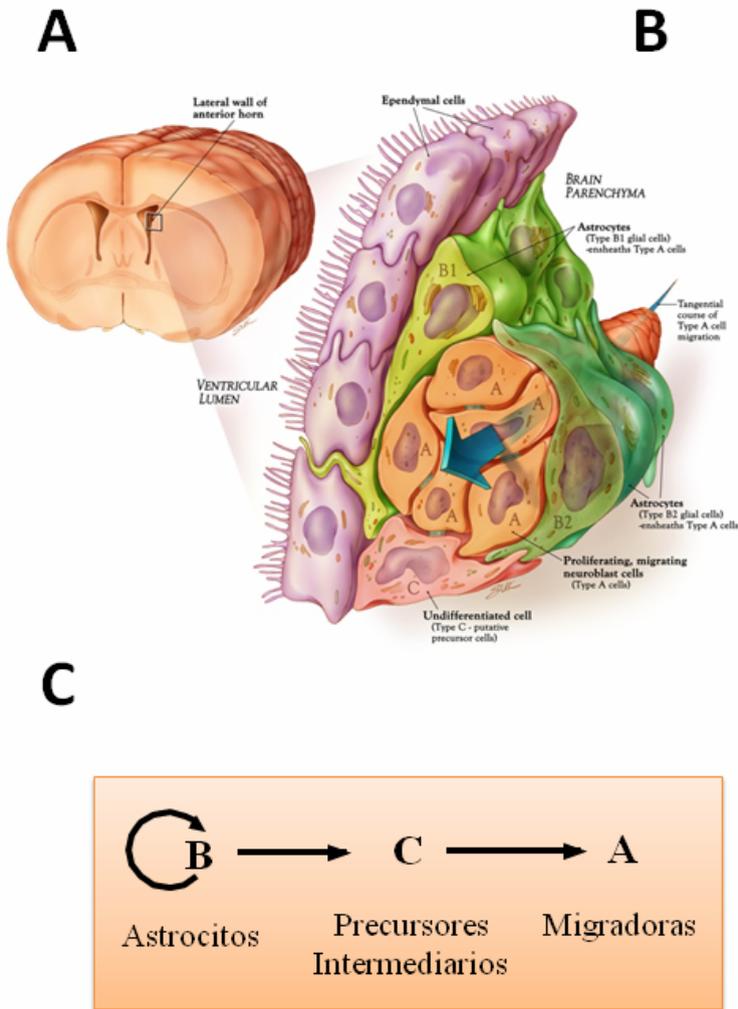


Figura 1. Neurogénesis adulta en la SVZ. (A) Sección coronal de cerebro de roedor adulto. Se marca el ventrículo lateral y la parte que se amplía. (B) Arquitectura de la SVZ, las células B (verdes), son los astrocitos, los de tipo B1 están en contacto con la cavidad ventricular, mientras que los astrocitos tipo B2 no contactan con esta cavidad. Las células C (rojas), de división rápida. Y las células A (naranja), que corresponden a los neuroblastos migradores al BO. Por último, las células moradas son las ependimarias. (Imagen tomada de Quiñones-Hinojosa *et al.*, 2006) (C) Estirpe celular de la SVZ (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

1.2.2. LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA:

1.2.2.1. ORGANIZACIÓN DE LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA:

La formación hipocámpica comprende seis regiones distinguibles citoarquitectónicamente, conectadas de forma unidireccional: el hipocampo, formado por el hipocampo propio y el giro dentado (separados por la fisura hipocámpica); el complejo subicular, formado por el *presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*; y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989).

El **giro dentado** está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, *stratum granulare* (donde residen las células granulares, Gr) (Fig.2). Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica, *stratum moleculare* o capa molecular (Mol) (Fig.2), se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, designada *hilus*, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares (Amaral, 1978; Amaral y Witer, 1989). Entre el *stratum granulare* y el *hilus* se pueda distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman y Das, 1965; Kaplan y Bell, 1984; Altman y Bayer, 1990; Seri *et al.*, 2001).

El **hipocampo propio o cuerno de Amón** está dividido en tres áreas: CA1 (*Cuerno de Amón 1*), CA2 (*Cuerno de Amón 2*) y CA3 (*Cuerno de Amón 3*). La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas (Fig.2). Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el *alveus* o sustancia blanca. Luego, encontramos una capa estrecha, el *stratum oriens (Or)*, formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *stratum pyramidale (Py)*, de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el *stratum radiatum (Rad)*, formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) encontramos el *stratum lacunosum moleculare (LMol)*, que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los *stratums pyramidale y radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *stratum lucidem (SLu)* (Fig.2).

La **corteza entorrinal** se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas. Las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones hacia el hipocampo. Las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus proyecciones fuera de la formación hipocámpica. Las capas I y IV son acelulares.

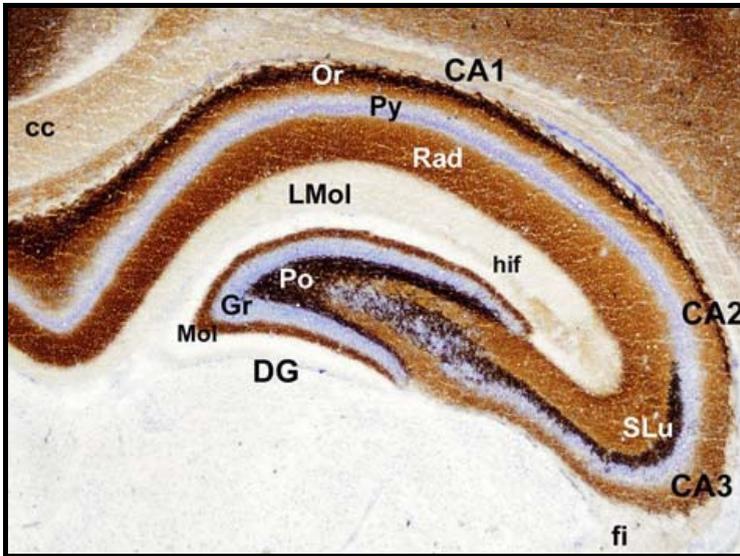


Figura 2. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: *oriens* (Or), piramidal (Py), *radiatum* (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente, en la CA3, hay otra capa denominada *stratum lucidum* (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, *corpus callosum*. (figura extraída de Amaral y Witter, 1989).

1.2.2.2. CONEXIONES Y FUNCIONALIDAD:

La formación hipocámpica posee un **circuito trisináptico excitador** que se inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal, cuyas proyecciones contactan con las células granulares del giro dentado. Estas envían sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de la CA3,

atravesando el *hilus* (Amaral, 1978; Chicurel y Harris, 1992) (Fig.3), y estas otras, a su vez, envían sus axones hacia las neuronas piramidales de la CA1, mediante los colaterales de Schaffer (SC), como puede observarse en la Fig.3. La principal conexión externa de la formación hipocámpica se establece con el *septum*. Las células granulares del giro dentado no proyectan hacia fuera de la formación hipocámpica, sin embargo reciben axones provenientes del hipotálamo (Swanson, 1977; Vertes, 1992). Las neuronas de la CA3 envían sus axones fuera de la formación hipocámpica únicamente a la región septal (Amaral y Witter, 1995). Por el contrario, las neuronas de la CA1 poseen proyecciones mayoritariamente hacia la región septal, pero también hacia la corteza frontal, retrosplenial y perirrinal, así como hacia el bulbo olfatorio, la amígdala y el hipotálamo (Jay *et al.*, 1989; Van Groen y Wyss, 1990).

Estudios relacionados con las proyecciones axonales de las células granulares a la CA3, **las fibras musgosas**, muestran un orden topográfico en estas proyecciones, es decir, la emisión de las proyecciones axonales de las células granulares está dirigida a una localización concreta del área CA3 (Hastings *et al.*, 2001). Sin embargo, las neuronas granulares laterales y superficiales, habiendo sido éstas formadas durante etapas tempranas en el desarrollo, envían proyecciones más divergentes a la CA3 que las proyecciones emitidas por las neuronas formadas durante etapas más tardías del desarrollo. Aunque la competición sináptica se cree que juega un papel determinante en la divergencia de la emisión de las fibras musgosas (Blackstad *et al.*, 1970, Gaarskjaer, 1978), los mecanismos topográficos que

determinan esta divergencia, así como su explicación funcional, permanecen desconocidos. De este modo, se propone que cada región concreta de la capa granular del DG podría estar destinada a una función hipocámpica concreta, y por tanto, emitiría su proyección axonal a una localización específica de la CA3 (Hastings *et al.*, 2001).

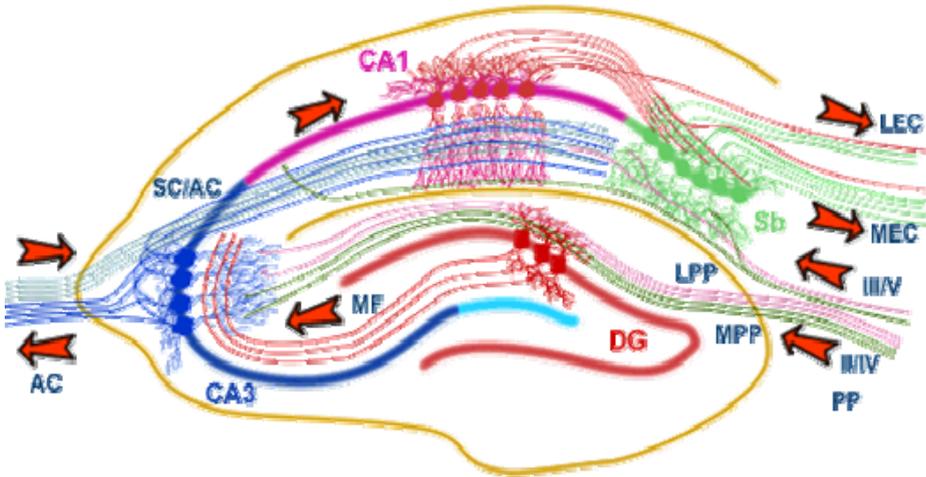


Figura 3. Conexiones hipocámpicas. El hipocampo tiene una red de conexiones principalmente uni-direccional, con una conexión de entrada desde la corteza Entorrinal (EC) que conecta con el Giro Dentado (DG) y hacia CA3 por la vía perforante (PP). Las neuronas piramidales de la CA3 reciben la conexión del DG por la vía de las Fibras Musgosas (MF). Ellas a su vez emiten sus axones a las células de la CA1 por la vía Colateral de Schaffer, del mismo modo que las células de la CA1 emiten hacia el hipocampo contralateral por la vía Comisural Asociativa. Las células piramidales de la CA1 reciben una conexión directa por la vía Perforante y mandan sus axones al Subiculum (Sb). Estas neuronas devuelven la información hipocámpica de nuevo a la EC, cerrando de esta forma el ciclo de información (Figura tomada de MRC “Centre for Synaptic Plasticity, School of Medical Sciences, Department of Anatomy, University Walk, Bristol”).

1.2.2.3. TIPOS CELULARES:

En el DG, la población de células precursoras reside en la capa SGZ (zona subgranular). La progenie de estas células en continua división migra distancias cortas hasta la capa granular (Fig.4). Una vez situadas en esta capa, estas células emiten las dendritas hacia la capa molecular, hasta contactar con las células granulares allí presentes con anterioridad, además de emitir su axón a lo largo de las fibras musgosas que van a contactar con la región CA3 del hipocampo. Después de un corto plazo de tiempo, estas células están completamente integradas y son funcionales, por lo que no podrán diferenciarse de las que residían con anterioridad.

Se observan tres tipos celulares diferentes, la organización de los diferentes tipos celulares puede observarse en la Fig. 4. De este modo, en el DG, aparecen los siguientes tipos celulares:

- **Las células tipo B (astrocitos):** denominadas como las células madre neuronales y con capacidad de autorenovarse. Su morfología es parecida a la de las células de la glía radial, poseen un soma triangular con un proceso apical que alcanza la capa de células granulares (Seri *et al.*, 2001). Pueden diferenciarse dos tipos de astrocitos basados en su orientación en la SGZ:

- *Astrocitos radiales (rAs):* poseen un cuerpo celular grande, con forma redondeada, poligonal o triangular, con una fina lámina basal orientada tangencialmente a lo largo de la SGZ y una prolongación radial que crece profundamente en la capa molecular. Este tipo de astrocitos poseen más

orgánulos, poliribosomas y brillantes mitocondrias que el otro subtipo astrocítico (Seri *et al.*, 2004).

- *Astroцитos horizontales (hAs)*: no poseen proyección radial pero extienden su arborización en paralelo a la capa SGZ y unas ramificaciones secundarias hacia el *hilus* y la capa granular. Su cuerpo celular es alargado (Seri *et al.*, 2004).

Ambos subtipos astrocíticos son positivos para el marcador de astrocitos maduros GFAP, para el marcador de astrocitos inmaduros vimentina, y para la proteína musashi que se une al RNA específico de astrocitos (Sakakibara y Okano, 1997). Además existen marcadores específicos de cada subtipo, así los rAs son positivos para la nestina y los hAs para la proteína S-100 β de unión a calcio (Seri *et al.*, 2004).

- **Las células tipo D:** son los precursores intermediarios en la formación de las nuevas neuronas granulares, y provienen de la división de las células As (Fig.4). Las células D aparecen, generalmente, formando grupos de dos a cuatro células del mismo tipo.

Pueden diferenciarse tres subtipos diferentes de células D según su ultraestructura y morfología:

- *Células D₁*: son células pequeñas con forma redondeada, ovoide o de gota invertida. Generalmente no tienen prolongaciones en el plano de la SGZ.

- Células D_2 : posee una prolongación corta, a veces bifurcada. Se diferencian tres clases de células tipo D_2 según la orientación de su proyección respecto a la capa granular: las células D_{2v} , con su proyección orientada verticalmente, las de tipo D_{2h} , cuya proyección es horizontal, es decir, paralela a la capa granular, y por último, las células D_{2i} , con la prolongación invertida respecto a la capa granular, apuntando hacia el *hilus*.
- Células D_3 : poseen una arborización prominente, con una prolongación radial que se extiende a través de GCL hacia la capa molecular (ML), y unas finas proyecciones hacia el *hilus*.

Estas células, renombradas por algunos autores como células progenitoras neuronales amplificadoras (Encinas *et al.*, 2006, Balu *et al.*, 2008), con frecuencia se marcan con BrdU, mostrando su actividad mitótica. De este modo, pueden observarse células marcadas con BrdU, agrupadas a lo largo de la capa SGZ, e incluso, algunos grupos de estas células se encuentran separadas de las células madre que las han originado tras la mitosis (Encinas *et al.*, 2006).

Las células D son positivas para PSA-NCAM (Rao y Shetty, 2004), Doblecortina (DCX) (Encinas y Enikolopov, 2008), la proteína implicada en el crecimiento axonal TUC-4 (de la familia de proteínas “TOAD/Ulip/CRMP”), para el factor de transcripción de la diferenciación neuronal Neuro-D y por último para el gen homeobox Prox -1 que se

expresa en las células granulares del DG en el cerebro postnatal (Seri *et al.*, 2004).

- **Las células tipo G (Neuronas Granulares): estas nuevas neuronas se sitúan en el borde entre SGZ-GCL. Su soma es redondeado, con una arborización dendrítica que crece hacia la capa molecular y su axón se prolonga hasta hacer sinapsis con las células de la región CA3 del Cuerno de Amón.**

Estas células G poseen las características de las neuronas maduras, por tanto raramente se dividen (Kronenberg *et al.*, 2003), eléctricamente activas y capaces de descargar potenciales de acción en respuesta a descargas sinápticas, y de recibir descargas sinápticas tanto inhibitorias como excitatorias. Además son capaces de liberar neurotransmisores en respuesta a los potenciales de acción (Song *et al.*, 2002). Inmunohistoquímicamente este tipo celular es positivo para marcadores como NeuN, Neuro-D y el gen Prox-1 (“protein-coding prospero homebox-1”).

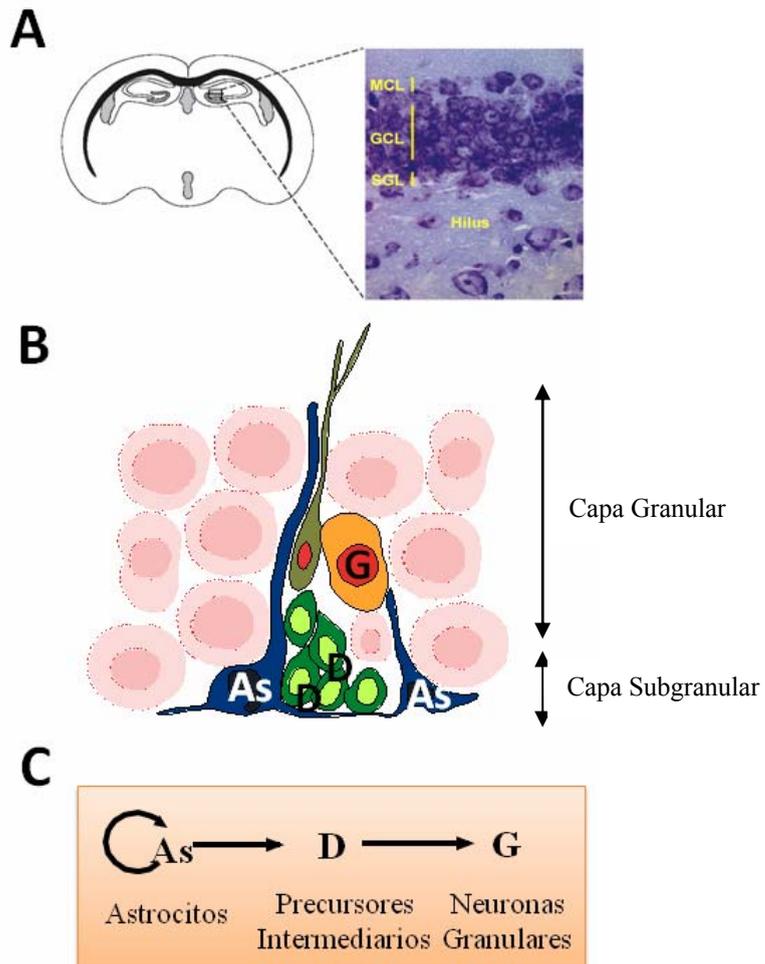


Figura 4. Neurogénesis adulta en la SGZ. (A) Sección coronal de cerebro de roedor adulto, donde se destaca el Hipocampo y se muestra un ampliación de las capas que pueden observarse en el giro dentado (DG). (B) Ampliación de la capa SGZ del DG, donde se muestra la arquitectura de la SGZ. Las células azules corresponden a las células tipo B (astrocitos (As, B), que al dividirse dan lugar a las células progenitoras I (verdes), que maduran dando lugar a nuevas células granulares G (rojas). (C) Estirpe celular de la SGZ (Imagen tomada de Seri *et al.*, 2004).

1.3. PROLIFERACIÓN

En el proceso de neurogénesis pueden diferenciarse varias etapas: la primera sería la proliferación a partir de células progenitoras (citogénesis), en segundo lugar acontece la diferenciación o maduración de las células nacidas a neuronas, proceso que puede ocurrir de forma paralela a su migración, y por último, su integración funcional en circuitos neuronales.

La neurogénesis implica proliferación y diferenciación, que se traduce en la re-entrada y salida de neuroblastos en el ciclo celular. En este sentido, existe un incremento en el número de neuroblastos que salen del ciclo celular y se diferencian durante el desarrollo (Caviness *et al.*, 2000). La diferenciación neuronal es un proceso clave, estrechamente vinculada con el ciclo celular, ya que las células que salen de éste en fases tempranas, exhiben unas determinadas características, mientras que las que salen en las fases tardías exhiben otras (Ohnuma y Harris, 2003). Por ello, debe existir una precisa coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neuronal.

En este trabajo se ha utilizado como marcador de proliferación el BrdU (5'-bromo-2-deoxiuridina), para la fase S del ciclo celular. Este marcador exógeno se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA mientras la célula se está dividiendo. Uno de los problemas que muestra este tipo de marcadores exógenos, es que deben ser inyectados en el animal, y esto puede alterar la división o la diferenciación de las células a estudiar, e incluso, con el uso de drogas la barrera hematoencefálica puede verse

alterada y por tanto, la cantidad de dosis que llegaría a las células estaría modificada (Cameron y McKay, 2001; Kee *et al.*, 2002). La sensibilidad del BrdU depende de la dosis inyectada y de la técnica inmunohistoquímica para detectar el anticuerpo (Cameron y McKay, 2001).

Al contrario que con los marcadores endógenos como el Ki-67 o el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), el BrdU identifica a las células en el momento de la inyección, no cuando se obtiene el tejido. Esta diferencia fundamental nos permite marcar las células y analizarlas tiempo después, cuando la célula marcada durante la división ya está diferenciada y madura a neurona. Esta característica ofrece una clara ventaja al experimentador, puesto que puede controlar el momento en el que se efectúe el marcaje de la célula en proliferación y el tiempo que desea prolongar hasta su análisis, en cambio, un marcador endógeno detectable por inmunohistoquímica, únicamente permite visualizar las células que se están dividiendo en el instante del análisis.

Para reforzar los resultados obtenidos con el BrdU, se usan marcadores endógenos, como el Ki-67, encargado de marcar la expresión de esta proteína durante todas las fases del ciclo celular activas: G₁ tardía, S, G₂ y M, excepto en la fase G₀ y la G₁ temprana (Kee *et al.*, 2002). Ki-67 es el nombre del clon original del anticuerpo que identifica a la proteína asociada al ciclo celular (mKi67) codificada en ratones en el cromosoma 7. Es una proteína que aparece de forma esencial durante la progresión del ciclo celular (Starborg *et al.*, 1996; Endl *et al.*, 2001).

1.4. MIGRACIÓN NEURONAL

La correcta posición de las neuronas es un pre-requisito para su integración funcional en las tareas neuronales. En el DG, las neuronas inmaduras migran una corta distancia desde la capa subgranular a la capa granular (Ming y Song, 2005). Esta incorporación de neuronas en la capa granular se produce durante el desarrollo de manera ordenada, de modo que las células más jóvenes van ocupando regiones más profundas de esta capa. La incorporación de las células granulares resulta en una estratificación respecto al eje lateromedial, en la que las neuronas más maduras, producidas durante el desarrollo, se sitúan lateralmente en relación a la posición de las neuronas jóvenes (Bayer, 1983).

1.5. DIFERENCIACIÓN E INTEGRACIÓN

La diferenciación neural ocurre simultáneamente con la migración celular. Las células postmitóticas en migración, empiezan a desarrollar proyecciones que se extienden hacia las regiones donde establecerán su posición final (Auladell *et al.*, 1995). Las nuevas neuronas, una vez posicionadas en la capa granular, emiten su proyección axonal a lo largo de las fibras musgosas para dar su input a las células piramidales de la zona CA3, aproximadamente después de 4 y 10 días de su división (Hastings y Gould, 1999). Las dendritas de estas nuevas neuronas crecen en la dirección opuesta a los axones, emitiéndose a la capa molecular tras dos semanas, y permanecen creciendo durante meses (van Praag *et al.*, 2002).

Los mecanismos de diferenciación y crecimiento axonal no están aún bien dilucidados, ya que en los mecanismos de diferenciación pueden estar implicadas una gran cantidad de proteínas diferentes. Algunos estudios muestran que la supervivencia de las nuevas células nacidas, está regulada por la actividad de su propio receptor de glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), durante un corto periodo tras su nacimiento (Tashiro *et al.*, 2006), sugiriendo que la supervivencia de las nuevas neuronas y su posterior integración están reguladas por señales internas. De hecho, en la diferenciación neuronal se ha descrito que los neuropéptidos (somatostatina, colecistoquinina, VIP o la sustancia P), los componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágeno), los factores tróficos (NGF, EGF, FGF, IGF,...), los neurotransmisores (serotonina, dopamina o

acetilcolina) y las interacciones con las células gliales, pueden estar estrechamente vinculados con los fenómenos de elongación axónica, migración celular e interconexión celular (Vernadakis y Mangoura, 1988; Ivins y Pittman, 1989; Hatten y Mason, 1990).

Durante la diferenciación en el hipocampo, las células de amplificación transitoria se convierten en neuronas inmaduras (Ming y Song, 2005). Posteriormente, éstas extienden sus proyecciones axonales a lo largo de las fibras musgosas hacia la capa CA3, y envían sus dendritas en la dirección opuesta hacia la capa molecular. (Ming y Song, 2005). Cuando se produce la integración funcional, las nuevas neuronas granulares reciben señales de entrada desde el córtex entorrinal, y las envían a la CA3 y al *hilus*. (Ming y Song, 2005).

La doblecortina (DCX) es uno de los marcadores más empleados para estudiar tanto la migración celular como la maduración, ha sido la doblecortina, se trata de una fosfoproteína asociada al citoesqueleto de microtúbulos, cuya expresión está ligada al crecimiento axonal, sinaptogénesis (Nacher *et al.*, 2001), procesos de extensión dendrítica (Schaar *et al.*, 2004) y al crecimiento de los conos neuronales (Friocourt *et al.*, 2003). Este marcador se utiliza para definir el estadio del desarrollo en el que se encuentran las neuronas, puesto que permite visualizar la morfología de la arborización dendrítica de cada célula marcada. Una clasificación de los estadios del desarrollo neuronal a partir del crecimiento dendrítico marcado con DCX pueden observarse en la Fig.5.

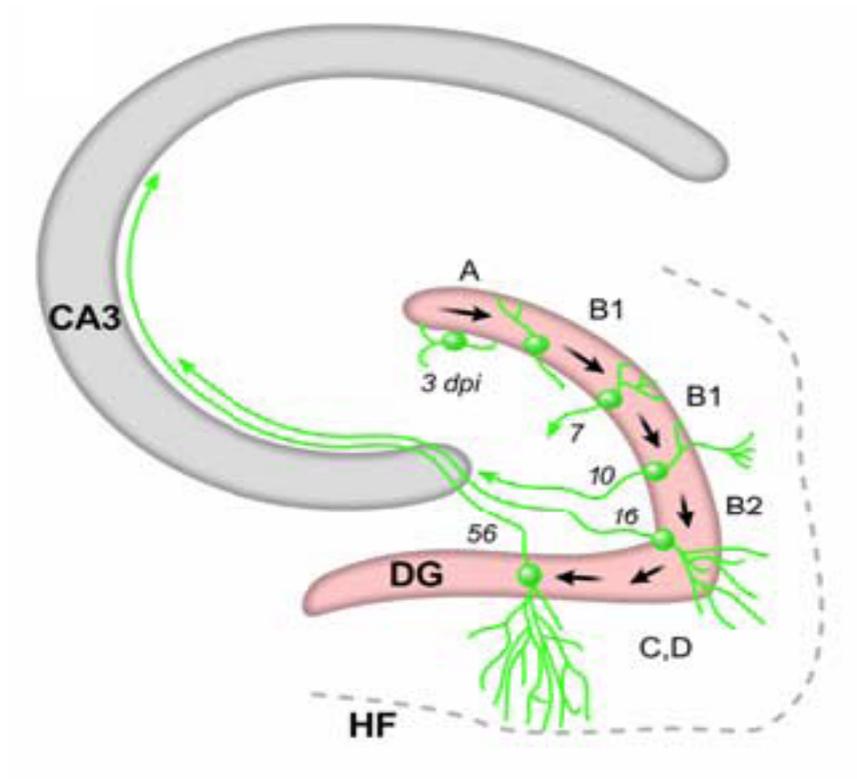


Figura 5. Estadios del crecimiento dendrítico. Se muestra el desarrollo del axón y el crecimiento dendrítico, siguiendo una clasificación temporal, definida por los autores basada en las observaciones hechas a partir del marcador DCX. Etapa A (0-3 días): polarización, migración y crecimiento axonal y dendrítico; Etapa B1 (3-11 días): crecimiento axonal y dendrítico principalmente; Etapa B2 (12-16 días): entrada de los axones a CA3; Etapa C (a partir del día 16): crecimiento de las espinas; Etapa D (a partir del día 56): modificación estructural de las espinas. (Las flechas a lo largo del DG, indican desplazamiento temporal y no espacial) (Imagen de Zhao *et al.*, 2006).

Aunque no está bien caracterizado, es posible trazar el proceso de maduración de las células recién formadas en el DG, mediante la expresión diferencial de marcadores moleculares. De esta manera, la β -tubulina-III, marcará un estadio posterior de maduración al observado en las células que expresen DCX, o el marcador típico de neuronas completamente maduras como es el NeuN, que junto con los marcadores de proliferación nos permitirán caracterizar la población celular existente, diferenciando entre células en proliferación, las que estén en maduración y aquellas que ya han madurado (Fig. 6). Del mismo modo se podrán diferenciar las neuronas de las células de la glía donde estos marcadores no se expresan.

El marcador β -tubulina-III es un isoforma de la tubulina, una de las principales estructuras del citoesqueleto. Concretamente la clase beta-III marca la “minoría neuronal”, isoforma asociado a las neuronas del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico.

El marcador más utilizado para identificar neuronas es el NeuN, que se restringe a neuronas postmitóticas (Fig. 6). Pero unas pocas células de la población neuronal que incluye las células de Purkinje cereberales, las células mitrales del BO y una población de neuronas en el núcleo coclear, son negativas para NeuN. El nombre del marcador NeuN proviene de “neuronal nuclei”, es decir, núcleo neuronal, puesto que la expresión se localiza principalmente en el núcleo, aunque ocasionalmente también marca la zona cercana a éste y algunas neuritas. Se ha observado que el NeuN puede unirse al ADN, lo que sugiere que se trate de un factor de

transcripción que se activa cuando ha terminado la diferenciación (Mullen *et al.*, 1992; Sanat *et al.*, 1998).

Para completar el estudio, se ha empleado un marcador de células gliales, el GFAP (proteína de la glía fibrilar ácida), es un miembro de la familia de las proteínas de filamentos intermedios tipo III. Se expresa de forma específica en los astrocitos (Fig. 6).

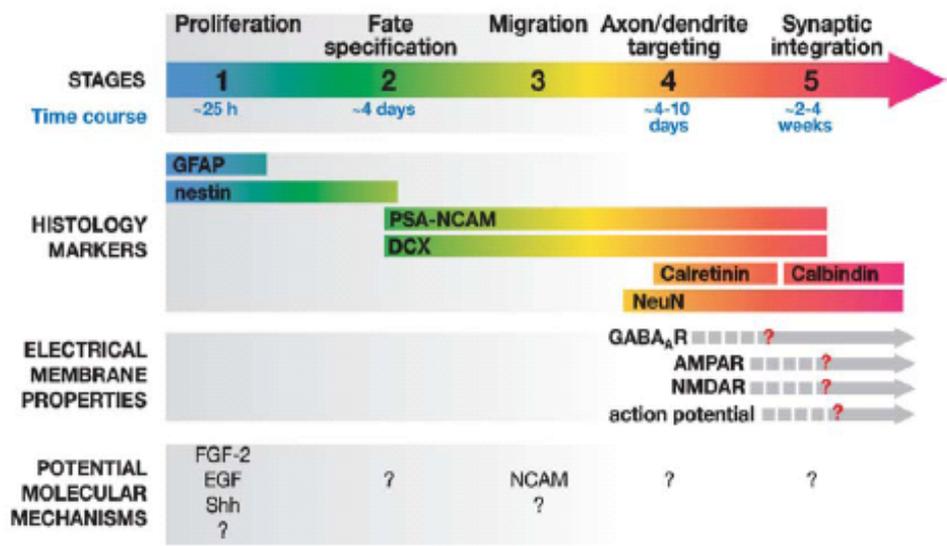
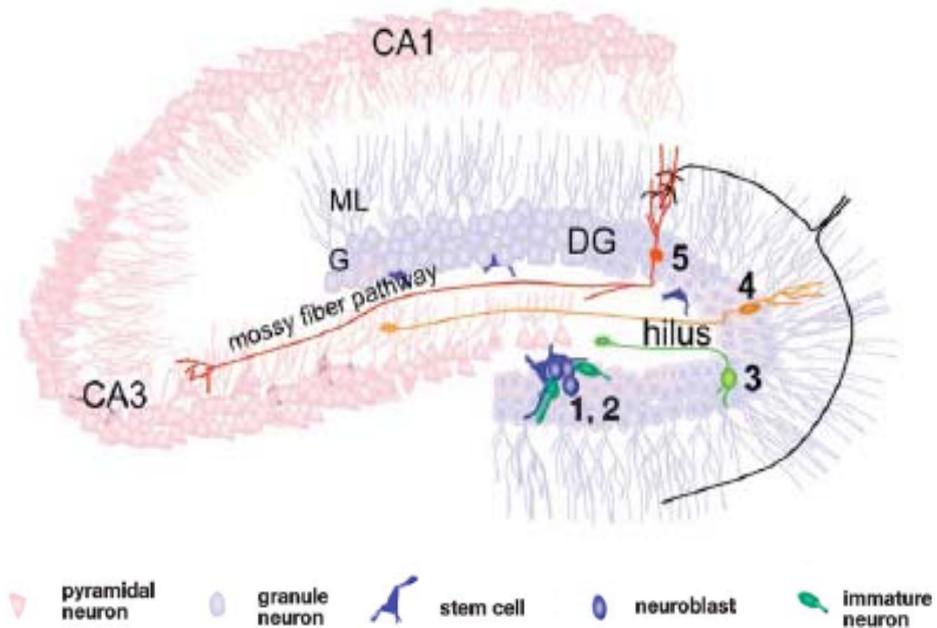


Figura 6. Fases de la neurogénesis y marcadores. Se muestran las fases que siguen las células presentes en el hipocampo durante la neurogénesis. En la fase 1 - proliferación: las células madre (de color azul) con sus cuerpos celulares situados en la capa subgranular del giro dentado emiten sus procesos radiales hacia la capa granular y sus cortos procesos tangenciales se extienden hacia la capa granular y el hilus. Estas células dan lugar a las células amplificadoras transitorias (verde intenso). En la fase 2 – diferenciación: paso en el cual las células amplificadoras se diferencian a neuronas inmaduras (verdes). En la fase 3 – migración: las células inmaduras migran una corta distancia hacia la capa granular. En la fase 4 – emisión del axón y las dendritas: las neuronas inmaduras (naranja) extienden sus proyecciones axonales hacia la vía de las fibras musgosas a las células piramidales de la zona CA3. Además emiten sus dendritas en dirección opuesta, hacia la capa molecular. Por último, en la fase – 5: Integración sináptica: las nuevas neuronas granulares (rojas) reciben señales de entrada de la corteza entorrinal y mandan señales de salida hacia las zonas del CA3 y el hilus. Las características específicas de cada fase se resumen la parte inferior de la figura. Tanto los marcadores histológicos, como las propiedades eléctricas de las membranas en cada fase e incluso los mecanismos moleculares que se potencian en cada etapa. DG: región del giro dentado, ML: capa molecular; GL: capa granular (Imagen tomada de Ming y Song, 2005).

1.6. REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

La neurogénesis adulta es un proceso extremadamente dinámico (Duman *et al.*, 2001, Kemperrmann, 2002), que puede ser regulado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos que afectan a la proliferación, supervivencia, maduración e integración funcional de las neuronas.

La neurogénesis no es un proceso biológico estático, ya que su tasa es variable y es altamente dependiente de los cambios del entorno neuroquímico y ambiental (Peterson, 2002). Estudios recientes han demostrado que la actividad física, los ambientes enriquecidos, la restricción calórica y la modulación de la actividad neural, así como los factores hormonales, los esteroides ováricos y los estrógenos endógenos, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis (Van Praag *et al.*, 1999; Banasr *et al.*, 2001; Mirescu y Gould, 2004; Tanapat *et al.*, 2005). Por el contrario, los animales que viven en condiciones de estrés o de aislamiento, presentan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado, incluso una profunda inhibición (Gould *et al.*, 1997; Tanapat *et al.*, 2001).

La generación de células madre y la diferenciación de las células precursoras son procesos regulados por el microambiente o nicho específico, en el que estas células residen (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

A continuación se detallan algunos de los factores que pueden alterar la neurogénesis, únicamente se explican aquellos que se consideran relevantes en la regulación de la neurogénesis por drogas.

1.6.1. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES

1.6.1.1. GLUTAMATO

La vía de señalización a través de glutamato es activada a través de tres tipos de receptores ionotrópicos: el receptor de NMDA, el receptor de ácido kaínico (KA) y el receptor AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolpropionato⁺) (Balu *et al.*, 2008).

Tras destruir la vía perforante (principal aferencia glutamatérgica al DG), se observa un aumento de la proliferación, por lo que se deduce que el glutamato produce una inhibición de la división celular bajo éstas condiciones, mediado por la activación de receptores de NMDA (Bursztajn *et al.*, 2007).

Sin embargo, también se han identificado situaciones bajo las que el glutamato produce un aumento de la proliferación, mediada por la activación de receptores AMPA (Bai *et al.*, 2003). Del mismo modo, la

estimulación de los receptores KA produce un aumento en la neurogenesis hipocámpica (Parent *et al.*, 1997; Jessberger *et al.*, 2007).

1.6.1.2. DOPAMINA

Las fibras dopaminérgicas procedentes del área tegmental ventral inervan la SGZ. La destrucción selectiva de estas fibras provoca un descenso de la proliferación celular, que se correlaciona con una disminución de células marcadas con PCNA en la capa SGZ (Höglinger *et al.*, 2004).

Otros estudios que nos permiten esclarecer como la dopamina contribuye a la regulación de la neurogénesis son aquellos en los que se administran agonistas o antagonistas de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos. Así pues, tras la administración de un antagonista del receptor D2 no se observa ningún efecto sobre la proliferación (Malbreg *et al.*, 2000). Y la administración de un agonista del receptor D3 aumenta la neurogenesis en la SVZ y el estriado (Van Kampen y Robertson 2004), así como en la sustancia nigra (Van Kampen y Robertson, 2004), pero este receptor no participa en la regulación de la neurogénesis en el hipocampo.

1.6.1.3. SEROTONINA

Los terminales serotoninérgicos provenientes de la zona dorsal y medial del núcleo del rafe inervan a diversas estructuras cerebrales, entre ellas el hilus, la capa molecular y la capa SGZ del giro dentado del hipocampo (Oleskevich *et al.*, 1991).

Algunas investigaciones demuestran que la serotonina produce un aumento de la proliferación en el DG y SVZ adultos, de este modo si se inhibe la síntesis de 5-HT (serotonina) mediante el inhibidor paraclorofenilalanina (PCPA) (Banast *et al.*, 2001), o lesionando de manera selectiva las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (Brezun y Daszuta, 1999), se produce una disminución de células BrdU+ y PSA-NCAM en el DG y SVZ, por lo tanto, disminuyen las células inmaduras del hipocampo.

En la regulación de serotonina pueden participar 15 receptores de serotonina, aunque los mecanismos concretos siguen sin estar del todo dilucidados. De este modo, se sabe que la activación del receptor 5 – HT_{1A}, afecta a la neurogenesis en la zona del DG mediante mecanismos indirectos (Sahay y Hen, 2007). También se ha demostrado que la administración de un antagonista del receptor 5 – HT_{2A}, produce la disminución de la proliferación de las células hipocámpicas (Banast *et al.*, 2004). En cambio el receptor 5 – HT₄ aumenta la proliferación celular en el hipocampo de las ratas tratadas con su agonista (Lucas *et al.*, 2007).

El papel de la serotonina en la regulación neurogénica es complejo, no sólo depende del subtipo de receptor expresado, sino que además participa el estado del organismo, puesto que la serotonina puede inducir factores tróficos y neurotrofinas que a su vez afecten a la regulación neurogénica (Duman y Monteggia, 2006).

1.6.1.4. GABA (ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO)

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, puesto que las proyecciones gabaérgicas inhibitorias son una red local de interneuronas inhibitorias. El DG posee diferentes clases de interneuronas (Freund y Buzsaki, 1996), que modulan la actividad de las células granulares y controlan el nivel de GABA en el ambiente de la SGZ (Ge *et al.*, 2006). Algunos estudios con GABA muestran que la aplicación de este neurotransmisor produce un aumento de la expresión del factor de transcripción NeuroD, que facilita la diferenciación neuronal (Tozuka *et al.*, 2005). En cambio, otro estudio muestra que una inactivación parcial del receptor GABA produce una reducción en la supervivencia celular, aunque la proliferación no se ve afectada.

El mecanismo mediante el cual este neurotransmisor regula la proliferación, diferenciación o supervivencia del hipocampo sigue sin esclarecerse. Existen algunas evidencias que muestran que la activación de GABA es necesaria para la integración sináptica de las células granulares en el hipocampo (Ge *et al.*, 2006).

1.6.1.5. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico es un radical libre sintetizado durante la conversión de L-arginina a la citrulina mediante la óxido-nítrico sintetasa (NOS), que actúa como neurotransmisor / neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC) (Snyder y Ferris, 2000). Pueden encontrarse tres isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS, NOS-I), NOS inducible (i NOS, NOS-II), y la NOS endotelial (eNOS, NOS-III).

La inhibición de la isoforma NOS-I, tanto con inhibidores (Packer *et al.*, 2003), como mediante el uso de animales modificados genéticamente (Packer *et al.*, 2003), causa un aumento de la proliferación celular en el hipocampo, aunque la supervivencia no se ve alterada.

El NO (óxido nítrico) producido por la glía activada o por los astrocitos en respuesta a ROS (especies reactivas de oxígeno), actúa como mediador en la neurodegeneración y activa procesos inflamatorios. El aumento excesivo de NO y ROS, inhibe la respiración mitocondrial en las neuronas que están alrededor, provocando la liberación de glutamato (a través del transportador de glutamato GluT), proveniente de las neuronas (y de los astrocitos en menor medida), estimulando a los receptores NMDA (NMDAR). La activación de estos receptores dispara la entrada masiva de Ca^{+2} a las neuronas, llevando a las células a muerte necrótica o apoptótica.

1.6.2. FACTORES TRÓFICOS

Los factores de crecimiento o tróficos (FGF, EGF, CNTF, IGF,...), implicados en guiar el destino celular, pueden determinar el tamaño de una población neuronal o glial (Kuhn *et al.*, 1997; Pencea *et al.*, 2001). Asimismo, estos factores se encuentran sobre-expresados en distintos modelos neurodegenerativos, en los cuáles pueden actuar como factores protectores del daño neural, pero también como factores inductores de la generación y diferenciación de nuevas células que replazarían las células lesionadas (Kuhn *et al.*, 1997; Kuhn *et al.*, 2001; Aberg *et al.*, 2000; Pencea *et al.*, 2001). Por tanto, en la secuencia de una lesión o daño neural, se activan los programas del desarrollo en el sentido de minimizar el daño ocasionado (Kozorovitskiy y Gould, 2003).

Algunos de los factores tróficos que afectan a la neurogénesis del hipocampo se detallan a continuación. La administración del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), en ratas, produce un aumento neurogénico (Rai *et al.*, 2007), en cambio en ratones que no poseen el receptor mayoritario para FGF-2 se muestran déficits en la neurogénesis hipocámpica (Zhao *et al.*, 2007). Además, en ratones con disminución de FGF-2, se previene el aumento de tamaño del cerebro que aparece tras la isquemia, aunque se mantiene la línea basal de neurogénesis (Yoshimura *et al.*, 2001).

El factor de crecimiento de insulina (IGF-1), es un potente regulador de la neurogénesis hipocámpica, observándose un aumento proliferativo tras su

infusión (Aberg *et al.*, 2000; 2003). Además, en ratones modificados genéticamente para que posean bajos niveles de éste factor, se observa una reducción en la neurogénesis del hipocampo adulto (Trejo *et al.*, 2008).

Por último, para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), además de su papel como regulador de la angiogénesis, actúa como potente regulador neurogénico, de modo que una infusión de este factor produce un aumento proliferativo (Jin *et al.*, 2001), y según otros estudios, también actúa como factor promotor de la supervivencia (Schanzer *et al.*, 2004).

1.6.3. REGULACIÓN POR CÉLULAS GLIALES

Los astrocitos, además de ser las células madre descritas tanto en la zona de la SVZ como en el DG, juegan un papel muy importante como sensores a los cambios extracelulares del microambiente, y pueden regular la neurogénesis mediante la secreción de señales locales (Song *et al.*, 2002). Estas señales aún son desconocidas, aunque se apunta la posibilidad de que algunas sean flujos iónicos (Berridge, 1995), neuroesteroides (Zwain y Yen, 1999), neurotransmisores (Scemes, 2000), factores de crecimiento (Spranger *et al.*, 1990) y metabolitos glutamatérgicos (Laming *et al.*, 2000).

1.6.4. REGULACIÓN POR MUERTE CELULAR

Tanto durante el desarrollo, como durante la neurogénesis adulta, se produce un número de células que excede por mucho el número final de las células finales que serán incorporadas a la estructura. De ellas, las que no son necesarias son eliminadas por apoptosis (Biebl *et al.*, 2000) .

Probablemente, el equilibrio entre la neurogénesis y la muerte celular, sea deba a la necesidad de recuperar la homeostasis en el cerebro adulto. Esta hipótesis está basada en la observación de que en las zonas neurogénicas, la muerte celular sirva de señal para aumentar la neurogénesis, algunos hechos avalan este argumento:

- a) Durante el desarrollo existe un balance entre las células granulares nacidas y muertas (Gould *et al.*, 1991),
- b) Lesiones mecánicas, aspiración y transección, estimulan la proliferación de precursores neuronales en el SGZ y /o la SVZ, (Gould y Tanapat, 1997, Johansson *et al.*, 1999, Jin *et al.*, 2001, Lang *et al.*, 2004).
- c) La proliferación en la SVZ, se activa tras condiciones de inflamación (Calza *et al.*, 1998),
- d) Adrenalectomías, daños límbicos e isquemias, promueven tanto la muerte celular como la división celular,
- e) La degeneración apoptótica de neuronas corticotalámicas inducen la diferenciación de los precursores neuronales en regiones de la corteza (Magavi *et al.*, 2000).

En resumen, podemos decir que la pérdida de células produce la secreción de factores estimulantes de la división celular.

1.6.5. CONDICIONES DE ESTRÉS

Se han encontrado efectos contradictorios en cuanto a la regulación de la neurogénesis hipocámpica mediada por estrés, en los que una exposición puntual a estrés produce una disminución en la proliferación celular total (Gould *et al.*, 1998), en cambio una exposición más prolongada a bajos niveles de estrés, produce efectos positivos en la neurogénesis (Gould *et al.*, 1997), por último, altos niveles de estrés causan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado o, incluso una inhibición total (Tanapat *et al.*, 2001). Por tanto, la relación entre la exposición al estrés y los niveles de neurogénesis seguiría una pauta de U invertida.

Alteraciones en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, inducidas por situaciones persistentes de estrés durante el desarrollo, pueden conducir a una bajada permanente en la producción de nuevas células en el giro dentado (Lemaire *et al.*, 2000). Además, la proliferación celular en el giro dentado es disminuida por los glucocorticoides, los cuáles son liberados en respuesta al estrés (Tanapat *et al.*, 2001).

1.6.6. AGENTES ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación. Como antioxidantes se incluyen sistemas enzimáticos como las enzimas derivadas del sistema citocromo-oxidasa, las superóxidodismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas y peroxidasas como la glutatión-peroxidasa y la glutatión-reductasa. Así como sistemas no enzimáticos, como las vitaminas A, C, E, Ácido úrico, aminoácidos como, glicina y taurina, y el tripéptido glutatión, etc. que eliminan los radicales libres, evitando la reacción en cadena mediante la cual un radical libre menos reactivo y todavía inestable, reacciona con otra molécula para producir otro radical libre más reactivo.

Estos antioxidantes reaccionan con los radicales libres formados al inicio de la reacción en cadena, de modo que consiguen detenerla. De este modo, este tipo de antioxidantes pueden definirse como aquellas sustancias que ceden electrones a otras, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas, de modo que impiden que progrese la reacción.

1.7. NEUROGÉNESIS, HIPOCAMPO Y MEMORIA

Existen diferentes sistemas de memoria:

1. Uno es para el aprendizaje flexible y declarativo de estímulos, dependiente del lóbulo temporal medial.
2. Otro incluye el sistema de aprendizaje de hábitos o aprendizaje estímulo-respuesta y depende sobre todo del estriado.
3. Y el otro es para la memoria emocional y aprendizaje estímulo-refuerzo, el cual se centra principalmente en la amígdala.
4. El hipocampo, el estriado y la amígdala parecen ser las estructuras más importantes para cada tipo de memoria, si bien forman parte de sistemas más amplios formados por más estructuras (Tabla 1).

Memoria declarativa	Memoria procedimental	Memoria emocional
- Episódica y semántica.	- Reforzada.	- Condicionada.
- Recuerdo consciente.	- Selección de respuesta.	- Preferencias y aversiones.
- Expresión flexible.		
Hipocampo y región parahipocámpica.	Estriado, cerebelo, tronco del encéfalo y médula espinal.	Amígdala, Hipotálamo, sistema nervioso autónomo y endocrino.

Tabla 1. Principales sistemas de memoria. En la tabla se muestra una clasificación de los tipos de memorias, junto con sus principales características y estructuras asociadas a las mismas.

La participación del hipocampo en la formación de la memoria ha sido ampliamente reconocida (O'Keefe y Nadel, 1978), y numerosas evidencias sugieren que la producción de neuronas nacidas durante la etapa adulta del animal puede contribuir en los procesos de memoria. En primer lugar, el nivel de neurogénesis está directamente relacionado con el aprendizaje de tareas dependientes de hipocampo (Drapeau *et al.*, 2003). En segundo lugar, las condiciones del aumento de la memoria producen un incremento en la neurogénesis, mientras que condiciones de disminución de la neurogénesis perjudican el aprendizaje (Kempermann *et al.*, 1997, van Praag *et al.*, 1999). En tercer lugar, el aprendizaje espacial ha sido demostrado que aumenta tanto la supervivencia de las nuevas neuronas (Gould *et al.*, 1999) como la proliferación celular (Shors *et al.*, 2001; Döbrössy *et al.*, 2003). Por el contrario, se ha demostrado que el aprendizaje espacial en un laberinto acuático está relacionado con una disminución en el número de nuevas neuronas en el DG (Döbrössy *et al.*, 2003; Ambrogini *et al.*, 2004). Aún más sorprendente resulta el hecho de que la disminución en la neurogénesis se vea correlacionada con las habilidades espaciales, de modo que, ratas con un bajo número de nuevas neuronas tengan mejores rendimientos en tareas de memoria, hecho que indica que el aprendizaje, y no el entrenamiento, disminuye el número de nuevas células adultas.

Este complejo entramado de resultados crea un puzle en el que aumentos y disminuciones en el número de nuevas neuronas están relacionados con el aprendizaje, mediante un mecanismo todavía desconocido. En esta tesis doctoral no se pretende esclarecer estas discrepancias, sino que se pretende

analizar los efectos causados conductuales de animales tratados con tolueno, tal y como ya ha sido publicado anteriormente por otros autores (Bowen *et al.*, 2006, Bowen *et al.*, 2007). Y además, establecer aproximaciones entre los resultados conductuales obtenidos y las alteraciones producidas sobre la neurogénesis tras la administración del tolueno.

1.7.1. NEUROGÉNESIS Y MEMORIA

Existen pruebas, tanto a favor como en contra, de la existencia de una relación directa entre la neurogénesis y la memoria. Algunas pruebas a favor, son los estudios que relacionan numerosas drogas con la disminución de la neurogénesis, como el caso del alcohol, la nicotina y los opiáceos (Eisch *et al.*, 2000, Abrous *et al.*, 2002, Nixon and Crews, 2002), y todas ellas, administradas en las dosis adecuadas, pueden llegar a producir déficits en las tareas de aprendizaje (Spain y Newsom, 1991, Matthews y Silvers, 2004; Scerri *et al.*, 2005). También confirman la hipótesis de la relación entre la neurogénesis y la memoria, los estudios relacionados con cambios complejos en el ambiente, como el aumento que se produce en el número de neuronas inmaduras tras un aumento de estrógeno en el medio (Tanapat *et al.*, 1999), o el ejercicio físico (van Praag *et al.*, 1999), pueden causar un aumento en las tareas de aprendizaje dependientes de hipocampo (Daniel *et al.*, 1994, Kempermann *et al.*, 1997; Luine *et al.*, 1998; van Praag *et al.*, 1999, Leuner *et al.*, 2004).

Algunas de las pruebas en contra de establecer una relación entre la neurogénesis y la memoria, son los estudios en los que tras un aumento de glucocorticoides, del estrés o de la edad puede producir una disminución de la proliferación celular, que pueda resultar o no en déficits en tareas dependientes del hipocampo (Bizon and Gallagher, 2003). De hecho, la exposición al estrés puede aumentar el aprendizaje de las tareas hipocámpicas (Wood *et al.*, 2001; Leuner *et al.*, 2004), por lo que se establece una relación inversa entre el aprendizaje y la neurogénesis.

Una de las pruebas más claras acerca la conexión directa entre el nacimiento de nuevas neuronas y la capacidad de memoria en mamíferos, fue el estudio realizado por Shors y su equipo en 2001, en los que se bloqueó la neurogénesis en el hipocampo de ratas (Shors *et al.*, 2001). Para ello, administraron a los animales una sustancia, el metilazoximetanol (MAM) que resulta tóxica para las células en proliferación. Con este estudio pudieron concluir que, la incorporación de nuevas neuronas al hipocampo y la renovación de circuitos neuronales en dicha zona son necesarias para el desarrollo de determinados tipos de memoria, en concreto los que implican el recuerdo del orden en que se producen determinados acontecimientos.

De este modo, los resultados confirmaron que neurogénesis y memoria están relacionadas en el cerebro de mamíferos. Y se observó que las nuevas neuronas que van siendo incorporadas al hipocampo, podrían contribuir a procesos de formación de memoria en los que hay implicados elementos temporales (Shors *et al.*, 2001).

1.7.2. HIPOCAMPO Y MEMORIA

El hipocampo y otras estructuras del lóbulo temporal medial, que conjuntamente forman el sistema hipocámpico, poseen un papel crítico en la memoria declarativa y, especialmente, en la consolidación a largo plazo de la memoria, tanto de la memoria espacial como la no que no lo es (Morris *et al.*, 2003; Poldrack and Packard, 2003). El sistema hipocámpico parece necesario sólo durante un periodo limitado de tiempo, mientras se consolida la información, pero no parece necesario para la recuperación de memorias muy remotas. Del mismo modo, el hipocampo es la diana primaria del SNC de las hormonas relacionadas con el estrés (De Kloet *et al.*, 1999; McEwen, 1999).

La plasticidad de los circuitos hipocámpico, es esencial para el desarrollo de su función en el aprendizaje y la memoria, pudiendo aumentar su vulnerabilidad a varios estímulos, incluyendo el estrés (McEwen, 1999). En el caso de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo, sus conexiones tanto aferentes como eferentes, son las que permiten la supervivencia de estas células debido a los estímulos que se generan durante el aprendizaje (Dupret *et al.*, 2005). De hecho, el aumento de la actividad sináptica produce a su vez, un aumento en la supervivencia celular (Bruel-Jungerman *et al.*, 2006). Por el contrario, se produce una muerte de las neuronas inmaduras, de manera selectiva, de aquellas que no hayan establecido las conexiones adecuadas durante el aprendizaje. La supresión de este tipo celular, permite la integración de las neuronas con mayor estadio de

maduración que se han establecido por estímulos dependientes de la actividad generada durante el curso del aprendizaje.

1.8. EFECTO DE LAS DROGAS SOBRE LA NEUROGÉNESIS

El efecto de las drogas de abuso sobre la neurogénesis adulta, ha sido extensamente documentado (Crews y Nixon, 2003; Eisch y Harburg, 2006, Nixon, 2006). Aunque la variedad en los tratamientos dificultan en ocasiones la comparación entre estudios, los resultados encontrados muestran claramente los efectos de las drogas sobre la neurogénesis. Estas alteraciones observadas en la neurogénesis, pueden afectar a la citogénesis, supervivencia, maduración o diferenciación de los precursores neuronales, dependiendo de la droga y del régimen de administración.

Centraremos el estudio del efecto sobre la neurogénesis en las siguientes drogas: alcohol, amfetamina y sus derivados, opioides, nicotina, y cannabis. En el siguiente apartado se estudiará con más detalle el efecto de la cocaína y de los solventes orgánicos (principalmente del tolueno).

1.8.1. ALCOHOL

El etanol es un depresivo del SNC, que puede alterar algunas funciones cognitivas, como la memoria y el aprendizaje, de forma dependiente de dosis. El etanol actúa disolviendo las membranas lipídicas, de ese modo altera la función de los canales iónicos y de las proteínas insertadas en ella. Así pues, el etanol puede inhibir los canales iónicos de glutamato activos

(que son excitatorios) o bien, inhibe los canales iónicos de GABA activos (que son inhibitorios) (Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*. Ninth edition. (1996) Chapter 17).

Algunos estudios del efecto del etanol sobre la neurogénesis usan tres formas de administración diferentes: una dieta alcohólica, la inyección intraperitoneal o la infusión intragástrica. Sin embargo, los resultados son coincidentes y únicamente se muestran diferentes efectos sobre la neurogénesis bajo una administración crónica y aguda de alcohol.

En estudios que intentaban simular una exposición corta de fin de semana en ratas adolescentes, se encontró que este tipo de dosis aguda inhibía la proliferación celular en el DG (Crews *et al.*, 2006). Del mismo modo que alteraba el aprendizaje, el estado afectivo y otras conductas que se producen durante la maduración del cerebro adolescente en desarrollo.

Analizando los efectos de una exposición crónica del alcohol, se observó que esta dosis causaba daños en las tres etapas de la neurogénesis hipocámpica: la proliferación, la supervivencia y la maduración (He *et al.*, 2005). Este estudio demostró que la administración crónica de alcohol aumentaba la arborización dendrítica, incluyendo el número de nódulos dendríticos, la longitud y el número total de las dendritas de las neuronas marcadas con doblecortina (He *et al.*, 2005).

También se ha analizado cuáles son los efectos que pueden aparecer tras la exposición al etanol, es decir, durante la abstinencia. De este modo,

Nixon y Crews demostraron que un tratamiento crónico de etanol altera la neurogénesis en el hipocampo de la rata adulta, incluso semanas después del cese del tratamiento, y además observaron un aumento de la neurogénesis durante los periodos de abstinencia, tras la dependencia del alcohol (Nixon y Crews, 2004). Una posible explicación neuroquímica puede ser que la muerte celular causada por el alcohol, regule la neurogénesis y produzca un aumento en el DG, corteza entorrinal y áreas corticales (Collins *et al.*, 1996; Crews *et al.*, 2000). Por lo que podríamos concluir, que el aumento de la neurogénesis durante las etapas de abstinencia sería mediante un mecanismo compensatorio a la muerte celular producida por el etanol (Nixon y Crews, 2004).

1.8.2. ANFETAMINA Y EL MDMA (3,4-METILENEDIOXIMETAMFETAMINA)

Existen trabajos con m-anfetamina que muestran diferentes efectos sobre la proliferación, ya que los protocolos de inyección de BrdU se realizan en diferentes momentos. Con una inyección de m-anfetamina (25 mg/kg i.p.) y un pulso de BrdU (30mg/kg), suministrado 36 horas después de la droga, la proliferación no se mostró alterada (Teuchert-Noodt *et al.*, 2000). En cambio, cuando la droga y el BrdU se administraron al mismo tiempo se observó un descenso en el nivel de células BrdU+ (Teuchert-Noodt *et al.*,

2000), que corroboraba el descenso proliferativo encontrado por Hildebrandt *et al.*, 1999 tras inyectar el doble de dosis de m-anfetamina (50mg/kg, i.p.) con un marcaje de BrdU después de la droga.

Por último, se han publicado datos analizando el efecto de un tratamiento de MDMA (3,4-metilenedioximetamfetamina o éxtasis) durante 48 horas sobre la neurogénesis, que muestran un déficit en la supervivencia celular, aunque no en la proliferación ni en la maduración neuronal en el DG adulto de rata (Hernández-Rabaza *et al.*, 2006). Esta fue la primera demostración de que una administración aguda de MDMA produce efectos deletéreos sobre la neurogénesis adulta, causando un defecto sobre la supervivencia de las células nacidas durante el tratamiento, aunque no afecta a la proliferación de las células precursoras. Estos resultados sugieren que el MDMA es neurotóxico para la población de células amplificadoras del DG pero no para las células progenitoras (tipo As).

1.8.3. OPIOIDES

En el sistema nervioso central existen tres familias diferentes de péptidos, que se han identificado como opioides endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Y cada familia deriva de diferentes precursores polipeptídicos. Estos opioides se unen a tres clases de receptores de opioides: μ , δ y κ , que pueden activarse por algunas sustancias semisintéticas como: morfina, heroína y metadona (Goodman and Gildman's The pharmacological basis

of therapeutics”. Ninth edition. 1996. Chapter 23). La actividad del sistema opioide está ampliamente estudiada por su efecto analgésico. Sin embargo, durante las últimas décadas, se ha demostrado que el sistema opioide juega un papel importante en la regulación de la proliferación y la maduración del sistema nervioso central de la rata, tanto *in vivo* como *in vitro*.

El equipo de Nestler (Nestler, 2000) describió que durante una exposición a largo plazo de opioides puede inhibir la neurogénesis en el hipocampo de rata adulta. Demostraron que la administración forzosa de morfina crónica (75 mg/kg, durante 5 días), pero no la aguda (10 mg/kg), disminuye el nivel de células marcadas con BrdU en la SGZ del hipocampo. Por tanto estos autores concluyen que la administración de morfina crónica produce una reducción de un 30% de las células nacidas.

Aunque la mayoría de estudios se han realizado con morfina, existen datos del efecto de la auto-administración crónica de heroína (60 mg/Kg, 6 h/día, durante 26 días) estos trabajos mostraron una disminución en la proliferación celular, medida dos horas después de la inyección con BrdU (100 mg/kg, i.p., el día 18) (Eisch *et al.*, 2006).

1.8.4. NICOTINA

La nicotina es una droga extensamente consumida, que actúa sobre la unión neuromuscular, los ganglios autónomos y algunas partes del sistema nervioso central. La nicotina tiene acciones estimulantes y depresivas, además de aumentar la dopamina extracelular en el *núcleo accumbens* (NAcc) y afectar a la liberación de opioides endógenos y glucocorticoides (Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*. Ninth edition. 1996. Chapter 9, 24).

Abrous y colaboradores (Abrous *et al.*, 2002) estudiaron los cambios en procesos de plasticidad del DG de ratas bajo la auto-administración de nicotina y encontraron un defecto en la proliferación celular, basado en la disminución de células marcadas con BrdU. Del mismo modo, Scerri y su equipo (Scerri *et al.*, 2006) con un tratamiento más crónico, empleando una infusión constante de nicotina, observaron que se producía una disminución en la proliferación celular.

Los efectos observados en la supervivencia y en la migración, fueron más uniformes. De este modo, los experimentos de Abrous (Abrous *et al.*, 2002) mostraron una disminución en las células marcadas con PSA-NCAM, concluyendo que existían efectos tanto en la supervivencia como en la migración neuronal. Posteriormente, estos resultados fueron verificados por Shingo y Kito (Shingo y Kito, 2005), quienes también encontraron un aumento en la muerte celular medida como cantidad de células picnóticas.

1.8.5. CANNABIS

El cannabis es una planta cultivada por su posible uso medicinal y sus propiedades psicoactivas. El humo del cannabis contiene algunos agentes químicos, pueden identificarse 61 cannabinoides diferentes. Entre ellos, el Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC), que es el principal componente activo de la marihuana y produce la mayoría de sus efectos (Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. 1996. Chapter 24).

En la última década los estudios relacionados con el sistema endocanabinoide se han basado en la búsqueda de ligandos, clonación de receptores y descripción de los mecanismos de síntesis. Sin embargo, se conoce poco sobre el papel del sistema endocanabinoide y la neurogénesis, hasta el trabajo de Rueda y su equipo (Rueda *et al.*, 2002), cuyos resultados obtenidos *in vitro* demostraron que los cannabinoides disminuían la capacidad de diferenciarse de las neuronas nacidas durante el tratamiento, puesto que no encontraron diferencias en el número de células totales BrdU+, pero sí encontraron un aumento de células NeuN negativas en las células que acababan de nacer (Rueda *et al.*, 2002).

Estudios con THC en administraciones agudas (1, 3, 10, 30 mg/kg, i.p.), secuenciales (2 inyecciones de 10 o 30 mg/kg, i.p., separadas por 5 h), o crónicas (20 a 80 mg/kg, p.o., durante 3 semanas), no mostraron ningún efecto en la proliferación celular en el DG de ratones machos adultos (Kochman *et al.*, 2006). Además la estudios *in vitro* demostraron que la

administración de esta droga facilita la diferenciación de la astrogliá, actuando sobre las células progenitoras neuronales (Aguado *et al.*, 2006).

Los efectos de la cocaína y de los solventes orgánicos (se estudiará con detalle el tolueno), sobre el sistema nervioso, serán abordados con detalle a continuación, puesto que se detallarán los aspectos más relevantes de estas dos drogas.

1.9. DROGAS ESTIMULANTES: LA COCAÍNA

1.9.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN

La cocaína (benzoil-metil-ecgonina, $C_{17}H_{21}NO_4$, Fig.7) es el alcaloide activo del arbusto *Erythroxylum coca* (Fig. 8) originaria de las montañas de Perú, Bolivia, Colombia y Chile.

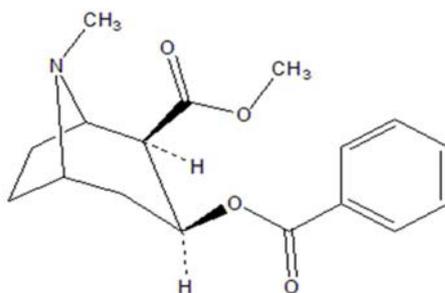


Figura 7. Estructura de la cocaína. Vista en dos dimensiones.

Durante el imperio Inca se usaba como forma de pago por el trabajo en el campo, ya que las hojas de coca proporcionaban una sensación de fuerza, combatían la fatiga y mitigaban el apetito. Albert Niemann identificó la cocaína como la sustancia activa de las hojas de coca en la década de 1850. Carl Koller y William Halsted demostraron sus propiedades como anestésico local, hecho que sentó las bases de la anestesia por bloqueo nervioso en el campo de la cirugía. Hacia 1880 la cocaína era un ingrediente

activo de numerosos vinos (vino Mariani), y jarabes tonificantes. También formaba parte de la bebida Coca-cola a finales del siglo XIX (En 1901, la eliminaron de su composición). Debido a sus efectos euforizantes, su uso como droga se ha extendido rápidamente, alcanzado en las últimas décadas, elevadas proporciones en Estados Unidos y otros países occidentales.



Figura 8. Hoja de la cocaína. La cocaína es un alcaloide contenido en grandes cantidades (0.6 a 1.8%), en las hojas de *Erythroxylum coca*, un arbusto que crece en las montañas de los Andes, entre los 1000 - 3000 metros por encima del nivel del mar

1.9.2. FORMAS DE COCAÍNA

Se puede encontrar para el consumo como: Clorhidrato de cocaína y en forma de Base libre (“Freebase”).

El **Clorhidrato de cocaína**, se trata de una solución hidrosoluble de cocaína que se obtiene al disolver el extracto alcaloide de la planta *Erythroxylon coca* en ácido hidrocloreídrico, dando lugar a un polvo blanco cristalino. Este polvo se absorbe fácilmente a través de las membranas mucosas, por tanto la aspiración intranasal es la ruta más frecuente de administración. El polvo también puede disolverse en agua para poder inyectarse de forma intravenosa, de este modo pasa directamente a la sangre. La cocaína es inactivada por el pH gástrico y se absorbe mal por la ruta gastrointestinal (Warner, 1993, 1995).

El **“Freebase” o base libre**, se hizo popular en la década de los 80. La cocaína base se obtiene al mezclar polvo de cocaína (clorhidrato) con una base (Amoniaco o soda) y un solvente (éter o agua), con el fin de eliminar el ácido clorhídrico. Esta mezcla se calienta, de modo que la base alcaloide precipita formando una pasta que se endurece, y que a diferencia del clorhidrato de cocaína, es más estable al calor y permite ser fumada, produciéndose su absorción a través de la mucosa nasal (inhalación). El termino anglosajón "crack" procede de los chasquidos o crujidos producidos por los cristales de cocaína al calentarse puesto que también se fuma.

La cocaína se disuelve en el alcohol, produciéndose una transesterificación: pasando de ser cocaína a etileno de cocaína, este compuesto produce un efecto más largo y más tóxico que cuando se usa la droga por sí sola.

También se ha usado junto con la heroína, denominándose el compuesto comúnmente “speedball”, esto combina un inicial “high” o euforia de la coca y después el “rush” que causa la heroína, es una entrada en un sueño placentero.

1.9.3. METABOLISMO DE LA COCAÍNA

1.9.3.1. FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética de la cocaína depende de la ruta de administración. En la Tabla 2, se observa que en las tres vías de administración utilizadas (intravenosa, intranasal, o por inhalación), la cocaína se absorbe rápidamente y en pocos minutos alcanza su pico máximo de efecto (Schneider, 1991).

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	INICIO DE LA ACCIÓN (seg)	PICO (min)	DURACIÓN (min)
Intravenosa	15	3-5	30-40
Intranasal	300	15-30	60-90
Inhalada (fumada)	10	1-3	15-30

Tabla 2. Farmacocinética de la cocaína respecto a la vía de administración. En la tabla se muestran tres variables: el momento en el que se inicia el efecto de la acción de la droga, el pico de mayor efecto y la duración de la sensación que la droga produce, clasificadas según la vía de administración de la cocaína.

La vida media de la cocaína en el plasma es de 40-90 minutos, la excreción urinaria de cocaína no modificada representa una pequeña cantidad del total eliminado (1%). En una determinación de tóxicos en orina, la cocaína es detectada principalmente a través de sus metabolitos, que son excretados en el transcurso de varios días. El análisis del cabello es un método muy sensible que permite detectar su consumo en las semanas o meses previos o meses posteriores (Ness *et al.*, 1999).

1.9.3.2. FARMACODINÁMICA

Las drogas adictivas presentan una gran diversidad molecular y actúan sobre diversos receptores y estructuras, aunque existe un factor común en ellas, que es la activación de la vía mesolímbica dopaminérgica, que juega un papel crucial en el proceso de dependencia y adicción (Leshner, 1997; Melichar *et al.*, 2001). Esta vía nace en el área tegmental ventral (ATV), y su activación durante el consumo agudo induce el incremento en la tasa de liberación de dopamina (DA) y una regulación al alza en los niveles de AMPc en el *núcleo accumbens* y la amígdala extendida, áreas que se relacionan decisivamente con la recompensa y con el aprendizaje para el consumo (Nestler y Aghajanian, 1997; Wise, 2000).

Así los psicoestimulantes, como la cocaína, cuando llegan al cerebro estimulan estos centros de recompensa, mediante un incremento directo de la liberación de DA en dicha vía, a través de la inhibición del transportador de dopamina (Iversen, 2000), este hecho contribuye a una rápida elevación de las cantidades de DA en la hendidura sináptica de dichos centros, modificando el metabolismo de las neuronas.

El proceso normal de la neurona es la secreción de DA dentro de la sinapsis, que se liga con los receptores de DA en la neurona postsináptica, y le envía una señal estimuladora. En dicho proceso bajo la ingesta de cocaína, se produce un bloqueo del receptor de DA encargado de la eliminación de este neurotransmisor de la hendidura sináptica, lo que produce su acumulación, además de mantenerse una estimulación continua

en las neuronas receptoras bloqueadas, con la consecuente sensación eufórica que este hecho conlleva (Fig. 9).

Se ha demostrado que en la región postsináptica se induce la producción de AMPc y modifica la sinapsis proteica, elevando las frecuencias de los impulsos nerviosos en estas zonas.

Además del aumento de los niveles de DA al tomar la cocaína no es único, sino que también se ha observado el aumento de los niveles de Serotonina y Noradrenalina.

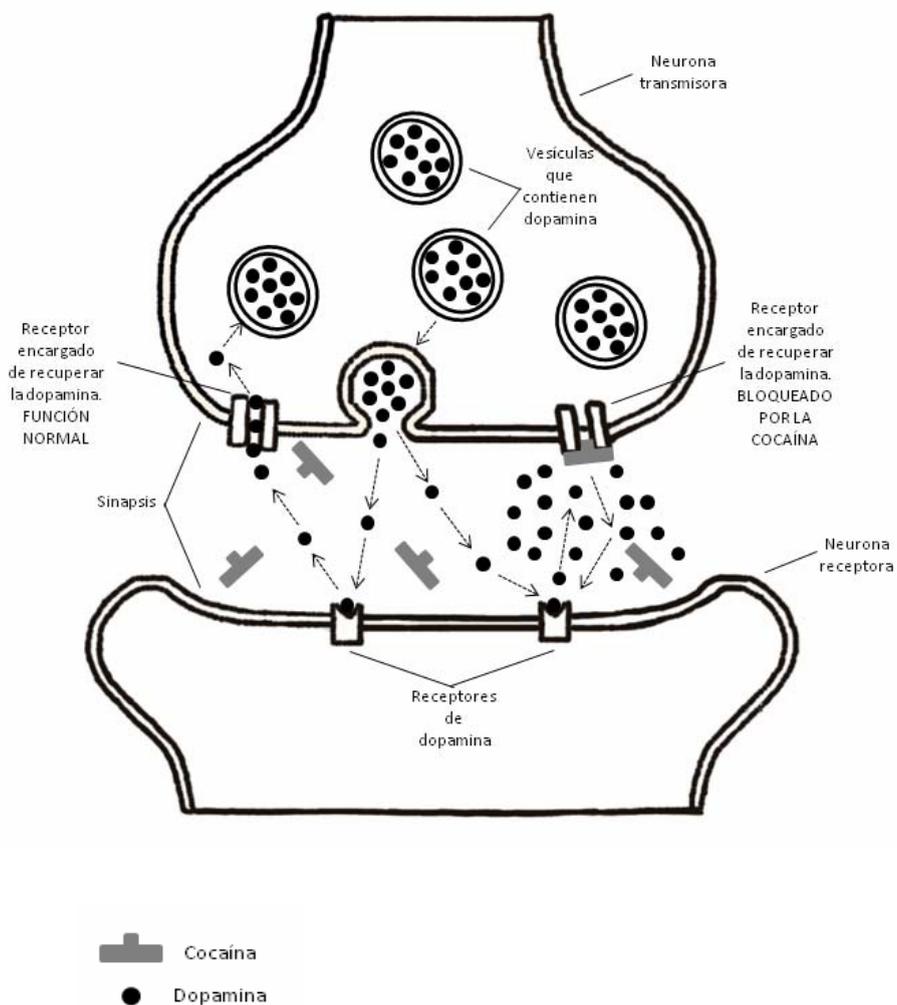


Figura 9. Bloqueo del receptor de DA por la cocaína. La cocaína se une al receptor de DA encargado de recuperar la dopamina de la hendidura sináptica y lo bloquea, produciendo un aumento del neurotransmisor y su acumulación en la hendidura (Modificado de Iversen, 2000).

1.9.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD

La cocaína es uno de los más poderosos psicoestimulantes, y causa graves efectos sobre la salud. Así pues, algunas de las acciones farmacológicas de la cocaína son las siguientes:

La cocaína actúa sobre el Sistema Nervioso Simpático y aparato cardiovascular produciendo vasoconstricción y un aumento de la presión arterial unido al efecto vasoconstrictor. Bradicardia a dosis bajas por depresión del nodo sinusal y más frecuentemente taquicardia por estímulo sinusal, como consecuencia directa del estímulo simpático. Además de un aumento de la fuerza de contracción y de la frecuencia cardíaca, así como midriasis, temblor y sudoración por estímulo simpático.

La cocaína también actúa sobre la temperatura corporal produciendo un aumento de la producción de calor por aumento de la actividad muscular y la disminución de su pérdida de calor por la vasoconstricción. La cocaína aumenta la temperatura corporal por pérdida del control dopaminérgico de receptores hipotalámicos reguladores de la temperatura, por agotamiento de los depósitos de dopamina, con hipertermia de rebote. Esta hipertermia puede estar acompañada de convulsiones.

La cocaína es un potente estimulante del SNC, aunque sus efectos como tal dependen de factores tales como tipo de consumidor, ambiente, dosis y vía de administración.

Dosis moderadas ocasionan: elevación del estado de ánimo, sensación de mayor energía y lucidez, disminución del apetito, insomnio, mayor rendimiento en la realización de tareas, disminución de la sensación de fatiga, hiperactividad motora, verbal e ideativa. Pasado el efecto agudo aparece un periodo de cansancio, fatiga y disforia, más pronunciada cuanto más rápido e intenso son los efectos producidos por la cocaína.

Se han descrito en los consumidores de cocaína alteraciones de la percepción, alteraciones de la capacidad crítica y discriminativa (decisiones erróneas), pseudoalucinaciones táctiles, auditivas y visuales, conducta estereotipada, bruxismo y movimientos compulsivos.

Además de todo lo descrito anteriormente, existen algunos estudios sobre la administración de cocaína durante el embarazo realizados en ratas (Baraban *et al.*, 1999) y en primates (Lidow y Song, 2001) donde se observan grandes alteraciones en la citoarquitectura del cerebro de las crías nacidas tras la exposición. Sin embargo, a pesar de que la cocaína es una de las drogas más adictivas y más consumidas existen pocos estudios realizados al respecto de este tema.

En los trabajos que muestran el efecto de la cocaína sobre la neurogénesis adulta, se han observado diferencias en función del patrón de administración. Una única inyección de cocaína (20 mg/kg, i.p.) con un marcaje de BrdU (100mg/kg) un día después no induce ningún efecto sobre la proliferación en el hipocampo de la rata adulta (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Sin embargo, la administración crónica de cocaína ha dado lugar a resultados contradictorios en distintos estudios. Una administración de 17 días consecutivos no produce efecto sobre la proliferación (Eisch, 2002), con la misma dosis de BrdU (100mg/kg). Por el contrario, Yamaguchi *et al.*, 2005, tras un tratamiento de cocaína (20 mg/kg, i.p.) durante 14 días consecutivos, y la misma dosis de BrdU, sí que encontró una inhibición de la proliferación.

Los experimentos realizados en el presente trabajo esclarecen este punto de controversia concluyendo que, una administración crónica de cocaína (20 mg/kg) durante 8 o 24 días consecutivos produce un descenso en la proliferación celular en el DG (Domínguez-Escribà *et al.*, 2006).

1.10. SOLVENTES ORGÁNICOS: EL TOLUENO

1.10.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN

El tolueno es un hidrocarburo aromático, líquido, incoloro y con un olor característico; que se obtiene de forma natural del árbol Tolu (*Myroxylon balsamum* (Bálsamo Tolu o bálsamo de Colombia)) y del petróleo, de donde se extrae por reformación catalítica de las fracciones ricas en naftenos (Chiriboga, 2003); también se produce durante la manufactura del coque (a partir del carbón) (Solomons y Graham, 1992). El tolueno ($C_6H_5CH_3$) es el derivado sustituido del benceno más sencillo que hay (Fig.10).

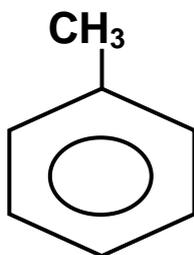


Figura 10. Estructura química del tolueno.
Estructura química del tolueno, donde se observa que es un derivado del benceno con un grupo metilo.

La inhalación de sustancias data de la Grecia antigua, en Delfos, donde una anciana invocaba el don de la profecía al inhalar dióxido de carbono. Posteriormente se conoció el uso de anestésicos con fines de recreación. Los avances en la petroquímica llevaron a la producción de diversas sustancias,

que posteriormente se utilizaron con fines de intoxicación, en todo el mundo.

Los primeros estudios sobre inhalables, se publicaron en México en 1975. A finales de la década de 1970 eran estas sustancias, junto con la marihuana, las que más mexicanos habían consumido (sin incluir el tabaco y el alcohol).

En Latinoamérica, el abuso de inhalables sigue siendo un problema de salud pública que afecta principalmente a grupos marginados, pero que se ha observado en todos los estratos sociales, siendo los niños y los adolescentes de las clases sociales más pobres quienes eligen estas sustancias altamente tóxicas, para utilizarlas con fines recreativos. A los niños consumidores de esta sustancia de abuso se les denomina “niños en situación de calle”, puesto que han abandonado sus hogares y la escuela, y sobreviven realizando actividades de subempleo. Esta práctica les provoca graves secuelas para la salud, ya que se encuentran en los años de desarrollo y consolidación de las principales funciones de la personalidad.

Las sustancias inhalables se definen como todos aquellos gases o líquidos que se volatilizan a temperatura ambiente y se inhalan para producir un estado de conciencia alterado. Sin embargo, dentro de esta clasificación no se incluyen otras sustancias, como la nicotina o la cocaína, por no presentar las características físicas de los inhalables.

Los inhalables incluyen gases y disolventes volátiles que se encuentran en diversos productos comerciales y se utilizan cotidianamente. El Instituto Nacional de Abuso de Drogas de EUA, (NIDA del inglés “National Institute on Drug Abuse”), los clasifica en tres grandes categorías: disolventes volátiles, nitritos y anestésicos.

El nitrito de amilo y el nitrito de isobutilo son usados principalmente por jóvenes y por adultos, con el propósito de intensificar el placer y la función sexual. El abuso de los anestésicos como el óxido nitroso, ciclopropano, halotano y cloroformo, se realiza en particular por profesionales de la salud.

Debido a que las sustancias inhalables no se han clasificado de acuerdo con sus características farmacológicas y toxicológicas, se ha sugerido usar el término “abuso de disolventes volátiles”, ya que no agrupa, a los nitritos ni a los anestésicos; sin embargo, aún en esta clasificación, se considera también a ciertos gases, sin que sean, en un sentido estricto, disolventes.

Los inhalables se encuentran contenidos en diversos productos comerciales, la mayoría de las veces como mezclas de disolventes. El tipo de inhalable que utilizan los menores, es diferente en cada zona o región, debido a su disponibilidad y accesibilidad de uno u otro producto. En el mercado existen más de 1000 productos susceptibles de abuso y se pueden conseguir fácilmente en diversos establecimientos comerciales, en el mercado negro (tráfico de tolueno), pero también en sus propias casas, ya que muchos de estos productos se utilizan de manera cotidiana (Tabla 3). Algunos de estos productos son: gasolina, pegamentos, pinturas, lacas,

productos comerciales que contienen disolvente, sustancias inhalables, líquidos para frenos, fluidos para encendedores, extintores de incendios, tintes para zapatos, refrigerantes, líquidos limpiadores de grasa, correctores líquidos, marcadores, barnices, quitaesmaltes, ceras líquidas, aerosoles, etc.

ADHESIVOS	Pegamentos	Tolueno, acetato de etilo, acetona, varias cetonas
	Cementos especiales	Tricloroetileno, tetracloroetileno
AEROSOL	Sprays de pintura	Butano, propano, fluorocarburos, tolueno, hidrocarburos
	Sprays para el cabello	Butano, propano, clorofluorocarburos, (CFC)
	Desodorantes y odorizantes del aire	Butano, propano, CFC
	Spays analgésicos	CFC
	Sprays para el asma	CFC
	Sprays para telas	Butano, tricloroetano
	Limpiadores de computadoras	Dimetil éter, hidrofluorocarburos
ANESTÉSICOS	Gaseosos	Óxido nitroso
	Líquidos	Halotano, enflurano
	Locales	Cloruro de etilo
SOLVENTES	Quitaesmaltes	Acetona, acetato de etilo
	Removedor de pintura	Tolueno, cloruro de metileno, acetona, acetato de etilo
	Adelgazador de pintura	Destilados del petróleo, ésteres, acetona
	Líquido corrector y tóner	Tricloroetileno, trocloroetano
	Gas o líquido encendedor	Butano, isopropano
	Extintores de fuego	Bromoclorodifluorometano
LIMPIADORES	Quitamanchas	Xileno, destilados del petróleo, clorohidrocarburos
	Productos de tintorerías	Tetracloroetileno, tricloroetano
	Desengrasantes	Tetracloroetileno, tricloroetano, trocloroetileno

Tabla 3. Productos comerciales en los que aparecen solventes orgánicos: en la tabla se muestran los productos que contienen tolueno, además de otros solventes orgánicos obtenidos en su formulación.

A pesar de la multiplicidad de inhalantes, no todos ellos tienen los mismos efectos, particularmente en lo que se refiere a su toxicidad: algunos solventes son tóxicos para el hígado (clorohidrocarburos), para el riñón (tolueno), o para los nervios periféricos (hexano), para la sangre (benceno) y otros para el sistema nervioso (tolueno). Por ello, es preciso distinguirlos e identificar al agente responsable del cuadro de abuso.

1.10.2. FORMAS DE EXPOSICIÓN

1.10.2.1. EXPOSICIÓN LABORAL Y RECREATIVA

Recientemente se ha presentado un incremento del uso de disolventes orgánicos como el tolueno en la industria, por lo que se lleva al cabo una exposición involuntaria a este producto en el lugar de trabajo (tabla 2). De esta manera, el uso de este compuesto se relaciona directamente con la salud de los trabajadores, ya que no existe información adecuada en torno a su manejo. A pesar de ser ampliamente utilizado, se presentan pésimas condiciones de seguridad para quienes se exponen. Debido a que el tolueno está incluido en la formulación de numerosos productos de uso doméstico, la exposición involuntaria se lleva al cabo de igual manera en el hogar; esto provocado por la falta de conocimientos referentes al uso, manejo y disposición final de residuos de los productos que lo contienen (Wilkins-Haug, 1997).

Es incompatible con agentes oxidantes, con los cuales puede provocar reacciones explosivas. Presenta un alto índice de inflamabilidad, genera monóxido y dióxido de carbono como productos de su combustión (Lauwerys, 1994). Su solubilidad en agua es suficiente para provocar problemas de contaminación en aguas superficiales y subterráneas. Debido a su alta presión de vapor, es un compuesto altamente volátil, por lo que escapa al ambiente, donde al combinarse con el oxígeno del aire, da origen a la formación de benzaldehído y cresol, compuestos altamente tóxicos (“US Environmental protection agency national ambient volatile organic compounds”, 2003).

El tolueno es usado como disolvente y se incorporó a la industria sustituyendo al benceno, sustancia altamente tóxica (“US Agency for toxic substances and disease registry”, 1994). Es un disolvente orgánico que se encuentra en combustibles para automóviles y aviones, pinturas, barnices, hules, gomas, etil-celulosa, poliestireno, polialcohol vinílico, ceras, aceites y resinas. Se utiliza también como materia prima en la elaboración de una gran variedad de productos como el benceno, ácido benzoico, fenol, benzaldehído, explosivos, colorantes, productos farmacéuticos, adhesivos, detergentes, monómeros para fibras sintéticas, sacarinas, saborizantes y perfumes (Ulla *et al.*, 1999).

Durante los procesos industriales los trabajadores se encuentran expuestos de manera crónica a niveles bajos de tolueno por la inhalación de los vapores o por contacto directo con el disolvente líquido, lo que ocasiona también un

mayor aumento a sufrir accidentes y a contraer enfermedades (Ulla *et al.*, 1999, Wilkins-Haug, 1997, Almirall *et al.*, 1999, Díaz *et al.*, 1999). Los límites de exposición han sido establecidos por organismos internacionales como la Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional de los Estados Unidos de Norteamérica (OSHA), con los valores siguientes: 100 ppm al calcular un tiempo de exposición no mayor a 8 horas por día o 300 ppm para exposiciones de 15 minutos espaciadas por lo menos una hora y 500 ppm para una única exposición de no más de 30 minutos (Ulla *et al.*, 1999, Wilkins-Haug, 1997), aunque estos límites son frecuentemente rebasados, con una incidencia negativa en la salud de los trabajadores.

1.10.2.2. INHALACIÓN INTENCIONAL Ó RECREATIVA

La absorción de los vapores de tolueno no sólo toma relevancia en la exposición ocupacional, sino que también eleva el estatus del tolueno a potencial droga de abuso. En las últimas tres décadas, el tolueno se ha convertido en uno de los disolventes orgánicos más utilizados en el abuso de sustancias.

La popularidad del tolueno como inhalante se basa en la facilidad con la que es adquirido, es barato, y su posesión no trae consecuencias legalmente punibles.

Por otra parte, se cree que es menos dañino que otras drogas más convencionales (como la cocaína, marihuana, anfetaminas, etc.), produce

efectos más rápidos y se tiene la errónea idea de que no causa adicción (Lara *et al.*, 1998, Gospe y Zhou, 2000). Durante la práctica de inhalación, los consumidores se exponen a concentraciones altas de tolueno que llegan a alcanzar las 12,000 ppm (Bruckner y Peterson, 1981).

1.10.2.3. EXPOSICIÓN AMBIENTAL

En el aire, en el humo de los cigarrillos, y en menor presencia en el agua y comida contaminada con tolueno. Además de estar presente en el humo que muchas industrias emiten a la atmósfera.

El tolueno es uno de los agentes contaminantes presentes en el aire que respiramos, e incluso está presente en muchos productos comestibles. A esta situación contribuyen muchos procesos industriales que lo utilizan o lo producen, como reactivo de los procesos químicos que emplean.

1.10.3. METABOLISMO DEL TOLUENO

El tolueno es absorbido rápidamente en los pulmones y en el tracto gastrointestinal, y en un menor grado, por la piel (Wallen, 1986, Mc Dougal, 1990, Morgan *et al.*, 1991, Tsuruta, 1996). Cuando se introduce en el interior de los pulmones, es aspirado sin que haya sufrido ninguna modificación. Los factores que intervienen en la absorción alveolar son: volumen de aire inspirado, concentración en el aire, tiempo de exposición, coeficiente de partición sangre/aire, transporte hematopoyético, solubilidad tisular y la relación catabolismo/anabolismo. Se ha calculado que el porcentaje promedio de tolueno que se absorbe por inhalación (vía pulmón-alveolo) es del 85-90% y por vía gastrointestinal es del 100% (Carlsson, 1982, Faust, 1994, Tsuruta, 1996).

Debido a la alta presión de vapor que posee el tolueno, la vía de exposición más común es la inhalación, que lleva a este agente químico a la circulación sanguínea vía alveolar; si la exposición ocurre por la vía dérmica o por ingesta, el tolueno es introducido igualmente, a la circulación sanguínea. Cuando pasa a la sangre se oxida, dando finalmente un producto de transformación: el ácido hipúrico. Una vez absorbido este compuesto es distribuido por todo el cuerpo antes de llegar al hígado para su metabolismo, degradación y posterior excreción por vía urinaria (Phillips, 1980).

El primer paso en el metabolismo del tolueno es la hidroxilación aromática microsomal del grupo metilo (reacción catalizada por el

citocromo P₄₅₀), para la formación del benzil alcohol, reaccionando éste con el aldehído deshidrogenasa (ADH) dando como resultado al benzil aldehído, el cual es transformado gradualmente por las enzimas alcohol deshidrogenasa 1 y 2 (ALDH1-ALDH2) a ácido benzoico; una vez formado el ácido benzoico se conjuga con la glicina para producir el ácido hipúrico que es excretado con la orina.

La medición de la excreción urinaria de ácido hipúrico, es utilizada como un indicador biológico de exposición a tolueno y a otros hidrocarburos aromáticos (“US National institute for occupational safety and health”, 1994). Aproximadamente, el 60-75% del tolueno que entra al cuerpo es metabolizado en el hígado a ácido hipúrico.

1.10.3.1. FARMACOCINÉTICA

La vía de administración es oral y/o nasal. Los inhalables se absorben rápidamente a través del aparato respiratorio, por la amplia superficie pulmonar, pasando directamente a la sangre. Debido al alto poder liposoluble que tienen las sustancias inhaladas, cruzan con facilidad la barrera hematoencefálica, alcanzando inmediatamente el Sistema Nervioso Central. Los efectos clínicos se observan de inmediato y tienen una duración breve. Además los disolventes se distribuyen en otros órganos ricos en lípidos como corazón, hígado y riñones.

Aproximadamente una quinta parte de las sustancias inhaladas se excretan sin modificación por el aparato respiratorio. El resto se metaboliza por el hígado y se elimina vía renal, sin embargo, el metabolismo y la eliminación varía dependiendo de sus propiedades químicas específicas. El metabolismo de algunos disolventes puede crear metabolitos secundarios, que en ocasiones, son más tóxicos que el compuesto original.

1.10.3.2. FARMACODINÁMICA

Anteriormente, se consideraba que los anestésicos tenían un mecanismo de acción inespecífico dado por su capacidad de penetrar la membrana y producir cambios en la fluidez. Una investigación realizada por Paéz-Martínez evidenció que los disolventes orgánicos tienen un mecanismo de acción complejo muy similar al del etanol (Paéz-Martínez *et al.* 2003). En la tabla 4 se hace una comparación de los efectos que tiene el tolueno y el etanol sobre algunos receptores. Como se observa, ambos compuestos inhiben los receptores NMDA y nicotínicos y potencian los receptores GABA, glicina y 5-HT3.

RECEPTOR	EFEECTO DEL ETANOL	EFEECTO DEL TOLUENO
NMDA	Inhibe	Inhibe
GABA_A	Activa	Activa
GLICINA	Activa	Activa
NICOTÍNICOS	Inhibe	Inhibe
5-HT₃	Activa	Activa

Tabla 4. Comparación de los efectos agonistas y antagonistas del etanol y el tolueno. En la siguiente tabla se muestra el efecto del etanol y del tolueno sobre los principales receptores del sistema nervioso central.

El tolueno (al igual que el etanol), ejerce su efecto mediante un mecanismo doble. Por una parte, inhibe la estimulación producida por la actividad normal de los receptores NMDA y nicotínicos, y por otra parte acrecenta la actividad de los receptores GABA_A, glicina y 5-HT₃, por lo que produce un mayor aumento en la inhibición. En la figura 11 se muestra de manera global, la interacción del tolueno con los diferentes receptores postsinápticos y la manera en que actúa.

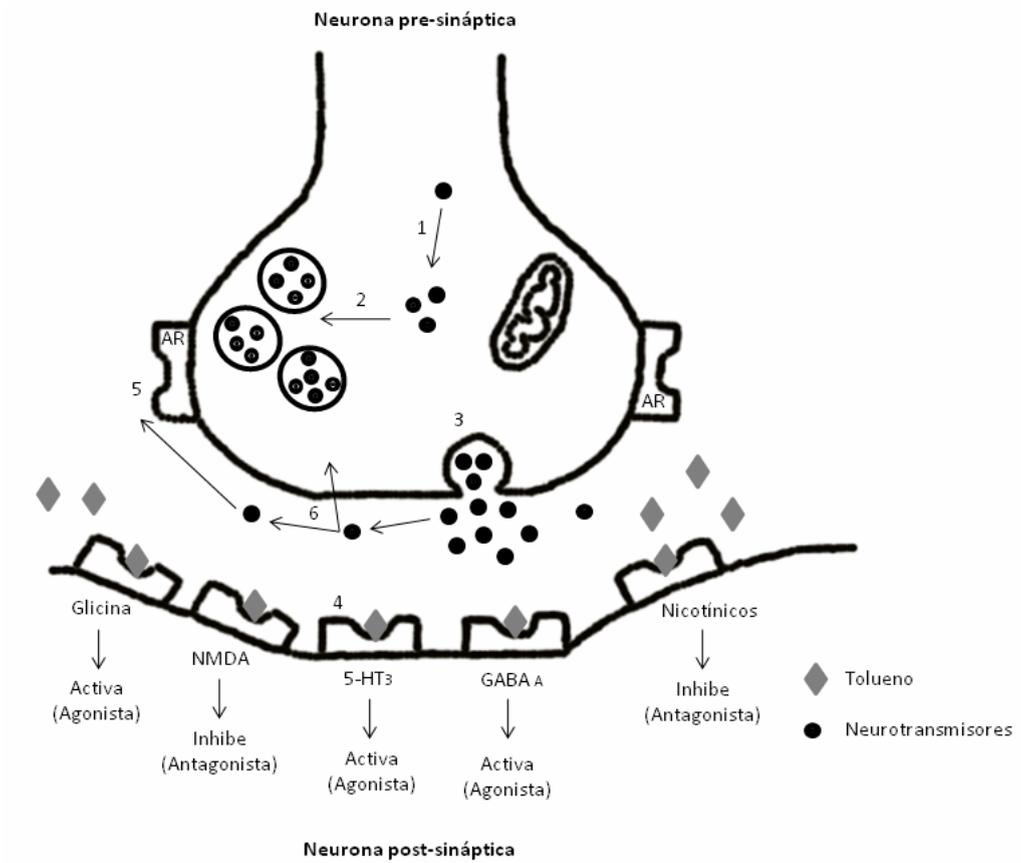


Figura 11.- Mecanismos de acción del tolueno sobre diferentes receptores. 1. Síntesis del neurotransmisor (NT) de glicina, glutamato, serotonina, GABA y acetilcolina. 2. Almacenamiento de vesículas. 3. Liberación del NT. 4. Receptores postsinápticos (donde el tolueno actúa como agonista o antagonista de los diferentes receptores). 5. Receptores presinápticos o autoreceptores (AR), que controlan la retroalimentación. 6. Recaptación del NT desde la hendidura sináptica (Modificado de Fuentes-Lara y Hernández-González, 2005).

La mayoría de las drogas de abuso activan el sistema mesolímbico dopaminérgico, liberando dopamina, lo cual lleva a una alteración de la conducta, que se manifiesta en un deseo compulsivo de búsqueda e ingestión de la sustancia. Se han evaluado los efectos de los disolventes sobre la liberación de dopamina y se encontró que la inhalación de tolueno aumenta el contenido de dopamina (Riegel *et al.*, 2007).

Si se administra tolueno con cocaína, aumentan significativamente los niveles de dopamina, con un incremento mayor que la suma de los componentes individuales. Esto sugiere que puede haber una potenciación de los efectos de los disolventes cuando se combinan con otras drogas de abuso (Beyer *et al.*, 2001).

1.10.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD

La toxicidad de los solventes orgánicos en general y de los aromáticos en particular (tolueno, xileno, benceno, etc.), está reconocida en la literatura (Hogstedt *et al.*, 1992). Las razones de la toxicidad de estas sustancias y la diversidad de efectos adversos sobre el organismo, se explican por sus propiedades lipotróficas y por sus propiedades físico-químicas (volatilidad, bajo punto de ebullición, etc), que facilitan su absorción. Su empleo es, por

otra parte, ubicuo en la industria moderna y, además, se utilizan como drogas (Mayor-Ríos, 1995).

Por sus propiedades lipotróficas, la toxicidad de los solventes orgánicos afecta a los sistemas linfático, hematopoyético, hígado, riñones y sistema nervioso y, como la mayoría de los agentes tóxicos, los solventes orgánicos tienen, además, efectos irritantes inmediatos sobre la piel y mucosas (Rana y Kumar, 1994).

De este conjunto de efectos, aquellos producidos sobre el sistema nervioso parecen ser los más relevantes y probablemente, los que más rápidamente se pueden detectar en situaciones de exposición continuada o crónica (Seppalainen *et al.*, 1991).

1.10.4.1. ESTRÉS OXIDATIVO

Uno de los efectos más ampliamente estudiado es la inducción de estrés oxidativo producido en el cerebro tras la administración de drogas como la cocaína (Cunha-Oliveira *et al.*, 2008), el MDMA (Cunha-Oliveira *et al.*, 2008), el alcohol (Crews y Nixon, 2009) e incluso el tolueno (Mattia *et al.*, 1993). Con el objetivo de analizar si este efecto se producía en los animales de estudio sometidos a tratamientos con drogas se han empleado diferentes marcadores de estrés oxidativo, como por ejemplo el GSSG/GSH, SOD, MDA y la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdGua). En la presente tesis, se ha

empleado este último metabolito como bioindicador de la presencia de estrés oxidativo inducido por el tolueno.

El análogo de la guanina 8-OHdGua, es una modificación abundante en las bases del ADN de mamíferos cuyos niveles aumentan con la presencia del estrés oxidativo. La cantidad de 8-OHdGua en el ADN celular es más alta en animales con una tasa metabólica mayor (Shigenaga *et al.*, 1989), y también es más alta en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear (Richter *et al.*, 1988).

Kasai y colaboradores contemplan la posibilidad de que existan dos vías diferentes para explicar la presencia de 8-OHdGua en la orina. La primera vía es la que parte de 8OH-dGTP, formado a partir de la adición de un grupo radical hidróxido, surgido a partir del peróxido de oxígeno producido durante las reacciones del estrés oxidativo, a una molécula de GTP. Seguido por la eliminación de un pirofosfato y la digestión subsecuente a 8-OH-dGMP por el enzima 5' (3)- nucleotidasa. En la segunda vía, el 8-OHdGua se produce por mecanismos de reparación por la supresión del nucleótido (NER) (Kasai *et al.*, 2008) (Fig.12).

El aumento de los radicales libres que la administración de la droga produce, causa la producción de 8-OHGua, que al incorporarse en el ADN produce transversiones A - T + C - G. Se ha demostrado que estas mutaciones presentes en las células están involucradas en enfermedades tales como el cáncer (Cheng *et al.*, 1992).

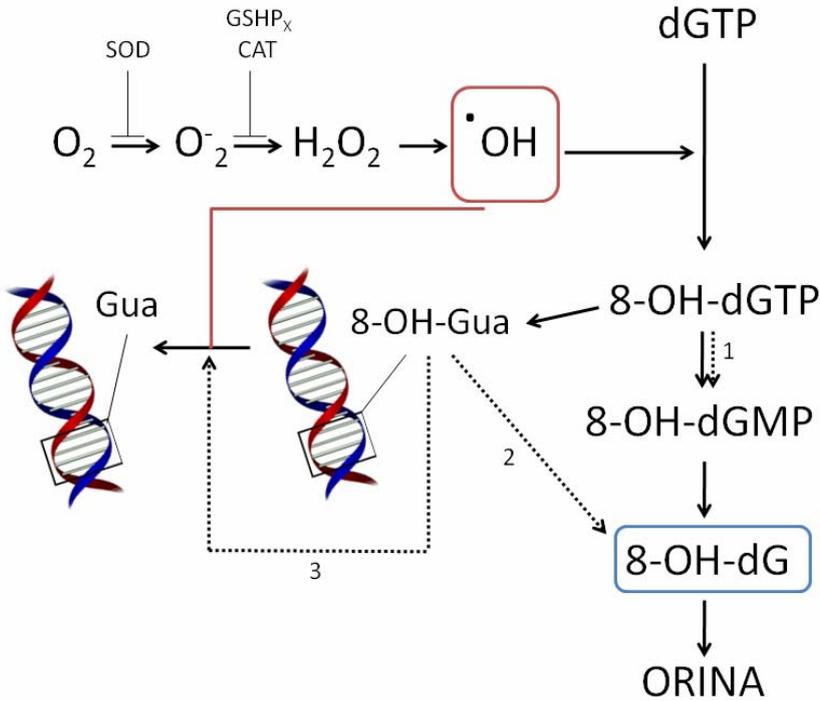


Figura 12.- Mecanismos de formación del metabolito 8-OHdGua inducido por estrés oxidativo. Existen dos vías diferentes para explicar la presencia de 8-OHdGua en orina. La primera vía es la que parte de 8OH-dGTP, e implica el enzima MTH1 de nucleótidos, para obtener 8-OH-dGMP que será digerida por la enzima 5' (3)- nucleotidasa a 8-OH-dG (1). En la segunda vía, el 8-OHdGua se produce por mecanismos tipo de reparación por la supresión del nucleótido (NER) (2). El mecanismo por el que puede eliminarse el radical OH es mediante la reparación por escisión de base (3). (Modificado de Kasai *et al.*, 2008).

1.10.4.2. EFECTOS AGUDOS

Los efectos agudos pueden causar un síndrome de encefalopatía tóxica (Orbaek, 1987; Callender, 1993). Clínicamente, se distinguen dos fases de este síndrome que aparecen a las pocas horas de exposición. La primera fase se caracteriza por una reacción de sobrestimulación que provoca un cuadro neuropsiquiátrico de euforia, desinhibición del comportamiento motor y emocional, impulsividad, inestabilidad motora y alteraciones del lenguaje (interrupción del discurso).

La segunda fase, que se produce con una mayor intensidad de la exposición aguda, se distingue por un período donde se impone la somnolencia generalizada, la disminución de las funciones motoras e intelectuales, particularmente de la memoria. Además aparecen otros síntomas como vértigo, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, incoordinación, parestesia, aumento de la salivación y taquicardia.

Los síntomas observados son transitorios, y desaparecen con rapidez cuando cesa la exposición. Aunque una exposición corta pero con mucha intensidad, puede llegar a causar un coma, e incluso, producir la muerte en casos severos (Gerr y Letz, 1992).

1.10.4.3. EFECTOS DE EXPOSICIÓN CRÓNICA

En casos de intoxicación crónica se ha podido observar que hay lesiones hepáticas, alteraciones renales que se expresan por aminoaciduria, glucosuria y acidosis hiperclorémica. Así mismo, también se pueden comprobar, incrementos en las tasas de excreción de albúmina, leucocitos, electrolitos, etc.

A nivel del SNC, la intoxicación crónica se manifiesta por fatiga, depresión, falta de concentración, ansiedad, trastornos psicomotores, insomnio, ataxia, temblores, etc..., llegando incluso a provocar una polineuropatía.

Hay otras lesiones, cuando se hallan afectados sistemas como el digestivo, apareciendo náuseas y vómitos, o a nivel cardiaco, provocando miocarditis o infarto.

La salud reproductiva también se ve afectada por la exposición crónica al tolueno. En mujeres, produce un decremento en la fecundación, infertilidad, dismenorrea y ciclos menstruales anormales. En hombres, problemas como atrofia testicular, reducción de la espermatogénesis provocada por la disminución de LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante) y testosterona, han sido demostrados (Luderer *et al.*, 1999, Delgaard *et al.*, 2001). En madres en las que se estudió la inhalación de tolueno durante el embarazo se encontraron acidosis distal tubular renal y abortos espontáneos (Wilkins-Haung, 1997, Arnold *et al.*, 1994).

Los efectos asociados a la intoxicación por tolueno, son en general reversibles. Los daños graves e irreversibles ocurren puntualmente en casos de intoxicación severa (concentraciones varios cientos de veces más altas que las existentes en un medio laboral habitual), que se da durante largo tiempo, en condiciones que sólo se presentan en el contexto del abuso de drogas. Algunas de las manifestaciones del daño neurológico pueden ser parcialmente reversibles cuando se suspende la inhalación y éstas concluyen al interrumpir la administración. Es decir, si el sujeto deja de inhalar, la toxicidad se interrumpe y no avanza más.

Los principales síndromes neurológicos producidos por los solventes orgánicos son los siguientes:

- ❖ Ataxia cerebelosa: manifestada básicamente por trastornos del equilibrio y de los movimientos oculares;
- ❖ Neuropatía periférica: los nervios de las extremidades degeneran a partir de la periferia, en dirección del centro (axonopatía distal); se observa pérdida de la sensibilidad, sin dolor;
- ❖ Neuropatía craneal: con afectación de los nervios trigémino y facial;
- ❖ Parkinsonismo;
- ❖ Pérdida de visión (neuropatía óptica);
- ❖ Alteraciones multifocales: demencia, ataxia, espasticidad, disfunción de estructuras del tallo cerebral, etcétera.

La gravedad de estas alteraciones dependerá, como ya se ha dicho, de la intensidad del abuso, es decir: 1) el tiempo que se lleva inhalando, 2) el o los solventes utilizados, y 3) la dosis (frecuencia y cantidad) del inhalante.

El pronóstico de recuperación depende directamente de la gravedad del déficit neurológico hasta el momento de la suspensión del solvente. En casos severos, la recuperación puede tomar varios años.

El sistema nervioso resulta ser el más afectado, debido al alto contenido de lípidos en este tejido, lo que induce a que el tolueno se quede más tiempo en él. Se han descrito lesiones en el SNC atribuibles al efecto patológico de la intoxicación experimental repetida en ratas, se caracteriza por infiltrado de células redondas de aspecto linfocítico, degeneración neuronal en áreas ordinariamente bien limitadas, lesiones vasculares escasas y de moderada intensidad.

En adictos a la inhalación de solventes orgánicos se han identificado con técnicas de imágenes (TAC y resonancia magnética nuclear), alteraciones estructurales en cerebro y cerebelo (King *et al.*, 1985; Pongvarin, 1991). Además, topográficamente, se ha señalado la presencia de las siguientes lesiones morfológicas:

1. Corteza frontal: infiltrados importantes, algunos de forma de corona alrededor de cuerpos neuronales en degeneración; células piramidales picnóticas, aparición de granulaciones argirófilas en células periepiteliales de vasos parenquimatosos, presencia de células de Rio Ortega.

2. Corteza: lesiones intensas en neuronas piramidales, ahuecamiento irregular de los tallos neuronales, hipertrofia neurofibrilar, vacuolización citoplasmática, aglutinación de grumos de Nissl, picnosis, degeneración del soma, atrofia de dendritas y del eje principal.

3. Núcleos talámicos e hipotalámicos: el soma neuronal después de sufrir vacuolización citoplasmática se destruye por autólisis.

4. Hipocampo: Las neuronas presentan tamaño, forma y cromatofilia ampliamente variable. Las neuronas piramidales disminuyen, están desordenadas y presentan un aspecto picnótico y hay pérdida parcial de las prolongaciones dendríticas, degeneración vacuolar del soma, gliosis reactiva y activación de células de microglía (Fig. 13).

5. Cerebelo: atrofia cerebelosa, con degeneración de células de Purkinje, condensación de células estrelladas y neuroglia al nivel de la capa molecular; fragmentación intensa de las fibras nerviosas regionales y proliferación de astrocitos fibrosos.

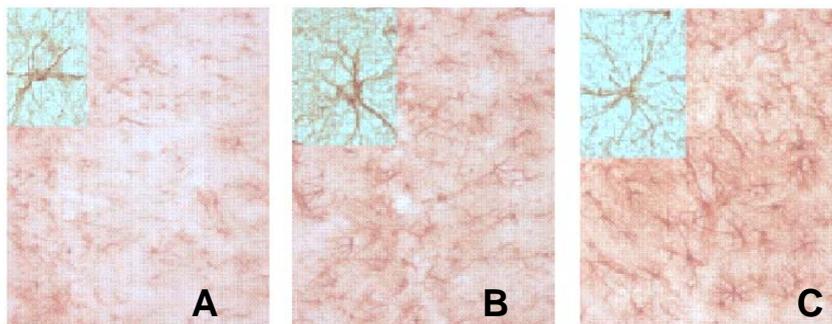


Figura 13. Alteraciones de la microglía causadas por tolueno. (A) células en estado basal, se observa en el recuadro superior derecho (1000x) un astrocyto inmunomarcado con GFAP y en la vista a bajo aumento (100x) la población astrocytaria marcada en con GFAP en un campo del hipocampo dorsal. En las fotomicrografías (B) y (C), corresponden a ejemplos de células astrocytarias con modificaciones en su morfología normal en la citoarquitectura donde se evidencia el incremento en la población astrocytaria de CA1 (B) y la fotomicrografía C presenta la mayor densidad de población astrocytaria. (Imagen cedida de Gómez-Pinedo, *et al.* 2007).

1.10.4.4. EXPOSICIÓN DURANTE LA GESTACIÓN

Existen casos clínicos relativos a la exposición al tolueno durante la gestación, en los que aparecen embriopatías y malformaciones (Bowen y Hannigan, 2006). Los efectos del tolueno se deben a dos características principales: que este solvente se difunde a través de la sangre materna y que además se deposita en tejidos con alta cantidad de lípidos (Gospe *et al.*, 1996; Cairney *et al.*, 2002).

Elevados niveles de solvente pueden producir incluso muerte perinatal y en las crías que sobreviven aparecen síntomas evidentes de teratogenicidad. En el momento del nacimiento, las crías afectadas son típicamente prematuras y/o de crecimiento retardado, con lesiones en hígado, pulmón y riñón (Cairney *et al.*, 2002), con disminución del tamaño craneofacial (Tenenbein *et al.*, 1993) y una severa afectación de la morfología facial, además de anomalías en los dedos (Wilkins-Haug y Gabow, 1991, Pearson *et al.*, 1994, Arnold *et al.*, 1994, Wilkins-Haug, 1997). También se observaron alteraciones estructurales serias del sistema nervioso central (Tenenbein *et al.*, 1993), y concretamente se describieron alteraciones en el número de espinas dendríticas (Thiel y Chahould, 1997). Para describir esta serie de características morfológicas y de conducta se acuñó el término síndrome fetal del solvente.

1.10.4.5. EFECTOS TRAS LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA

La exposición al tolueno durante una etapa postnatal temprana afecta al desarrollo de las estructuras nerviosas corticales y subcorticales (Gospe y Zhou, 2000). Además de producir lesiones en hígado, pulmón, riñón (Cairney *et al.*, 2002), y otras lesiones en cerebro y médula espinal (Arnold *et al.*, 1994).



JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPÍTULO – 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

2.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

2.1.1. COCAÍNA

El estudio de los efectos de la cocaína sobre la neurogénesis hipocámpica presenta un gran interés social, puesto que España es, junto al Reino Unido, el país con más cocainómanos en tratamiento de la Unión Europea, casi un 20% de los consumidores de drogas que acceden a las redes asistenciales, según los informes que el Observatorio Europeo de la Droga y las Toxicomanías (OEDT), ha proporcionado en los últimos años.

Hasta el momento, los datos que se tienen respecto a los efectos de esta droga sobre la neurogénesis hipocámpica adulta son contradictorios. Por una parte, se observó una disminución en la tasa de proliferación celular en hipocampo (Yamaguchi *et al.*, 2004). Aunque por otra parte, bajo condiciones experimentales semejantes, otros investigadores no encontraron efectos significativos (Eisch, 2002). Es importante esclarecer estas inconsistencias en la literatura y estudiar otros aspectos de la neurogénesis hipocámpica en el adulto.

2.1.2. TOLUENO

El tolueno es un solvente orgánico ampliamente utilizado en la transformación química de sustancias, por lo que la exposición laboral adquiere gran relevancia. También es un componente importante de los contaminantes atmosféricos, por la combustión de gasolina, y uno de los principales compuestos utilizados en la inhalación recreativa (drogodependencia). El tolueno y sus metabolitos causan degeneración del sistema nervioso y lesionan órganos de depuración al afectar la estructura celular de estos, pudiendo llegar a ocasionar la muerte. A pesar de que se han realizado estudios sobre los efectos agudos, subletales y los crónicos de exposición laboral del tolueno, no se han establecido los límites de daño que una intoxicación aguda recreativa del tolueno puede causar sobre el SNC y la neurogénesis.

2.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La cocaína y el tolueno ocasionan efectos adversos sobre la neurogénesis adulta en el hipocampo de rata expuestas. Se pretende demostrar que la cocaína causa cambios en la morfología de la ultraestructura del giro dentado y en las fibras musgosas del hipocampo. Además se cree que el tolueno puede afectar el aprendizaje y la memoria declarativa en los individuos tratados con este solvente. Por último, se espera que los efectos causados por el tolueno se deban al aumento del estrés oxidativo tras la exposición a la droga.

2.3. OBJETIVOS GENERALES

1. Estudio del efecto de la administración de cocaína tras 8 y 24 días sobre la proliferación, supervivencia y maduración de las células del hipocampo de rata adulta. Además de la evaluación de la ultraestructura de los botones sinápticos de las fibras musgosas tras 24 días de administración de cocaína.
2. Análisis de la proliferación, supervivencia y maduración de las células del hipocampo tras 24 días de exposición a tolueno. Completado con un estudio ultraestructural de las células del giro dentado del hipocampo.
3. Evaluación de los efectos sobre la neurogénesis, conducta dependiente de hipocampo y ultraestructura celular del giro dentado, causados tras la inhalación de tolueno de un grupo de ratas adultas durante 72 días, y de las crías nacidas de éstas, que fueron expuestas al tolueno durante su etapa de gestación y postnatal temprana.

2.4. OBJETIVOS CONCRETOS

1. Estudio del efecto de la administración de cocaína durante 8 y 24 días, sobre la proliferación, supervivencia, maduración y la migración celular.
2. Evaluación de la presencia de muerte celular tras la exposición de 24 días a cocaína.
3. Análisis de las características ultraestructurales de los botones sinápticos de las fibras musgosas tras la administración de cocaína durante 24 días.
4. Evaluación de los síntomas observados durante la exposición a tolueno durante 24 y 72 días en ratas adultas, además del análisis de los cambios morfológicos observados en las crías que inhalan tolueno durante su etapa de gestación y postnatal temprana.
5. Evaluación de la intoxicación del tolueno mediante la presencia del metabolito 8-OHdGua empleando el LC/MS/MS.
6. Determinación de los efectos de la exposición a tolueno durante 24 días sobre la proliferación, supervivencia y maduración de las neuronas en el área del giro dentado del hipocampo.
7. Estudio de la proliferación, supervivencia y maduración de las células del hipocampo para un grupo de ratas adultas que inhalan tolueno durante 72 días.
8. Evaluación de los efectos causados sobre la proliferación, supervivencia y maduración para un grupo de crías expuestas al tolueno durante su etapa de gestación y postnatal temprana.

9. Estudio de la muerte celular inducida por estrés oxidativo, evaluado mediante la cuantificación de la peroxidación lipídica.
10. Evaluación de las alteraciones gliales causadas por la muerte celular inducida tras la intoxicación al tolueno.
11. Observación de los efectos que la exposición al tolueno causa sobre pruebas de conducta dependientes de hipocampo.
12. Mediante técnicas de microscopia electrónica de transmisión, analizar la citoarquitectura celular del giro dentado del hipocampo tras la exposición a tolueno, tras 24 días, 72 días, y durante la gestación o etapa postnatal temprana.

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los estudios realizados fueron de tipo transversal, puesto que se realizaba una sola determinación en los sujetos de estudio y se evaluaba de manera concurrente la administración de la droga y el evento de interés.

En los experimentos de cocaína se incluyeron las ratas macho que fueron inyectadas correctamente con cocaína, que presentaban los síntomas típicos de la exposición a la droga, como la hiper-actividad y el aumento del nerviosismo. Para los estudios realizados con tolueno, se incluyeron todas las hembras que presentaban indicios clínicos de intoxicación por tolueno, como la presencia de ácido hipúrico en su orina, y que además se quedaron embarazadas durante el periodo de apareamiento.

Descripción de variables

Variables Independientes: Tiempos de exposición de cada experimento de administración de cocaína, y los diferentes tratamientos empleados (control/cocaína, control/tolueno).

Variables Dependientes:

- Características morfológicas y de la densidad de población neuronal en el giro dentado del hipocampo.
- Concentración de ácido hipúrico en orina

- Desarrollo ontogénico de las crías expuestas intrauterinamente a tolueno
- Variación de la conducta exploratoria
- Variación en el aprendizaje y memoria
- Estrés oxidativo
- Características morfológicas y de la densidad de población astrocitaria en el giro dentado del hipocampo.
- Características morfológicas y de la densidad de población microglial en el giro dentado del hipocampo.
- Características morfológicas y de la densidad de población neuronal en el giro dentado del hipocampo.



MATERIAL Y MÉTODOS



CAPÍTULO – 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES Y CONDICIONES DE ALOJAMIENTO

Los sujetos experimentales utilizados en esta tesis doctoral fueron ratas Wistar. En los experimentos realizados con cocaína y en los que se administró tolueno durante 24 días, fueron ratas macho Wistar con un peso corporal de 250-275g, se utilizaron machos para descartar las posibles alteraciones hormonales, producto del ciclo reproductivo de la rata hembra (Tanapat, 1999). En cambio, en los estudios destinados al estudio del efecto del tolueno sobre el desarrollo de cerebro fueron ratas hembras, con un peso comprendido entre 100 – 150 g. que fueron cruzadas con ratas Wistar macho de entre 250 – 300 g durante 7 días. Tras este periodo de tiempo se retiraron los machos y cada una de las hembras compartió su jaula con su progenie hasta el final del experimento.

Las ratas se estabularon en jaulas en condiciones estándar, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y una temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los animales se alimentaron con piensos comerciales, disponiendo de agua y comida “ad-libitum”. Una parte del stock de animales se obtuvo a partir de la colonia de “Harlan Interfauna Ibérica” (Barcelona) y se mantuvieron en el estabulario de la “Facultat de Farmàcia de la Universitat de València”, hasta el inicio de los experimentos. Mientras los experimentos estaban en proceso los animales se alojaron en el estabulario del “Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biología Evolutiva de la Universitat de València”.

Los animales se manipularon tres días consecutivos durante 5 minutos diarios, antes de empezar con los tratamientos, y en todos los experimentos tuvieron un periodo de una semana de adaptación al estabulario.

En los experimentos con cocaína se emplearon un total de 62 ratas distribuidas entre los diferentes experimentos realizados. Así pues, en el experimento de estudio de la proliferación, se emplearon 7 ratas control y 8 ratas para el tratamiento con cocaína. En el siguiente experimento, en el que se analizó el efecto de la cocaína sobre la supervivencia, se emplearon 8 ratas control y otras 8 fueron tratadas con cocaína. Para el experimento de maduración se realizaron dos estadios temporales diferentes, empleándose 5 animales como control y 6 fueron tratados con cocaína para el estudio a los 8 días. Otros 6 animales control y 6 animales inyectados con cocaína se utilizaron para el estudio de maduración tras 24 días. Por último, en los experimentos destinados al estudio al microscopio electrónico se emplearon 4 animales control y 4 animales tratados con cocaína.

En los estudios realizados con tolueno se realizaron dos experimentos diferentes: el primero tras exposición de 24 días al tolueno, donde se emplearon 24 ratas; y en el segundo grupo de animales tratados con tolueno durante el desarrollo se emplearon 36 ratas para los estudios de inmunohistoquímica y conducta, considerando 9 ratas adultas hembras y 27 ratas crías macho nacidas de éstas. En el manejo de los animales se siguieron las directrices del Consejo de la Comunidad Europea (24 de noviembre 1986 [86/609/EEC]) tal y como se muestran en el Real Decreto

1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE núm. 252 del 21 de octubre de 2005). Además los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité ético de la “Universitat de València”.

3.2. DOSIS DE LAS DROGAS ADMINISTRADAS

Entre la bibliografía relacionada con la cocaína se encontraron contradicciones con las dosis y los resultados obtenidos. El equipo de Yamaguchi empleando 20 mg/Kg durante 14 días, concluyó que la cocaína disminuía la proliferación celular, mientras que Eisch y colaboradores, empleando una dosis de 15 mg/Kg, dos veces al día, durante 17 días, no encontró cambios en la proliferación celular (Yamaguchi *et al.*, 2004; Eisch, 2002). En este trabajo se ha escogido una dosis de 20 mg/Kg, con una inyección diaria, aunque con dos estadios temporales diferentes de 8 y 24 días. De este modo, se utilizaba la dosis más alta de las dos anteriormente mencionadas y se prolongaba el estudio temporal del tratamiento. Se descartó la posibilidad de tratar a los animales con dos inyecciones diarias para evitar un estrés innecesario que afectaría a los resultados obtenidos para el estudio de la neurogénesis.

En los experimentos con tolueno son pocos los artículos que relacionan el tolueno como droga con la neurogénesis (Lin *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2004; Gospe *et al.*, 2000). En la mayoría de los estudios publicados con tolueno se aborda el punto de vista de la intoxicación laboral, para mostrar los efectos que se producen sobre la salud (Ukai *et al.*, 2007). De este modo, tanto la dosis como la forma de administración se decidieron en base a los experimentos realizados por Gómez-Pinedo y su equipo (Gómez-Pinedo *et al.*, 2007), aunque se ajustaron las dimensiones de la caja de intoxicación

para el número de animales de estudio, modificando así las ppm empleadas para obtener los síntomas de intoxicación adecuados.

3.2.1. COCAÍNA

Durante los estudios realizados con cocaína se administró una dosis de 20 mg/kg en todos los experimentos realizados. Lo que se modificó en cada experimento fue la duración de la administración de la droga y el momento de administración del marcador BrdU, tal y como se explicará más adelante. De este modo, para el estudio de la proliferación neuronal el tratamiento fue administrado durante 8 días consecutivos con cocaína 20 mg/kg, usando como control el solvente empleado para disolver la cocaína, una solución salina al 0'9%. Para el tratamiento durante 24 días, se administró, la misma dosis de cocaína. Del mismo modo, a los controles se les inyectó solución salina al 0'9% durante el mismo tiempo.

3.2.2. TOLUENO

En todos los casos, la inhalación de tolueno se produjo en dos dosis diarias separadas durante dos horas, en las que los animales eran expuestos a más de 2000 ppm cada día de exposición al solvente. Las sesiones de intoxicación se mantenían hasta que las ratas alcanzaban todos los síntomas típicos de la intoxicación, prueba de que estaban lo suficientemente afectas por la inhalación al tolueno. La escala de síntomas y el tiempo de cada exposición se mostrarán en el apartado de resultados del presente trabajo.

La cámara de intoxicación fue fabricada siguiendo los parámetros descritos en el artículo de Hass y colaboradores (Hass *et al.*, 1999). Con las siguientes dimensiones: largo 30.5 cm, altura 30.5 cm y espesor del material de 6 mm, con capacidad para un volumen de 25 l. La cámara fue confeccionada de metacrilato transparente para observar los síntomas de intoxicación producidos por el tolueno (Fig.14).

Antes de comenzar con la intoxicación, se añadieron 20 ml de tolueno en el tubo conectado con una bomba que insuflaba aire en el tolueno líquido, produciendo vapores de solvente por toda la cámara de intoxicación. Con otros 5 ml se empaparon tiras de papel absorbente y se repartieron entre los tubos Corning situados en cada una de las esquinas de la cámara de intoxicación. En el momento de la intoxicación, el tolueno se añadió en tres de los 4 tubos Corning, dejando uno de ellos libre, para analizar si los

animales mostraban preferencia por esta esquina sobre las esquinas con el tubo Corning con tolueno.

Treinta minutos antes de empezar a intoxicar a los animales se conectaba la bomba para evaporar el tolueno, con la intención de saturar el ambiente con este solvente antes de colocar los animales, y se anotaba diariamente el volumen inicial, y el volumen consumido durante este tiempo, por lo que se conocía el volumen exacto antes de introducir los animales. Posteriormente, se introducían los animales para proceder a su intoxicación, y se anotaba el volumen evaporado durante el tiempo que estaban los animales en la caja. De igual modo, antes de iniciar la segunda sesión se anotaba el volumen de tolueno y se procedía del mismo modo tras finalizar la intoxicación. Así pues, se podía conocer con exactitud el volumen consumido en cada sesión y el volumen total de tolueno administrado diariamente. Tal y como se verá en el apartado de resultados de la presente tesis, el volumen de tolueno promedio empleado fue de $11,76 \pm 1,05$ ml para el experimento durante 24 días, y un volumen prácticamente idéntico de $11,77 \pm 0,05$ ml para el caso del experimento de tolueno durante 72 días.

En el suelo de la caja se colocó una doble malla con una inclinación de 1 cm sobre el suelo, para facilitar la recolección de la orina para los análisis posteriores y para evitar contaminaciones con las heces. Al final de cada exposición al tolueno se contabilizaban las heces totales y tras obtener la orina la caja era lavada con agua y etanol a 30°.

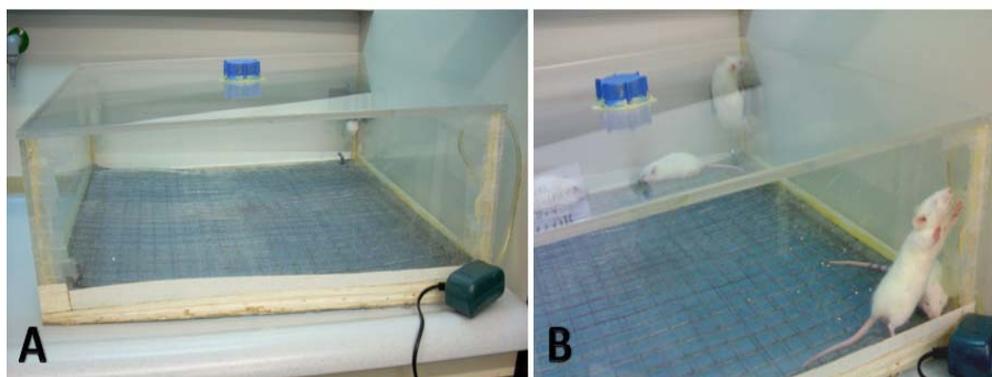


Figura 14. Fotografías de la cámara de intoxicación. (A) Fotografía de la cámara de intoxicación empleada para la exposición al tolueno, donde puede observarse la bomba empleada para la evaporación del tolueno que se colocaba en el tubo Corning presente en la imagen. Del mismo modo puede observarse la base de malla y el resto de Corning situados en las cuatro esquinas de la caja. (B) En esta imagen se observan las ratas durante una sesión de inhalación de tolueno. Cabe destacar su disposición mayoritaria en las esquinas, donde están situados los tubos que contienen tolueno, inhalando directamente del tubo que contiene la bomba o subiendo encima del tubo Corning para inhalar directamente su contenido.

Las investigaciones realizadas con tolueno se han separado en dos estudios diferentes. En el primer estudio realizado, que duró 24 días, fue realizado con el objetivo de abordar el estudio crónico de la administración con tolueno, siendo exactamente el mismo espacio temporal que el dedicado a los estudios crónicos con cocaína. Por último, el estudio dedicado al estudio del efecto del tolueno sobre el desarrollo del cerebro de ratas, se prolongó durante 72 días de inhalación con tolueno, que comprendió un tratamiento previo de las madres, el periodo de gestación y que duró hasta el día postnatal 21 de las crías.

Además, como prueba de la intoxicación por este solvente, se ha realizado un análisis del metabolito producido tras metabolizarse el tolueno, el ácido hipúrico, mediante la técnica de HPLC a partir de la orina recolectada diariamente.

Los controles se mantuvieron en una caja de las mismas dimensiones, durante los mismos tiempos que se mantenían las otras ratas en la cámara de intoxicación, y al igual que los animales tratados con tolueno, las ratas se trasladaron desde el animalario hasta el laboratorio donde se realizaban las intoxicaciones para que fueran expuestas a las mismas condiciones experimentales.

3.3. TRATAMIENTOS E INYECCIÓN DE BrdU

3.3.1. COCAÍNA

En el experimento 1 se analizaron los efectos de la exposición de cocaína durante ocho días sobre la **PROLIFERACIÓN** celular. El protocolo experimental se basó en un tratamiento con cocaína (cocaína hidroclorehidrica, 20 mg/kg, i.p.) durante ocho días consecutivos, administrándose una inyección por día (Fig.15). Fueron ocho las ratas tratadas con cocaína y otras siete las ratas a las que se les administró salina 0.9%. Ambos grupos recibieron siete pulsos de BrdU (40 mg/kg, i.p.) cada dos horas durante el último día de tratamiento (Fig.15). Las ratas se perfundieron dos horas después de la última inyección de BrdU.

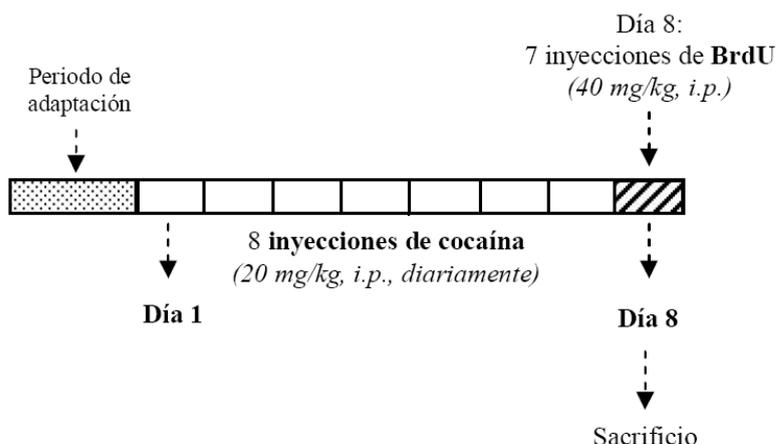


Figura 15. Diagrama del Experimento 1 – PROLIFERACIÓN. Esquema de la administración de cocaína durante 8 días consecutivos, y el último día se inyecta el marcador BrdU.

En el experimento 2 en el que se observaron los efectos de un tratamiento crónico con cocaína sobre la **SUPERVIVENCIA**, ocho ratas fueron inyectadas con cocaína (20 mg/kg, i.p.) durante 24 días consecutivos (con una inyección diaria) y del mismo modo, otras ocho ratas controles con solución salina 0.9%. El BrdU (40 mg/kg, i.p.) se proporcionó durante la primera semana de tratamiento, una inyección por día durante los primeros 7 días de la administración de la droga (Fig.16). Un día después de la administración de cocaína o salina, las ratas fueron perfundidas.



Figura 16. Diagrama del Experimento 2 - SUPERVIVENCIA. En este caso se administró cocaína durante un largo plazo (24 días) para el estudio de la supervivencia de las células del DG. En este caso, los siete pulsos de BrdU se producen durante la primera semana, un pulso por día.

El objetivo del experimento 3 de **MADURACIÓN**, es el análisis del efecto de la cocaína, sobre la maduración de las neuronas nacidas antes del tratamiento en el DG. Para ello, se establecen dos parámetros temporales, de 8 y 24 días, de inyecciones diarias de cocaína (20 mg/kg, i.p.) para un grupo de seis ratas y de salina 0.9% para cinco ratas. En este protocolo experimental el BrdU se administró, antes del tratamiento con la cocaína, en dos pulsos de 140 mg/kg, espaciados seis horas (Fig.17).

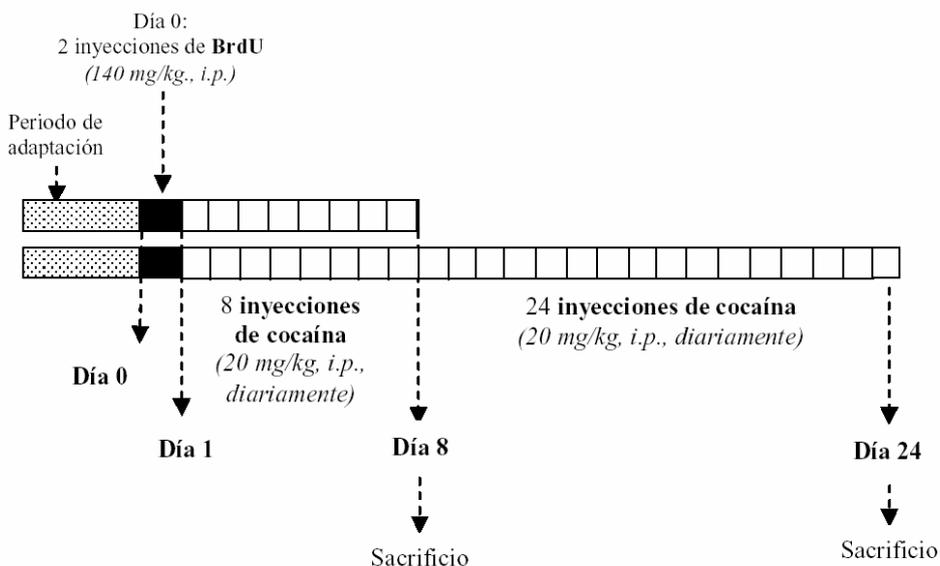


Figura 17. Diagrama del Experimento 3 - MADURACIÓN. Administración de cocaína durante un corto (8días) y un largo plazo (24 días) sobre la maduración de las células del DG. En este caso, los siete pulsos de BrdU se administran durante la primera semana, mediante un pulso por día.

Por último, se realizó el experimento 4 de **ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL** mediante microscopia electrónica de transmisión para observar las consecuencias de la administración de cocaína, sobre la citoarquitectura de la inervación que las fibras musgosas, proporcionan a la CA3. Se emplearon 4 ratas control con salina 0.9% y otras 4 ratas con cocaína (20 mg/kg, i.p.) durante 24 días consecutivos. Estas ratas no recibieron BrdU, y a diferencia del resto, se perfunden con glutaraldehído 2% paraformaldehído 2% en PB 0.1M un día después del tratamiento.

3.3.2. TOLUENO

Se realizaron dos estudios diferentes empleando el tolueno como droga adictiva.

En el primer estudio se analizó durante 24 días, el efecto crónico de la inhalación de tolueno. Para ello se realizaron tres experimentos diferentes, viendo el efecto del tolueno sobre la proliferación, supervivencia, la maduración y el efecto sobre la organización ultraestructural de las zonas neurogénicas tras la presencia de la droga.

En el otro estudio se analizó el efecto de la exposición a tolueno durante el desarrollo del cerebro. En este caso se realizaron experimentos para estudiar el efecto sobre la neurogénesis, tanto con las madres como con las

crías nacidas de ellas (experimentos sobre la neurogénesis); otros para estudiar las posibles modificaciones en la memoria tras la inhalación con tolueno (experimentos de conducta); del mismo modo que en el estudio anterior se observó si existía cualquier modificación en la organización ultraestructural del DG (experimentos de microscopía electrónica), y por último, se realizó un estudio de las posibles causas bioquímicas que producen el efecto observable en la neurogénesis, analizándose el estrés oxidativo presente en el tejido cerebral de las crías nacidas tras la exposición crónica al tolueno (experimentos de estrés oxidativo).

En todos los casos, el grupo control era trasladado del animalario al sitio de exposición y permanecían en una caja transparente de tamaño similar a la cámara de intoxicación, mientras las ratas del grupo tratado se sometían a las sesiones con tolueno, con el objetivo de que el estrés al que se sometía al grupo de animales tratado fuera el mismo que el del grupo control.

A continuación, se explicaran con detalle cada uno de los experimentos realizados empleando el tolueno como droga de estudio.

3.3.2.1. ESTUDIOS DEL EFECTO CRÓNICO DEL TOLUENO

En todos los experimentos detallados a continuación la exposición al tolueno se produjo durante 24 días, administrándose dos sesiones de inhalación diarias espaciadas cada dos horas, tiempo suficiente para la

recuperación completa del animal y la eliminación de la droga de su cuerpo. De este modo las ratas se sometían a exposiciones de más de 2000 ppm diarias.

La diferencia entre los experimentos realizados puede observarse en los diferentes momentos en los que se inyectó el marcador proliferativo BrdU. Así pues, en el primer experimento se administraron 4 pulsos de 70 mg/kg (cada 2 horas) un día después del tratamiento de 24 días con tolueno administrándose en 2 sesiones por día (Fig.18). Este experimento fue diseñado para analizar el efecto de esta droga sobre la **PROLIFERACIÓN** celular.

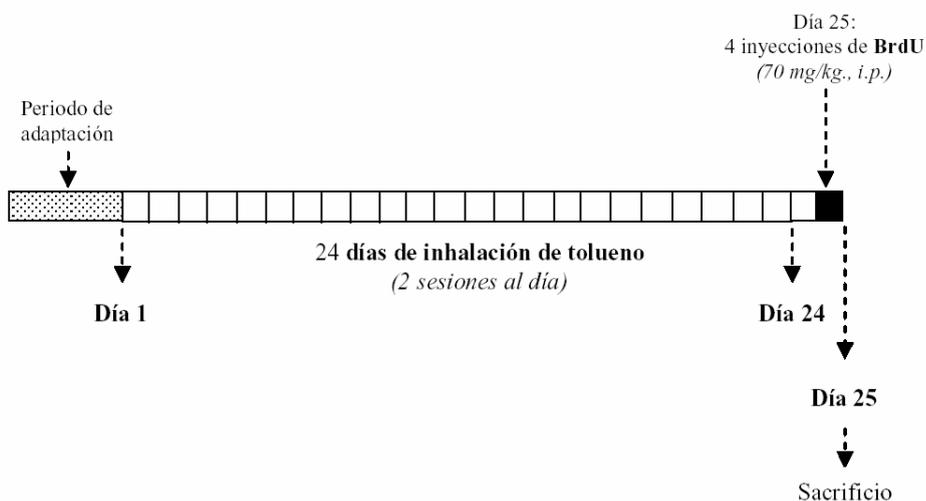


Figura 18. Diagrama del Experimento 1 - PROLIFERACIÓN. Exposición al tolueno durante 24 días (con dos sesiones al día), con un protocolo de administración de BrdU de 4 pulsos en un día con dosis de 70 mg/kg, aunque en este experimento se inyectó tras la intoxicación al tolueno, puesto que se quería marcar la capacidad proliferativa tras la inhalación crónica.

En el segundo experimento, donde se estudió el efecto del tolueno sobre la **SUPERVIVENCIA** se administró una inyección diaria de BrdU (40 mg/kg, i.p.) simultáneamente a la primera semana de exposición al tolueno (durante 24 días, con dos sesiones diarias). Un diagrama explicativo de este experimento se muestra en la Fig.19.

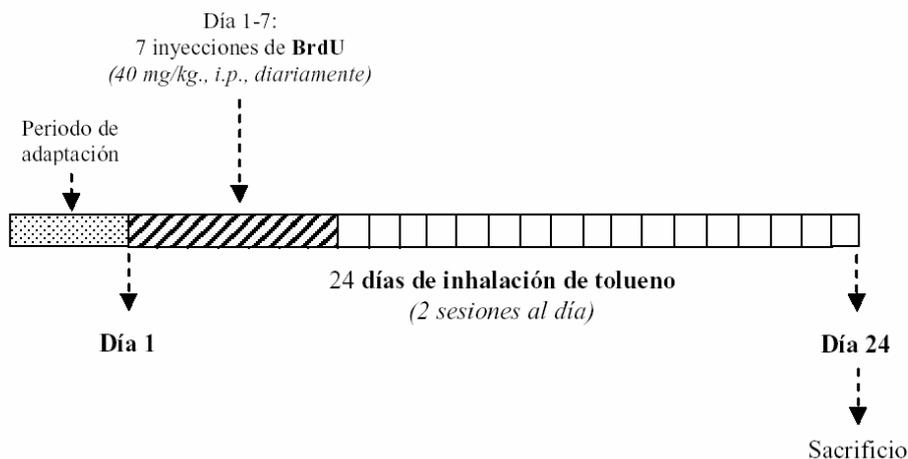


Figura 19. Diagrama del Experimento 2 - SUPERVIVENCIA. Protocolo de inhalación de tolueno durante 24 días, en dos sesiones al día, para el estudio de la maduración celular en el DG. En este caso, sólo se dio un pulso de BrdU de 40 mg/kg cada día durante la primera semana de exposición a la droga.

En el tercer experimento, destinado al estudio de la **MADURACIÓN** de las células marcadas tras la inhalación al tolueno, el BrdU se inyectó en 4 pulsos diferentes de 70 mg/kg (cada 2 horas), 1 día antes del tratamiento crónico con tolueno (Fig.20).

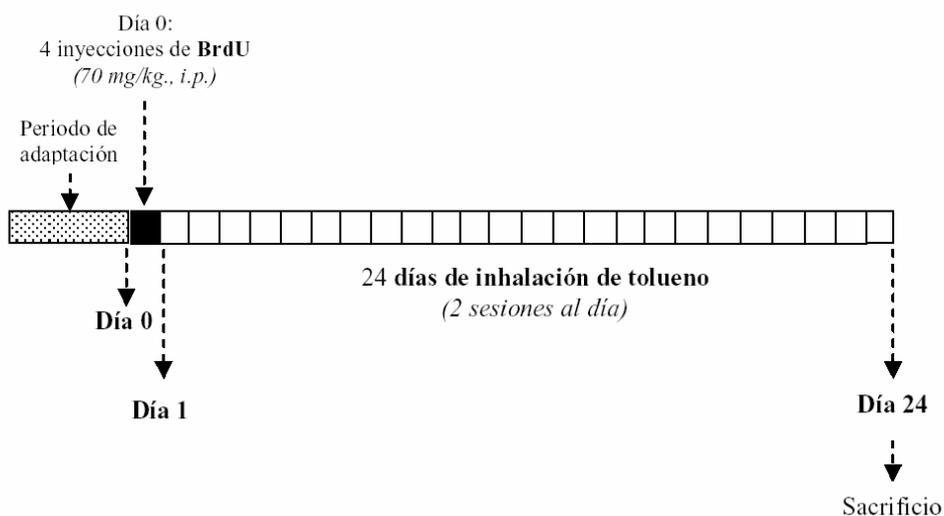


Figura 20. Diagrama del Experimento 3 - MADURACIÓN. Del mismo modo que en el caso anterior se administraron dos sesiones diarias de tolueno durante un largo plazo (24 días) para el estudio de la supervivencia. En este caso, se dieron 4 pulsos de BrdU (70 mg/kg) un día antes del tratamiento con la droga.

Por último, en el experimento dedicado al análisis de los **CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA**, se estudió el efecto crónico sobre la organización y el número de los diferentes tipos celulares situados en las zonas neurogénicas empleando el microscopio electrónico de transmisión,

con el objetivo de hacer un estudio comparativo de la diferente afectación de estas zonas por el tolueno. En este caso no se administró BrdU a los animales, puesto que no era necesario para la realización del objetivo programado.

3.3.2.2. ESTUDIOS DE LA EXPOSICIÓN DEL TOLUENO SOBRE EL DESARROLLO

En este estudio el objetivo fue analizar el efecto de la exposición a tolueno durante el desarrollo del cerebro. Para ello la inhalación al tolueno se prolongó durante 72 días, siendo éste un tratamiento crónico.

Durante este tratamiento se ha sometido a una exposición de las madres durante 37 días, con dos sesiones diarias de inhalación al tolueno. Tras este tiempo, las ratas (tanto las tratadas con tolueno como los controles) fueron cruzadas con ratas Wistar macho adultas durante una semana. Tras comprobarse que todas habían sido fecundadas, examinando la presencia de espermatozoides en la vagina del animal, se retomó la exposición al tolueno que había cesado durante la semana de cópula.

Durante el día 16 de gestación (tomando una medida promedio de fecundación para establecer el día 1), se administró BrdU inyectando intraperitonealmente 4 pulsos de 70 mg/kg , considerando que sería un marcaje tanto para las madres como para las crías, puesto que estaban

aproximadamente a la mitad del periodo de gestación. De este modo se preparaba el grupo adecuado para los experimentos sobre el efecto del tolueno **SOBRE LA NEUROGÉNESIS**.

Los partos tuvieron lugar tras 20-24 días, aproximadamente, después de observarse que estaban fecundadas. Durante la semana en la que se esperaba que los partos acontecieran, las ratas fueron vigiladas de forma continuada, puesto que existía el riesgo de que algunas de las crías que nacieran muertas fueran devoradas por sus madres. Además de esto, las sesiones de exposición a tolueno diarias continuaban con normalidad. Con la intensa vigilancia que se efectuó durante este periodo de partos, se consiguió detallar el número de crías nacidas tanto vivas como muertas, sus medidas corporales y craneales, su peso y fotografiar las anomalías aparecidas tras la exposición al tolueno. Todos estos parámetros se detallarán en el apartado de resultados de la presente tesis.

Tras los nacimientos de las crías, las madres continuaron siendo expuestas a las dos sesiones diarias de tolueno hasta que las crías llegaron a sus 21 días. Puesto que las madres continuaban enjauladas con sus crías, cuando ellas quedaban afectadas por el tolueno en la cámara de intoxicación, exponían al tolueno a sus crías a través de la leche materna.

Tras éstos 21 días, se produjo el destete, y fué a partir de aquí cuando se realizaron las pruebas de comportamiento, tanto con las madres como con las crías. Aunque ya no se administraron más sesiones de tolueno. Por tanto,

a continuación pasaremos a detallar cuáles fueron los experimentos **DE CONDUCTA** llevados a cabo.

➤ **Protocolo de campo abierto**

En este test las crías tenían una edad promedio entre el día 23 o 25 postnatal. Las madres también fueron sometidas a este test, siguiendo los mismos parámetros que las crías.

En esta prueba, previamente descrita con animales tratados con tolueno por Hougaard (Hougaard *et al.*, 1999), se pretendía analizar el nivel de actividad locomotora de los animales, para ello, se dejaban en el área central de uno de los 4 cuadrantes iguales en los que se había dividido una caja de 100 x 100 cm de metacrilato negro. La división de la caja permitía hacer el mismo test a 4 animales a la vez. Durante 3 días consecutivos se llevó a cabo una única sesión de 15 minutos/día. (Fig.21).

La prueba se realizaba en una habitación totalmente aislada y en silencio, sin la presencia de ningún experimentador, para no distraer la atención de los animales. De modo que los animales se grababan con el “software Viewpoint” de conducta, que dibujaba automáticamente el recorrido que realizaba cada animal durante la prueba, dando resultados de la distancia recorrida incluso cada milisegundo.

Se pretendía cuantificar la distancia que recorría cada animal, segundo a segundo, teniendo la posibilidad de moverse libremente por una zona disponible, como era su cuadrante, que nunca había explorado con anterioridad. Posteriormente se establecerían diferencias entre el grupo control y los animales tratados con tolueno, tanto de las madres como de las crías.

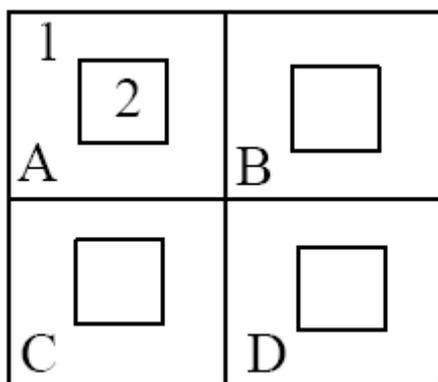


Figura 21. Representación esquemática de los cuadrantes utilizados para la prueba de campo abierto. Cada cuadrante recibía el siguiente nombre A (cuadrante 1), B (cuadrante 2), C (cuadrante 3) y D (cuadrante 4). El número 1 corresponde al área total del cuadrante y el número 2 al área central donde se dejaba el animal.

➤ **Protocolo de reconocimiento de objetos**

En este caso los animales tratados fueron tanto las madres como las crías, con una edad entorno a los P26a P28. El test se realizó en la misma caja de metacrilato que en la prueba anterior, en la misma habitación y sin la

presencia del experimentador, y siguiendo los procedimientos previamente descritos por Mumby y su equipo (Mumby *et al.*, 2002). Además, los animales fueron grabados y los resultados se analizaron a partir de los videos obtenidos.

Este test comprendía un periodo de habituación de los animales a la mitad de los objetos, que les fueron mostrados durante 5 minutos, 3 veces en un mismo día, justo el día anterior a la realización de la evaluación del test. Se les mostraron los objetos en su misma caja de estabulación, permitiendo que los olieran y tocaran con total libertad, estos objetos serían llamados objetos conocidos. La otra mitad de objetos no se les mostraba en ningún momento antes de la evaluación del test en la caja, por lo que serían totalmente nuevos para el animal. El periodo de habituación a la caja de metacrilato no fue necesario ya que previamente habían realizado la prueba de campo abierto en la misma caja.

Durante la evaluación del test, se colocó a los animales en el centro del cuadrante de la caja (área 1, Fig.21), y durante 5 minutos se le permitió olfatear y tocar los objetos que aparecían en diagonal en el mismo cuadrante. A continuación, se sacaba el animal de la caja de metacrilato y se le devolvía a su caja de estabulación durante 15 minutos. Después de este tiempo se les volvía a colocar en el área central del cuadrante y durante tres minutos se les permitía observar los objetos. En este segundo contacto, uno de los objetos había sido cambiado, por un objeto nuevo para el animal, es decir, el animal que antes estaba expuesto a dos objetos que le resultaban

conocidos (puesto que los había explorado durante la habituación), en el segundo contacto se le exponía a un objeto nuevo (nunca visto antes), y al conocido que mantenía la misma posición (Fig.22).

En este caso, se media tanto el tiempo dedicado a la exploración de los objetos como las veces que la nariz del animal entraba en contacto con el objeto (en este caso no se contaba el tiempo sino los eventos discretos del contacto). Además, para confirmar los resultados obtenidos para el tiempo de observación de los objetos se empleó el índice de memoria, descrito por Engel y su equipo (Engel *et al.*, 2006) como el tiempo que el animal observa el objeto novel dividido entre el tiempo total que está explorando ambos objetos, expresado en porcentaje.

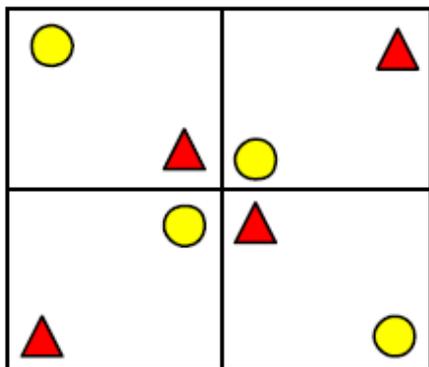


Figura 22. Representación esquemática de la posición de los objetos para la prueba de reconocimiento de objetos. Se muestra la posición de los objetos en cada cuadrante, como puede observarse situados siempre en diagonal. El objeto amarillo y redondo corresponde al objeto conocido y el objeto rojo y triangular al objeto nuevo para el animal. Las posiciones de los objetos estaban balanceadas para evitar cualquier posible preferencia del animal por la posición de un objeto en concreto.

➤ **Protocolo de reconocimiento de lugar**

En este caso, el protocolo experimental se realizó bajo las mismas condiciones que el protocolo de reconocimiento de objetos, y siguiendo las directrices de los estudios de Mumby (Mumby *et al.*, 2002). Únicamente se establecen dos diferencias respecto al test anterior. La primera, fue que en este caso se empleaban siempre objetos conocidos y el cambio se producía en la posición del objeto. Concretamente, se movieron los objetos de la diagonal que podían explorar durante los 5 minutos del primer contacto, hasta situar uno al lado del otro, moviendo únicamente uno de ellos y conservando la posición del otro objeto, para su segundo contacto durante 3 minutos. Las posiciones se modificaron tal y como puede observarse en la figura 23.

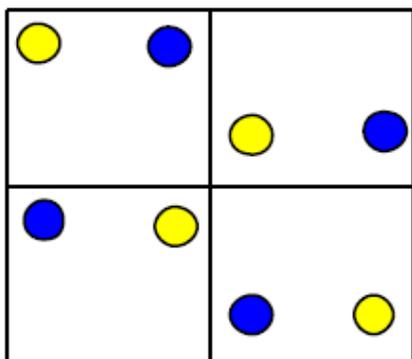


Figura 23. Representación esquemática de la posición de los objetos para la prueba de reconocimiento de lugar. Se muestra la posición de los objetos en cada cuadrante durante el segundo contacto del animal con el test, es decir, cuando el objeto se ha cambiado de posición. El objeto amarillo corresponde al objeto que queda siempre en el mismo lugar y el objeto azul es el objeto que cambia su posición desde la diagonal hasta pasar al mismo al lado del objeto que no ha sido movido.

La segunda modificación, consistió en que se colocaron claves espaciales, tanto dentro de la caja, en las paredes de cada cuadrante (Fig.24), como en las paredes de la habitación próximas a la caja, donde se situaron diferentes claves contextuales.



Figura 24. Claves espaciales empleadas para la prueba de reconocimiento de lugar. A continuación se muestran las claves contextuales presentes en el interior de la caja de metacrilato donde se realizó la prueba de reconocimiento de lugar. Todas ellas fueron claves simples, para facilitar su discernimiento por parte del animal.

En todas las pruebas experimentales se contaron las heces que cada rata producía durante los test, para evaluar el nivel de estrés al que era sometida, para posteriormente, comparar el estrés de las ratas tratadas con sus controles.

Además de los experimentos neurogénicos y de conducta se realizaron otros para el análisis de la **ULTRAESTRUCTURA CELULAR** mediante microscopía electrónica de transmisión, con la finalidad de observar si la exposición crónica de tolueno afectaba a la organización de lo que se conoce como nicho neurogénico del DG (Álvarez-Buylla y Lim, 2004; Quiñones-Hinojosa *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007), a la organización de las capas del DG, a la morfología celular y al número de células de microglía.

Se realizaron experimentos para estudiar el efecto del **ESTRÉS OXIDATIVO** en la orina recolectada diariamente, puesto que, por lo general, ésta es la principal causa bioquímica a la que apuntan los efectos de las drogas sobre la neurogénesis tras una exposición crónica (BashKatacova *et al.*, 2006; Cunha-Oliveira *et al.*, 2008). Para ello se analizó el nivel del metabolito 8-dGua, mediante LC/MS/MS, tal y como se explicará más adelante.

En la siguiente figura se muestra un esquema de los experimentos realizados con los animales destinados al estudio de la administración del tolueno durante 72 días, tanto para los experimentos realizados con las madres como con los realizados con las crías (Fig.25).

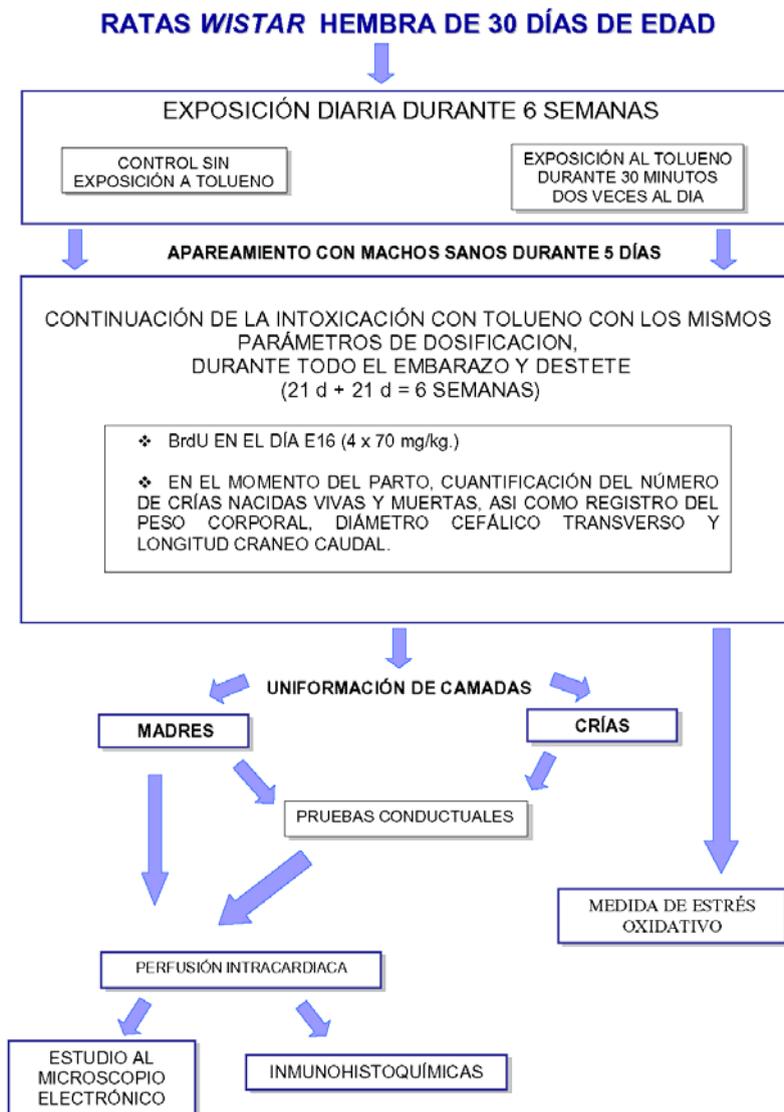


Figura 25. Protocolo experimental para el estudio del efecto del tolueno durante el desarrollo. Pueden observarse todos los pasos seguidos durante el procedimiento experimental, se detallan tanto los animales empleados, dosis de las drogas utilizadas, como los estudios realizados tras la intoxicación con tolueno.

3.4. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

El método elegido para la fijación de las estructuras fue la perfusión transcardiaca de los animales, realizadas a diferentes tiempos, según el protocolo de cada experimento. Para ello, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal subletal de pentobarbital sódico (50 mg / kg), previa toracotomía y colocación del catéter en el ventrículo izquierdo, se procedió a administrar una solución de solución salina, elaborada con cloruro sódico al 0'9% en agua destilada. El paso de la solución salina arrastra toda la sangre del lecho vascular. Cuando el flujo que sale por la aurícula derecha tiene aspecto totalmente transparente, es un buen indicativo de que es el momento adecuado para acabar con el paso de la solución salina y empezar con la solución fijadora.

A continuación se administró la solución fijadora, en este caso se emplearon dos esquemas diferentes, ya que algunas muestras se observaron al microscopio óptico y otras al microscopio electrónico de transmisión. Para una caracterización inmunohistoquímica y posterior observación en el microscopio óptico, la fijación de los sustratos se realizó con paraformaldehído al 4%. En cambio, en el caso de las muestras destinadas a microscopía electrónica de transmisión, se empleó una combinación de dos fijadores, paraformaldehído al 2% junto con glutaraldehído al 2,5%, ambos fijadores se disolvieron en tampón fosfato 0'1M y pH=7.4. La referencia adecuada para saber cuando el animal está suficientemente fijado es la rigidez del cuello y de las extremidades superiores. El fijador se utiliza para

mantener el tejido de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado in vivo, aumentando así su dureza. Por último, se procedió a realizar la extracción del cerebro para su procesamiento histológico.

3.4.1. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

En los experimentos destinados al estudio de los efectos de la cocaína se realizaron cortes con un grosor de 25 μm en el criostato (Microm HM 550) (-20°C). Antes del corte, los cerebros fueron incluidos previamente en un medio de montaje específico (OCT), procediendo al corte, y recolectando aquellos cortes que se obtenían desde los BO hasta el hipocampo posterior. Para el estudio de los cerebros de los experimentos de inhalación de tolueno, estos se cortaron por vibratomo (Leica VT 1000S), con secciones de 40 μm , bajo las mismas coordenadas referidas con antelación y colocados en botes que contenían tampón 0'1M PB- Azida (0'1%). Los cortes de criostato y vibratomo fueron repartidos en 6 series, paralelas entre sí, para su estudio inmunohistoquímico posterior.

Inmunohistoquímica HRP-DAB

Para todas las inmunohistoquímicas de HRP-DAB, los cortes flotantes fueron lavados con PB 0'1M, tres veces durante 5 minutos, para eliminar restos de la solución anterior. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con metanol al 10% y H₂O₂ 3%, preparada con tampón PB 0'1M, con Tritón X-100 al 0'2%, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Después de consecutivos lavados con PB 0.1M, se les añadió suero de bloqueo de la especie en que la que estaba hecho el anticuerpo secundario preparado en tampón bloqueo, para evitar las posibles uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron los cortes durante toda la noche a 4° C, con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso. Seguidamente, se efectuaron más lavados con tampón PB 0'1M con Tritón X-100 al 0'2%, para eliminar el exceso de anticuerpo primario restante y después se incorporó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, que se diluyeron en PB 0'1M con Tritón X-100 al 0'2% durante una hora. El siguiente paso consistió en amplificar la señal con el complejo avidina-biotina-HRP (Kit ABC, Vector, CA, USA). Por último, se revelaba con DAB-H₂O₂.

En la inmunohistoquímica de BrdU, se modificó el protocolo general añadiendo HCl 2 N a 36° C, y posteriormente los cortes se trataban con ácido bórico 0.1 M, para neutralizar el ácido.

En algunas ocasiones los cortes se contrateñían con azul de toluidina 1%, para mejorar la visualización del DG del hipocampo.

Los cortes se montaron en portas previamente gelatinizados y se dejaron secar hasta el día siguiente. Una vez secos se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente 70%, 90% y 100% durante 3, 3, y 5 minutos respectivamente. Tras la deshidratación los cortes permanecieron en xileno, al menos 5 minutos, y se montaron con “Eukitt”. Todas las inmunohistoquímicas reveladas con DAB, que han sido realizadas en el presente trabajo, han sido observadas en un microscopio de campo claro Nikon Eclipse E200, y para los casos en los que se ha empleado la cámara clara, ésta estaba acoplada a un microscopio, modelo Olympus CH30.

Inmunohistoquímica de fluorescencia

En las inmunohistoquímicas de fluorescencia, se usaron como anticuerpos secundarios aquellos que estaban conjugados con fluoróforos como el Texas Red, el Cy5, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 647, etc. Aunque siempre teniendo en cuenta que el anticuerpo secundario debe reconocer a la especie animal en la que esté elaborado el anticuerpo primario, para unirse a él de manera específica).

En algunos casos se empleó un marcador de núcleos celulares, el DAPI (Sigma-Aldrich), que se preparó en agua destilada milliQ, y en el que se dejaron incubar los cortes durante 15 minutos, para posteriormente hacer dos lavados con agua destilada.

En el caso de la fluorescencia los cortes también se montaron sobre los portas gelatinizados como se ha explicado anteriormente, y rápidamente, sin

dejarlos secar, se cubrieron empleando “Fluorsave” como medio de montaje adecuado para la fluorescencia.

Para el estudio de la muerte celular, se examinaron las cuerpos apoptóticos por el método del TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferasemediated dUTP nick end-labeling”), con el kit de detección de muerte in situ (“Dead End Fluorometric TUNEL System”, Promega), o bien, mediante inmunohistoquímica de la caspasa 3.

Para el analisis de las inmunohistoquimicas por fluorescencia, se utilizó el microscopio de fluorescencia (Leica DM 6000 B), con cámara Leica DFC 480 (color), y Leica DFC 350 (blanco y negro). En los casos en los que se necesitaba obtener mayor precisión en las inmunohistoquímicas fluorescentes realizadas se empleaba el microscopio confocal. Todas las imágenes se obtuvieron mediante un método secuencial, con la finalidad de evitar en lo posible cualquier tipo de señal cruzada entre los canales. Para ello se ha contado con dos equipos diferentes, el microscopio confocal de modelo Leica LCS-SP, bajo la supervisión del personal del “Servei Central de Suport a la Investigació Experimental” (SCSIE) de la Universitat de València para los trabajos realizados con la cocaína. En cambio, los estudios con tolueno se realizaron con el microscopio confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, cuyo modelo es Leica TCS SP2 AOBS, y contando con la excelente asistencia técnica del personal del servicio de este centro.

3.4.2. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para el procesado de las muestras al microscopio electrónico se realizó el siguiente protocolo de inclusión, en el cual tras la postfijación realizada con el tetraóxido de osmio 2% durante 2 h, en oscuridad y temperatura ambiente, se realizaron lavados con H₂O destilada para eliminar el osmio, y a continuación la muestra se sometió a una deshidratación. Se pretendía lograr el reemplazo del medio acuoso utilizando una serie gradual de concentraciones crecientes del agente deshidratante. La serie comenzó con una concentración de 30° seguida por 50°, 70° de etanol. Tras estos lavados se le dio contraste a la muestra utilizando el acetato de uranilo al 2% en alcohol de 70°, éste reaccionó lentamente con el etanol por lo que se dejó que actuara durante 2h 30' en nevera. Tras el contraste se continuó con la serie de deshidrataciones de los alcoholes, partiendo del alcohol de 70°, para seguir con los baños en alcoholes de 96° y 100°, hasta pasar a los lavados con el óxido de propileno, utilizando este disolvente como solvente de transición. El siguiente paso fue cambiar las muestras con un pincel desde la solución del disolvente a la resina epoxi empleada, la araldita (Durkupan, Fluka), donde se mantuvieron en agitación y en oscuridad durante toda una noche. Tras este periodo de incubación se metieron las muestras entre acetatos y se dejaron polimerizar durante 3 días en estufa de 70°, tras los cuáles las muestras estaban listas para su posterior corte. Una vez polimerizadas, las muestras se obtuvieron cortes semifinos con un grosor de 1,5 µm, y cortes ultrafinos cuyo grosor es de 70 nm con un ultramicrotomo

Leica Ultracut UCT, con el ocular de Leica MZ6. Los cortes semifinos fueron contrateñidos con azul de toluidina para su análisis y los cortes ultrafinos se montaron en rejillas de cobre de ojal recubiertas con formvar y teñidas con citrato de plomo de Reynolds, para su posterior análisis en el microscopio electrónico FEI Tecnai Spirit, con una magnificación de imágenes de 2K a 20K obtenidas con una cámara de alta resolución (“Morada Preview”), y analizadas posteriormente con dos programas software diferentes, con el “Image Tool 3.0” y con el programa “AnalySIS” (iTEM FEI).

3.5. ESTUDIOS CON LC/MS/MS: MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y DE LA INTOXICACIÓN POR TOLUENO

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para detectar la peroxidación lipídica es la determinación de sus metabolitos mediante cromatografía líquida de masas (LC/MS/MS). Este tipo de determinación directa y cuantitativa, es un método mucho más sensible que los métodos derivativos o indirectos de los kits, basados en la gran capacidad del metabolito de estudio, de reaccionar con otras moléculas, dando lugar a compuestos secundarios con alguna característica especial (fluorescencia, volatilidad, color, etc.) que permitan su cuantificación. Por ello, en la presente tesis se ha empleado el método más sensible para la detección del metabolito 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdGua), como bioindicador o biomarcador de la presencia de estrés oxidativo, además de emplear esta misma técnica de MS/MS para el análisis de uno de los metabolitos secundarios producidos tras el metabolismo del tolueno, el ácido hipúrico.

La técnica de HPLC/MS/MS, ya ha sido empleada para la medida de 8-OHdGua en orina, como indicador de estrés oxidativo, como en el estudio de Chien (Chien *et al.*, 2005), para el caso de humanos expuestos al mercurio, e incluso, se han elaborado estudios similares a los que se presentan en esta tesis, en los que se analizó la presencia de 8-OHdGua tras la exposición de un grupo de ratas al tolueno durante 7 días (con una dosis de 1500 ppm, durante 4h por día). Del mismo modo, también se han

encontrado estudios que emplean la técnica de MS/MS para la detección del ácido hipúrico (Szúcs *et al.*, 2002, Kumagai y Matsunaga, 1997).

La metodología empleada para el análisis de la orina de las ratas expuestas al tolueno durante los dos experimentos, fue la que se utiliza normalmente en este tipo de análisis. De este modo, en primer lugar se centrifugó la orina recolectada con la intención de eliminar impurezas y además se filtró para impedir posibles obstrucciones en el aparato de medida. A continuación, se procedió al desarrollo del protocolo experimental típico para los procedimientos con el LC/MS/MS, tanto para las muestras, blancos como para los patrones. Así pues, se obtuvo una recta patrón con concentraciones desde 0.002 microM a 5 microM.

Para la precisión del sistema se evaluaron tres parámetros: tiempo de retención, área y altura, hallándose un coeficiente de correlación $r=0,95$ para el metabolito de ácido hipúrico y una $r=0,99$ para el 8-OHdGua.

Se utilizó un equipo LC-10AD, marca Shimadzu, con un “Micromass QuattroTM triple-quadrupole mass spectrometer” (Beverly, MA, USA), con inyector automático. El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente de ionización por electro-espray (“Z-spray electrospray ionization source”). La columna cromatográfica empleada fue de Teknokroma (3 μ m, 5 x 0.21), utilizando los parámetros de flujo, temperatura, resolución y evaporación estandarizados por el Servicio de HPLC /MS/MS de la Universitat de València.

Las condiciones típicas de operación fueron: sistema isocrático, flujo 0,2 mL/min, volumen de inyección 20 μ l, los espectros fueron adquiridos mediante una reacción monitorizada de ionización múltiple en positivo y negativo (MRM) con un retraso inter-canal de 0.02 s. La fase móvil fue metanol al 100% grado HPLC.

3.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS

La cuantificación de las inmunohistoquímicas se realizó en ciego en todos los casos estudiados, con un microscopio Nikon Eclipse E800, contando entre 6-8 secciones seriadas del hipocampo del animal. Las células positivas de cada marcador por sección fueron sumadas y se obtuvieron las medias para cada uno de ellos. En algunos casos se contaron los grupos de tres o más células que aparecen superpuestas (“clusters”) para este marcador y para el Ki-67.

En los experimentos con el marcador BrdU, las células positivas se dividieron en dos grupos, las células situadas en la capa subgranular y las que se encontraban en la capa granular del giro dentado.

Para el análisis de las inmunohistoquímicas de DCX en los experimentos de maduración, se dibujaron 100 neuronas con cámara lucida, seleccionadas al azar a lo largo de todo el DG, es decir, con zonas anteriores, medias y posteriores (He *et al.*, 2005) (Fig.26). A partir de las imágenes obtenidas se determinó tanto la longitud del total del árbol dendrítico desde el *perikarion*, medida con un software de análisis de imagen (“AnalySIS”, Leica), como el número de dendritas que parten del soma, estos datos se verificaron en imágenes de fluorescencia obtenidas en el microscopía de fluorescencia confocal.

Para esclarecer el número de dendritas se consideró, como la dendrita primaria, la que surgía directamente del soma, que poseía mayor longitud, y

de la que partían el resto de arborizaciones. La arborización secundaria es la que nacía directamente desde la primaria, la terciaria correspondería a la que surge de la dendrita establecida como secundaria, siguiendo el mismo criterio para las dendritas cuaternarias encontradas. Se realizaron los mismos análisis con los animales expuestos a las drogas que con los controles para establecer posteriormente las diferencias observables, tal y como puede apreciarse en la figura siguiente (Fig. 26).

Posteriormente se clasificaron las 100 neuronas DCX+ dibujadas según su desarrollo dendrítico en 5 tipos diferentes, siendo el tipo 1 (I) el correspondiente a una célula muy simple, con una única rama y de pequeño tamaño; el tipo 2 (II) con mayor tamaño que el anterior podía presentar una única rama o dos a la suma; el tipo 3 (III) generalmente poseía dos ramas y mayor tamaño que el tipo 2; siguiendo el orden ascendente de tamaño el tipo 4 (IV) poseía mayor longitud del árbol dendrítico y, por último, el tipo 5 (V) sería el que correspondería el mayor árbol dendrítico; además los tipos 4 y 5 serían los que poseían dendritas secundarias, terciarias y cuaternarias.

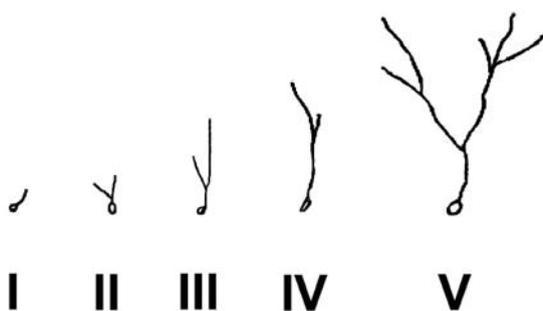


Figura 26. Categorías establecidas a partir de la expresión de DCX. Se clasificaron las neuronas según su arborización dendrítica, considerando la longitud y número de ramificaciones. Siendo el tipo 1 (I) el menos desarrollado y el tipo 5 (V) el que tiene un mayor desarrollo del árbol dendrítico.

Para el análisis de la microglía se utilizó el marcador OX-42. La determinación del grado de activación de la microglía se realizó dibujando 100 células con la cámara clara (Fig.27), midiendo la expansión del árbol dendrítico con una plantilla de aros concéntricos separados cada 1 μm . De manera que, se contó las veces que la dendrita era cruzada por una aro concéntrico, para evaluarse la media de cruces del total de neuronas dibujadas por animal. Posteriormente se clasificó en categorías de activación todas las microglías dibujadas, para comparar las categorías obtenidas en animales tratados y controles. El mismo método fue publicado por González-Pérez y colaboradores, y ha sido empleado en otros trabajos (González-Pérez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). Se siguió la escala de categorías de activación de la microglía descrita en la figura siguiente para la clasificación.

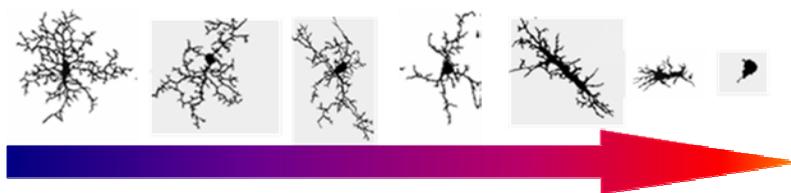


Figura 27. Categorías establecidas a partir de la inmunohistoquímica de OX-42. Se clasificaron las células de microglía según su nivel de activación. De este modo se observa que las células menos activas son aquellas que poseen una mayor extensión del árbol dendrítico, y las más activas son las de tamaño más reducido, sin apenas árbol dendrítico aparente, puesto que se ve compactado en el soma. La flecha de debajo de las células dibujadas indica el sentido de activación de la microglía, indicando el azul una menor activación y el color rojo la activación máxima.

En las inmunohistoquímicas fluorescentes se contaron las células totales presentes en el DG, posteriormente las células marcadas con cada fluorocromo refiriéndolas respecto al total de células, y a continuación las células que se marcaban con varios fluorocromos a la vez, es decir, aquellas que eran dobles o triplemente marcadas, también refiriéndolas a las células totales. Para corroborar que las células se contaban adecuadamente, se hicieron recuentos en varios niveles de plano focal (planos Z), de cada imagen obtenida al microscopio confocal, observando cuando una célula aparecía y desaparecía en cada plano Z, para no producir un error de conteo por defecto o exceso. Aunque el análisis de las inmunohistoquímicas se basó en el conteo de células, los datos se confirmaron analizando la intensidad de color de cada marcador fluorescente, para ello, durante la captura de imágenes, se mantuvieron siempre las mismas condiciones experimentales en el confocal. Además de esto, siempre se realizaron los conteos en ciego y se estudiaron varios hipocampos (varios cortes), del mismo animal, para posteriormente obtener una media por cada uno de ellos, y después una media para cada tratamiento experimental.

Para los estudios de las inmunohistoquímicas de GFAP y BrdU/NeuN, a partir de imágenes de un solo plano óptico, se midieron los niveles de fluorescencia empleando como medida los “ROI’S” (regiones de interés) de fluorescencia y utilizando el programa Methamorph versión 7.0, cedido por el Servicio Confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe. En el programa se establecía una intensidad de color correspondiente al ruido de fondo, para que el programa valorara la intensidad de la fluorescencia en el

área seleccionada (únicamente el DG) por encima del ruido. Estos valores de intensidad se median en píxeles (“ROI’S píxeles”). El hecho de poder eliminar en todas las imágenes el mismo ruido de fondo (tanto en todos los planos del mismo animal, como entre animales) y correlacionar la marca de DAPI como una constante que permite evaluar la expresión de marcadores inmunohistoquímicos, y así, poder calcular la porción de expresión por área de interés cada vez, esto permite que el estudio sea lo suficientemente riguroso como para que sus resultados sean aceptables. De este modo, se ha obtenido un índice de intensidad de fluorescencia basado en la fluorescencia del marcador expresado en una población celular concreta entre la población total de células (Chen *et al.*, 2006).

En el caso de los experimentos al microscopio electrónico, se realizaron estudios diferentes para cada droga estudiada. Así en el caso de la cocaína se cuantificaron diferentes características de los botones, estableciendo las siguientes categorías de análisis: área total del botón, área de las espinas dendríticas, área cubierta por vesículas sinápticas, área ocupada por zonas activas, número de zonas activas, área mitocondrial, y por último, el número de mitocondrias. En cambio, para los estudios con tolueno se analizaron los nichos neurogénicos, tanto de la SVZ como del DG, midiendo los diferentes tipos celulares y refiriéndolos para el total del área estudiada.

Los resultados obtenidos de los conteos de las inmunohistoquímicas, las pruebas de conducta, al igual que los del experimento de microscopía electrónica, se analizaron mediante el test de ANOVA, mientras que los

obtenidos de la categorización dendrítica se evaluaron mediante test no-paramétricos (test de KolmogoroveSmirnof), en todos estos casos se empleó el programa “Statview 5.0”. Además se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, para los análisis en los que se empleó el test T-student. En todas las gráficas se muestra la media de cada grupo junto con el error estándar (SEM) para el ajuste de las barras de errores.



RESULTADOS



CAPÍTULO – 4: RESULTADOS

4.1. COCAÍNA

4.1.1. EXPOSICIÓN

La exposición a la cocaína no produjo cambios bruscos de peso corporal, ni modificaciones físicas aparentes, aunque sí se produjeron ciertos cambios en la conducta de los animales expuestos a la cocaína, observándose hiperactividad y mayor excitabilidad en los animales tratados con esta droga.

No se observaron cambios macroscópicos en la estructura del hipocampo entre los animales controles y los tratados. Ni defectos aparentes en la organización celular de las diferentes capas que componen el hipocampo.

4.1.2. PROLIFERACIÓN

El tratamiento con cocaína durante 8 días, produce una reducción en las células BrdU+ del 36% [$F_{(1,13)} = 9.615$, $P = 0.008$], comparado con los controles, el mismo porcentaje de reducción se encontró para los grupos de células BrdU+ [$F_{(1,13)} = 6.976$, $P = 0.020$], considerando como grupos de células cuando se presentan muy juntas tres o más células marcadas (Fig.28).

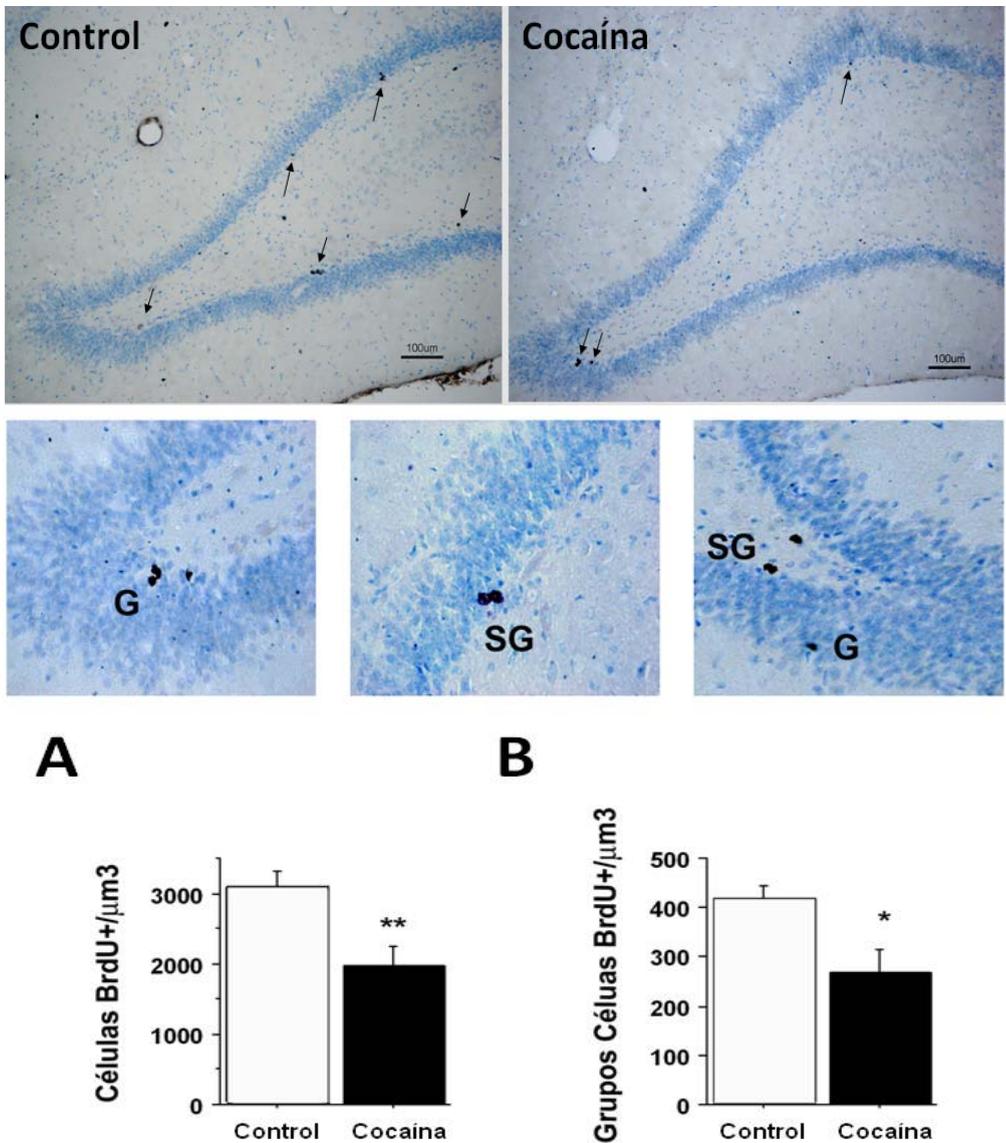


Figura 28. Efecto de la cocaína sobre la proliferación celular. Las fotos muestran inmunohistoquímicas representativas de células BrdU+ en los animales control y los tratados (las flechas señalan las marcas BrdU+), y las ampliaciones donde pueden verse células BrdU+ tanto en la capa granular (G) como en la subgranular (SG), las dos primeras ampliaciones hacen referencia a animales con cocaína y la última ampliación a un animal control. (A) También se muestran los diagramas de barras donde se observa una disminución significativa en las células BrdU+ y (B) entre los grupos con tratamiento y los controles. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Tal y como se muestra en las fotos de BrdU se encontraron grupos de células marcadas tanto en la capa granular como en la subgranular. Por tanto, se observó una distribución homogénea entre las capas del DG, tanto en las células individuales marcadas como en los grupos celulares.

Para confirmar los datos obtenidos con BrdU, se usó el marcador endógeno Ki-67. Aunque los datos no fueron significativos estadísticamente, debido a la variabilidad de los datos, el porcentaje de reducción para las células Ki-67+ es del 34% ($[F_{(1,12)} = 2.989, P = 0.109]$), similar al obtenido con el BrdU y del 29% contabilizado para los grupos de células Ki-67 ($[F_{(1,12)} = 3.002, P = 0.109]$) (Fig.29).

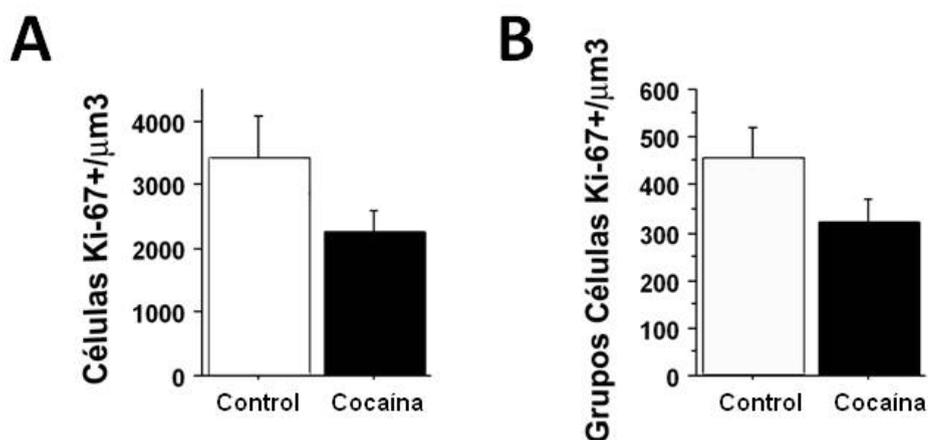


Figura 29. Efecto de la cocaína sobre el marcador Ki-67. En las gráficas se observa el descenso en el número de células Ki-67+ (A) o para los grupos de células Ki-67 (B) de los animales tratados con cocaína, aunque los datos no fueron significativos.

A la vista de los resultados obtenidos para los marcadores de BrdU y Ki-67, podemos concluir que, la exposición de cocaína a corto plazo (8 días) reduce la proliferación celular en el DG.

4.1.3. SUPERVIVENCIA

En este protocolo las inyecciones de BrdU se dieron durante la primera semana del tratamiento con cocaína, y después se continuó con la administración de cocaína durante 17 días más, siendo un total de 24 días de exposición.

En primer lugar, se estudiaron los efectos sobre la supervivencia a partir del marcador de BrdU, y no se vieron diferencias significativas [$F_{(1,14)} = 1.110$, $P = 0.309$] entre ambos tratamientos, aunque si que se producen una reducción del 28,85 % (Fig.30). Por tanto, la cocaína no disminuye la supervivencia de las nuevas células generadas en el DG. Las células marcadas con BrdU se situaban principalmente en la capa granular del hipocampo, siendo un 70% más las células BrdU+ presentes en la capa granular que en la capa subgranular.

Además, se analizó la proliferación a partir del marcador de Ki-67, observándose una reducción del 35%, y diferencias estadísticamente significativas entre los tratados con cocaína y los controles [$F_{(1,14)} = 11.040$, $P = 0.005$] (Fig.30).

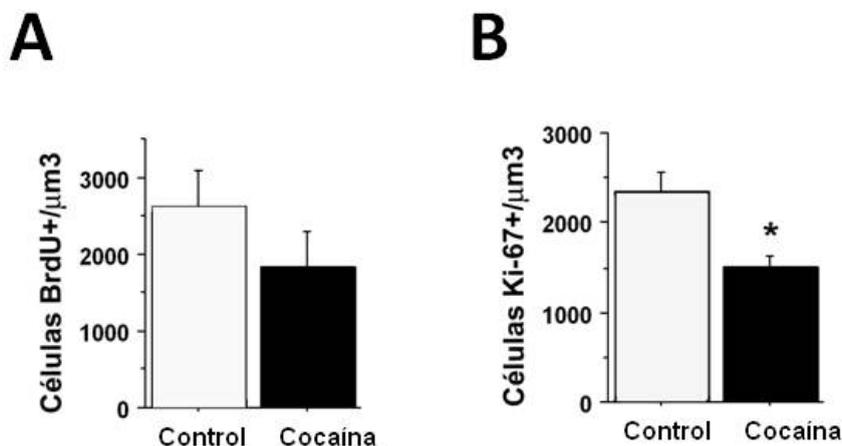


Figura 30. Efectos de la cocaína sobre la supervivencia celular. No se muestra efecto sobre la supervivencia, ya que no existe una diferencia significativa en el BrdU+ tras 24 días de tratamiento con cocaína (A), y en la gráfica B se muestra el descenso en el marcador Ki-67+, tal y como se esperaba debido a la reducción en la proliferación.

A la vista de los resultados podemos concluir que la exposición a largo plazo no afecta a la supervivencia. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que administramos conjuntamente BrdU y cocaína. Este hecho, nos impide diferenciar el efecto de la droga sobre la proliferación y la supervivencia celular, debido a que las células marcadas por primera vez con el BrdU, se veían afectadas tanto en su fase de proliferación como en su posterior fase de supervivencia. Para poder diferenciar los efectos se realizó otro experimento en el que se estudiaron los efectos de la exposición de cocaína sobre el crecimiento y maduración de las células hipocámpicas, tal y como se muestra en el siguiente apartado.

4.1.4. MADURACIÓN

Se emplearon dos estadios temporales diferentes de exposición a la cocaína, ocho y veinticuatro días, tratando con el marcador BrdU administrado antes de cualquier tratamiento con la droga, con el objetivo de estudiar la maduración.

Como se esperaba, con el marcaje de BrdU antes del tratamiento las diferencias a los 8 días entre los grupos control y cocaína no fueron significativas [$F_{(1,9)} = 3.123$, $P = 0.111$] (Fig.31), ni tampoco a los 24 días de tratamiento [$F_{(1,10)} = 0.504$, $P = 0.494$] (Fig.31).

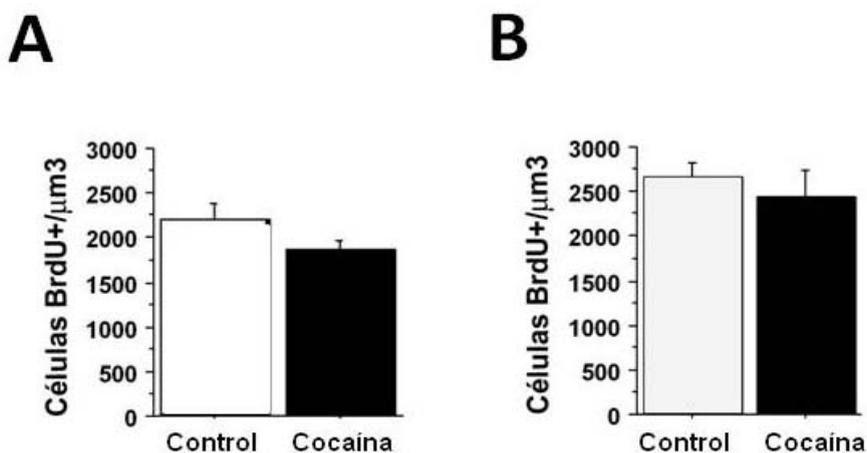


Figura 31. Efectos de la cocaína sobre la maduración celular. A. Tras un tratamiento crónico de cocaína de 8 días no se encuentran diferencias en el BrdU entre grupos control y tratados. B. Tampoco se muestran diferencias con este mismo marcador para 24 días de tratamiento.

En cuanto al marcador de DCX para las neuronas dibujadas, los resultados no fueron significativos estadísticamente para la longitud dendrítica, tanto a los 8 días [$F_{(1,207)} = 0.263$, $P = 0.608$], como a los 24 [$F_{(1,206)} = 1.105$, $P = 0.294$] (Fig.32). Del mismo modo, no fueron significativos los datos para el número de ramas, a los 8 días de exposición [$F_{(1,207)} = 0.283$, $P = 0.595$], ni a los 24 días [$F_{(1,206)} = 0.015$, $P = 0.902$] (Fig.32).

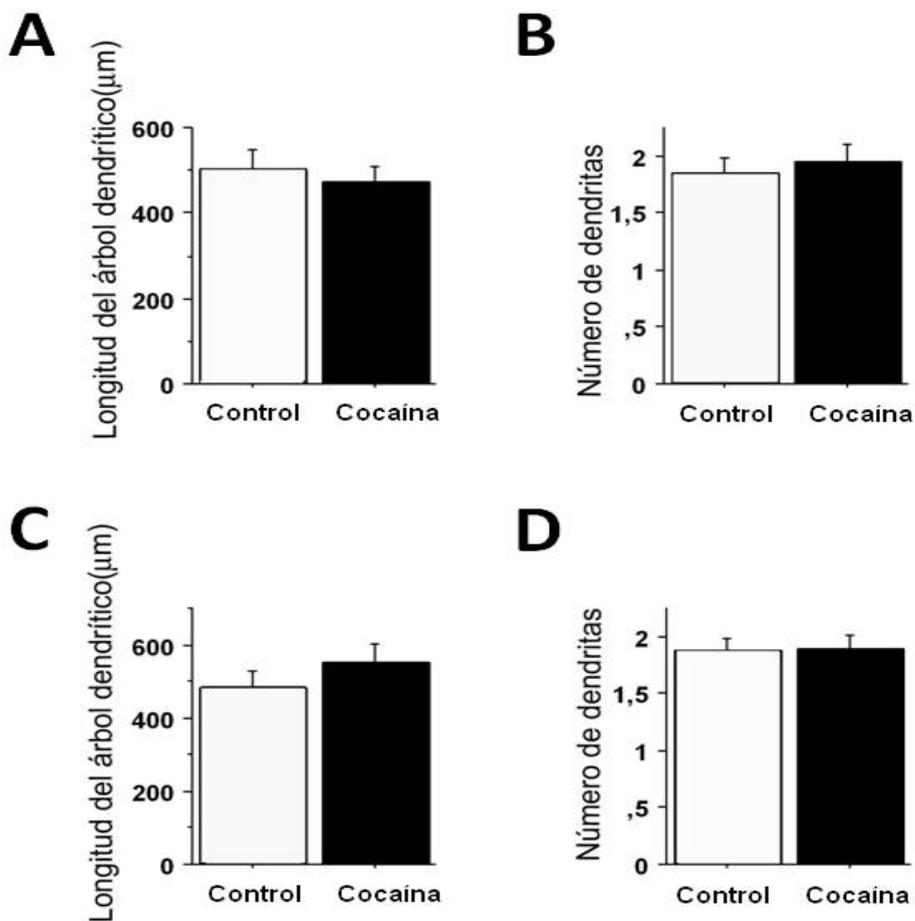


Figura 32. Efectos de la cocaína sobre el marcador DCX. Resultados obtenidos para la longitud (A) y número de ramas (B) a los 8 días, y para los 24 días de tratamiento (C) (D). En ningún caso se observaron diferencias significativas estadísticamente entre animales tratados con cocaína y controles.

Como confirmación a los resultados obtenidos para la medida de la longitud y del número de dendritas, se realizó un estudio de clasificación de los diferentes tipos celulares marcados con DCX para las neuronas dibujadas tanto tras el tratamiento de 8 días de cocaína como en el de 24 días de exposición a la droga (Fig.33 y 34). Los resultados obtenidos para el número de células clasificadas como tipo 1 no fueron significativos estadísticamente ni tras 8 días de exposición [$F_{(1,9)} = 0.054$, $P = 0.822$] ni después de 24 días [$F_{(1,10)} = 0.461$, $P = 0.461$], aunque en este último caso se observó un incremento del 10.01% en el número de células de cocaína sobre la media de los controles. Las medias de los animales control y de los tratados fueron prácticamente iguales para el caso del número de células clasificadas como tipo 2 tras 8 días de cocaína [$F_{(1,9)} = 0.002$, $P = 0.962$], en cambio, bajo el tratamiento más largo, de 24 días [$F_{(1,10)} = 0.493$, $P = 0.499$], se observó un aumento de la media de los controles en un 16.67%, aunque las diferencias tampoco resultaron significativas estadísticamente. Del mismo modo que en el caso anterior, la media de los animales control (5.200 ± 1.356) fue similar a la de los animales tratados con cocaína durante 8 días (5.667 ± 0.9545) para el tipo 3, por lo que no se obtuvieron diferencias significativas [$F_{(1,9)} = 0.083$, $P = 0.779$], pero tras 24 días de cocaína la media de los animales control y los tratados fue diferente, obteniéndose un incremento del 21.43% de la media del número de células DCX+ del tipo 3 en los animales control, aunque sin que estas diferencias fueran significativas [$F_{(1,10)} = 0.738$, $P = 0.410$]. Tal y como se ha observado para el resto de tipos celulares analizados no se han encontrado

diferencias significativas para el tipo 4 ni tras 8 días [$F_{(1,9)} = 4.088$, $P = 0.074$] ni tras 24 días [$F_{(1,10)} = 1.246$, $P = 0.290$], aunque en este tipo 4 se encuentran variabilidad en las medias, ya que para el tratamiento de 8 días la media de los controles (5.200 ± 0.860) fue superior a la de los animales tratados con cocaína (2.833 ± 0.792), por el contrario, para el caso del tratamiento de 24 días fue la media de los animales expuestos a la cocaína (4.167 ± 1.195), la que fue mayor a la media de los controles (2.667 ± 0.615). Por último, en el tipo 5 tampoco se observaron diferencias significativas ni tras 8 días [$F_{(1,9)} = 2.104$, $P = 0.181$] ni tras 24 días [$F_{(1,10)} = 1.788$, $P = 0.211$], y en ambos tratamientos se obtuvieron diferencias entre las medias de los controles y los tratados con la droga en las que se observó un incremento de 40% en la media de los animales con cocaína durante 8 días y un incremento del 77.06% en estos mismos animales sobre los controles, para el caso de 24 días de administración de cocaína.

En las figuras 33 y 34 se muestran los resultados obtenidos para la clasificación de los tipos de células DCX+ tras 8 y 24 días de tratamiento consecutivamente.

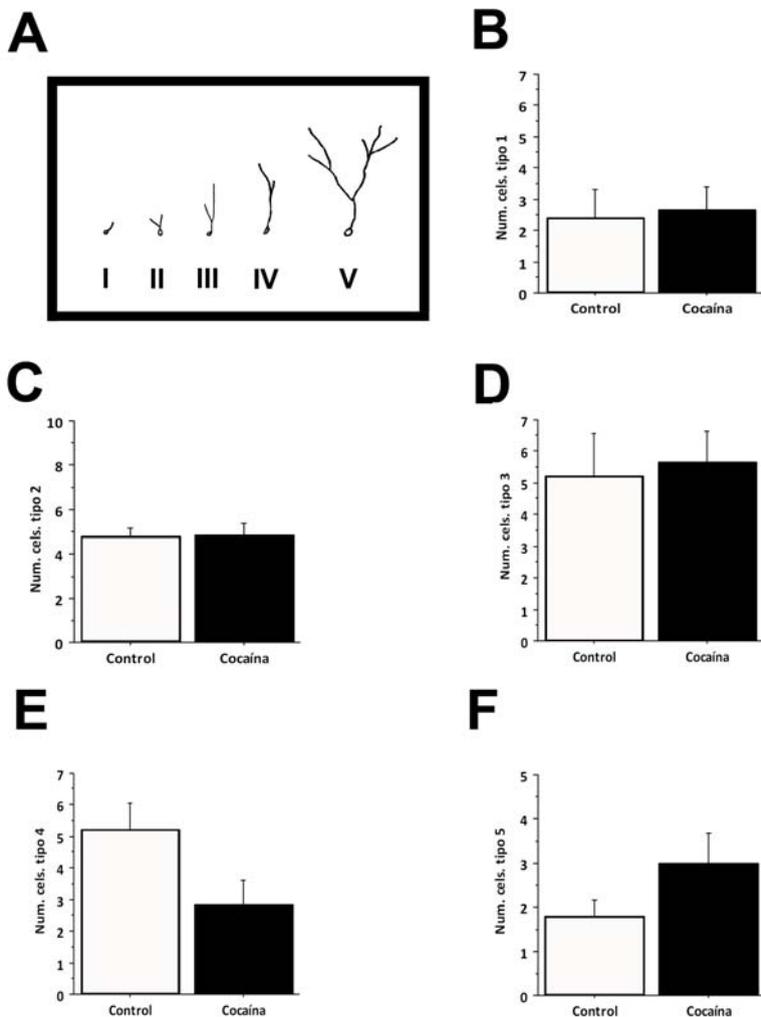


Figura 33. Efectos de la cocaína sobre los diferentes tipos celulares DCX+, tras 8 días de tratamiento. En el cuadro (A) se muestran los tipos celulares estudiados, siendo el tipo I el correspondiente a un menor desarrollo dendrítico (tipo 1) y el tipo V el que corresponde a un mayor desarrollo (tipo 5). A continuación se muestran los resultados obtenidos para el número de células dibujadas correspondientes al tipo 1 (B), al tipo 2 (C), al tipo 3 (D), al tipo 4 (E) y por último al tipo 5 (F). En ningún caso se observaron diferencias significativas estadísticamente entre animales tratados con cocaína y controles.

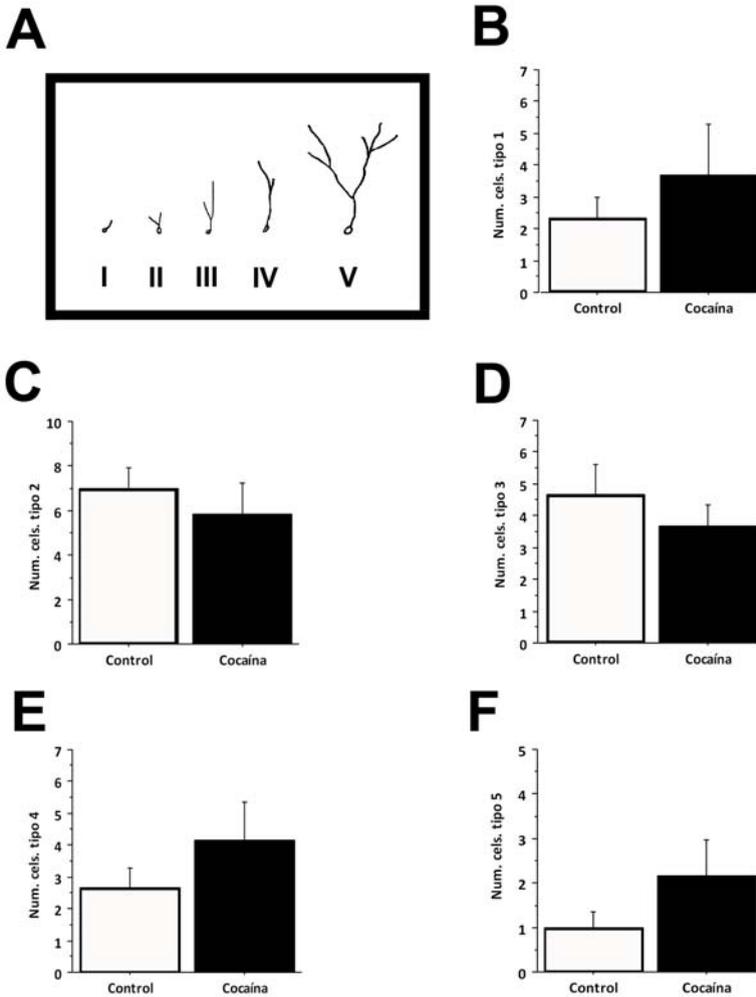
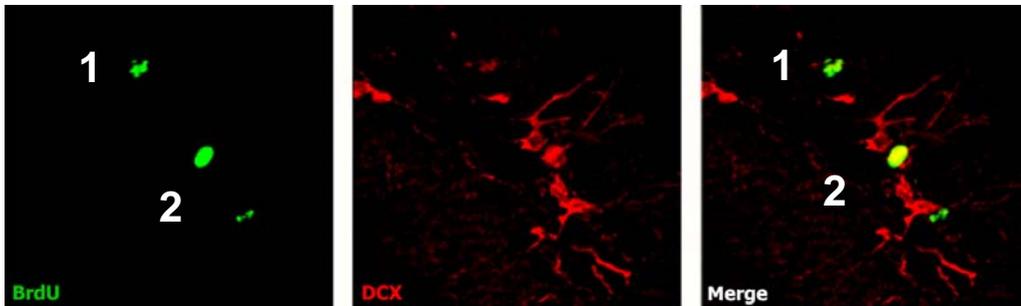


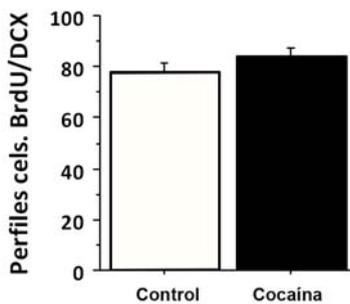
Figura 34. Efectos de la cocaína sobre los diferentes tipos celulares DCX+, tras 24 días de tratamiento Puesto que se utilizó el mismo criterio de clasificación de tipos celulares DCX+ se muestra el mismo cuadro (A) que para el caso del tratamiento con cocaína durante 8 días, donde se muestran los tipos celulares estudiados, siendo el tipo I el correspondiente a un menor desarrollo dendrítico (tipo 1) y el tipo V el que corresponde a un mayor desarrollo (tipo 5). También se muestran los resultados obtenidos para el número de células dibujadas correspondientes al tipo 1 (B), al tipo 2 (C), al tipo 3 (D), al tipo 4 (E) y por último al tipo 5 (F). En ningún caso se observaron diferencias significativas entre animales tratados con cocaína y controles.

Para confirmar los resultados obtenidos en el estudio de la maduración, se realizó una inmunohistoquímica de fluorescencia BrdU/DCX. En la que se obtuvieron resultados similares a los anteriormente analizados en la maduración. De este modo, en el estudio de la colocación de células BrdU+/DCX+, no se encontraron diferencias significativas entre las ratas que recibieron cocaína y las que recibieron salino (Fig.35). Los valores estadísticos para el experimento en el que se inyectó la cocaína durante 8 días fueron de $[F_{(1,307)} = 1.471, P = 0.226]$, y para el experimento de administración de cocaína durante 24 días de $[F_{(1,195)} = 0.070, P = 0.792]$, siendo las dos diferencias estadísticamente no significativas. Las medias aritméticas para los controles a los 8 días ($78.42 \pm 2.99\%$), y a los 24 días ($29.20 \pm 4.30\%$), resultaron muy semejantes entre ellas, al igual que las medias de los animales expuestos a la cocaína, tanto a los 8 días ($84.03 \pm 3.37\%$), como a los 24 días ($30.95 \pm 5.07\%$) (Fig.35).

Es importante señalar que la marca del DCX sobre las neuronas inmaduras se distribía uniformemente tanto en la capa granular como en la subgranular. Al igual que el doble marcaje con BrdU/DCX también se observó tanto en la capa granular como en la subgranular.



A



B

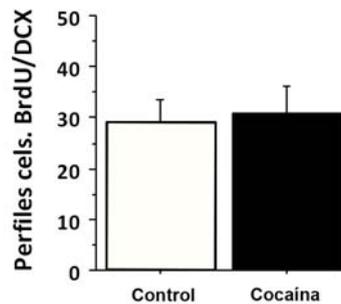


Figura 35. Efectos de la cocaína sobre la maduración neuronal. En la parte superior se muestran tres fotos: en la primera, se ven las células BrdU+, las DCX+ en la segunda y en la tercera fotografía la colocalización de ambos marcajes. El número 1 corresponde a una célula BrdU+ que no colocaliza con DCX, mientras que el número 2 es una célula BrdU+/DCX+. En la parte inferior se observan las gráficas obtenidas para los perfiles doblemente marcados con BrdU/DCX para los experimentos tras 8 días de tratamiento con cocaína (A) y para el experimento tras 24 días de administración de la droga (B).

Con la intención de verificar si existía un defecto maduracional, se procedió al estudio, al microscopio electrónico de transmisión, de los axones de las neuronas inmaduras del DG, que inervan la zona CA3, constituyendo las fibras musgosas. Para ello, se estudió la existencia de anomalías morfológicas en los animales expuestos durante 24 días a la cocaína. Concretamente se analizaron al microscopio 200 botones sinápticos de la zona CA3, pensando que si existía alguna alteración del DG producido por la cocaína, podría reflejarse en alteraciones de la ultraestructura de los botones.

Para ello se midieron distintos parámetros de los botones sinápticos (área de la terminal sináptica, área de las espinas dendríticas, área ocupada por vesículas, área ocupada por zonas activas, número de zonas activas, área ocupada por mitocondrias y número de mitocondrias) (Fig.36), no encontrando ninguna diferencia significativa entre ratas controles y las ratas tratadas con cocaína durante 24 días, tal y como se muestra en los datos de la siguiente tabla (Tabla 5).

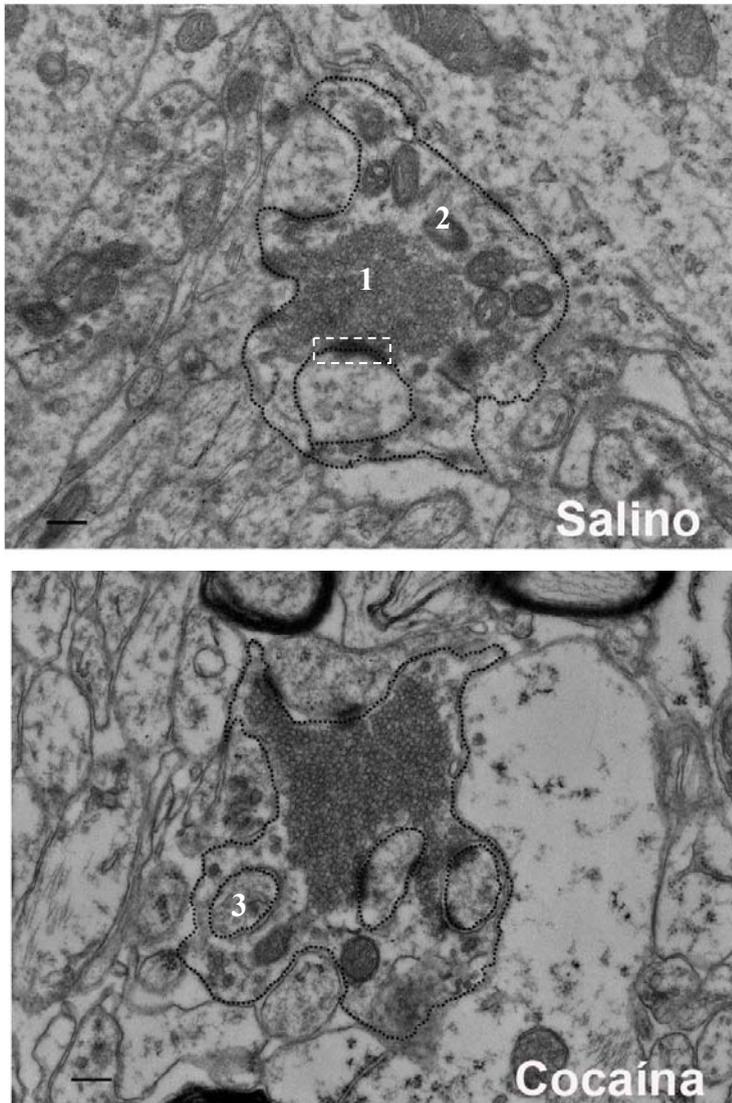


Figura 36. Fotomicrografías al microscopio electrónico mostrando los botones sinápticos en CA3. La línea de puntos negra marca el área de la terminal sináptica, el rectángulo blanco señala una zona activa, el número 1 corresponde a las vesículas, el 2 a las mitocondrias y el número 3 hace referencia a las espinas dendríticas.

ZONA ESTUDIADA (μm^2)	F-VALOR	P-VALOR
Área de la terminal sináptica	$F_{(1, 166)} = 0.964$	0.328
Área de las espinas dendríticas	$F_{(1, 205)} = 1.455$	0.229
Área ocupada por vesículas	$F_{(1, 215)} = 0.001$	0.997
Área ocupada por zonas activas	$F_{(1, 211)} = 1.505$	0.221
Número de zonas activas	$F_{(1, 216)} = 0.676$	0.412
Área ocupada por mitocondrias	$F_{(1, 208)} = 0.001$	0.996
Número de mitocondrias	$F_{(1, 216)} = 2.652$	0.105

Tabla 5. Estructuras estudiadas en los botones sinápticos de la CA3. Tras la administración de 24 días de cocaína no se encontraron efectos significativos en los valores analizados en los botones sinápticos.

4.1.5. MUERTE CELULAR

Se procedió a realizar el conteo de células TUNEL + (Fig.37), para saber si se producía muerte a causa de administración de cocaína durante 24 días (experimento de supervivencia). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos [$F_{(1,12)} = 0.133$, $P = 0.721$], siendo el número de células TUNEL+, muy bajo en los controles (0.93 ± 0.35 células por sección), al igual que en el grupo que recibió cocaína (1.07 ± 0.17 células por sección). La diferencia entre animales control y cocaína fue de una reducción del 13,08% en los controles, respecto a los animales que fueron inyectados con cocaína.

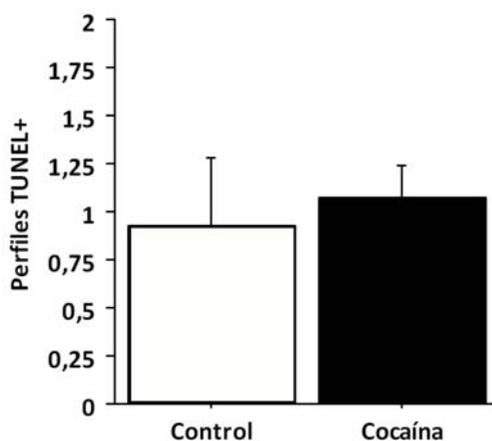


Figura 37. Gráfica de TUNEL para los experimentos con cocaína. En la gráfica se muestran las diferencias entre el grupo control y el grupo tratado con cocaína durante 24 días, donde se observa que la media de los controles es menor a la de los animales tratados con la droga.

4.2. TOLUENO

4.2.1. EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE 24 DÍAS

4.2.1.1. *EXPOSICIÓN*

Los animales inhalaban tolueno durante 24 días, en dos sesiones diarias, hasta que mostraban síntomas de intoxicación graves por tolueno, es decir, hasta que los animales quedaban tumbados, sin moverse, sobre la base de la caja. El tiempo medio empleado en obtener estos síntomas fue de 28.125 ± 8.714 minutos (Fig.38).

La variabilidad en esta media de tiempo fue debida a que la exposición se realizaba en zigzag, produciéndose los picos más bajos en los días 10 y 20 de intoxicación, es decir, en torno a estos días los animales mostraban síntomas graves más rápidamente, empleándose menos tiempo de exposición en estos días.



Figura 38. Tiempo de exposición. Esta gráfica muestra la duración de cada inhalación al tolueno durante los 24 días de exposición. De este modo pueden observarse las subidas y bajadas que se producen en el tiempo de exposición debido a que los animales necesitaban sesiones más reducidas tras haber soportado síntomas muy graves en la sesión anterior, controlando en todo momento que el animal presentara síntomas graves pero sin peligro de muerte.

Con los síntomas anotados durante la intoxicación diaria se obtuvo una escala de aparición de síntomas, detallada a continuación: en los primeros tres minutos de exposición las ratas exploran la caja, un par de minutos después se observaban secreciones en la cavidad nasal y bucal, a continuación, en torno a los diez minutos desde el inicio de la intoxicación, los animales experimentan temblor en las patas (principalmente en las delanteras). A medida que la intoxicación continua, se producen temblores y espasmos (aproximadamente en el minuto 18), dos minutos después, la

aparición de síntomas continua con la dificultad para caminar, incoordinación en los movimientos y tambaleos (sobre el minuto 22), hasta que dos o tres minutos más tarde los animales caen, agitando sus patas traseras y son incapaces de levantarse, tras dos minutos, es decir en torno al minuto 27 de exposición, los animales quedan inmóviles tendidos en el suelo de la caja (Fig.39).

La concentración de tolueno en la cámara se ajusta a través de cálculos de prueba y error, tomando como referencia lo descrito por Gómez-Pinedo en el 2005 (Gómez-Pinedo *et al.*, 2005). La atmósfera controlada en la cámara de exposición se obtuvo al evaporar tolueno en solución. Los cálculos se hicieron al considerar que 1 ppm de tolueno a 25°C., equivale a 3,76 mg/l, $\delta=0,86$ g/l a una presión vapor de 37,7 mm de Hg, logrando obtener 2622 ± 240 ppm (por cada 11.76 ± 1.050 ml utilizados), garantizando así la concentración de 2000 ppm.

Una de las esquinas se dejó sin ningún tubo de tolueno, para estudiar si los animales mostraban preferencia por esta esquina. Durante el proceso de intoxicación fue visible que no sólo los animales no preferían esta esquina libre de tubos con tolueno, sino que mostraban una clara preferencia por las esquinas con el solvente, “esnifando” directamente de los tubos Corning, incluso del tubo que poseía la bomba, superando incluso el temor inicial al ruido que producía esta.

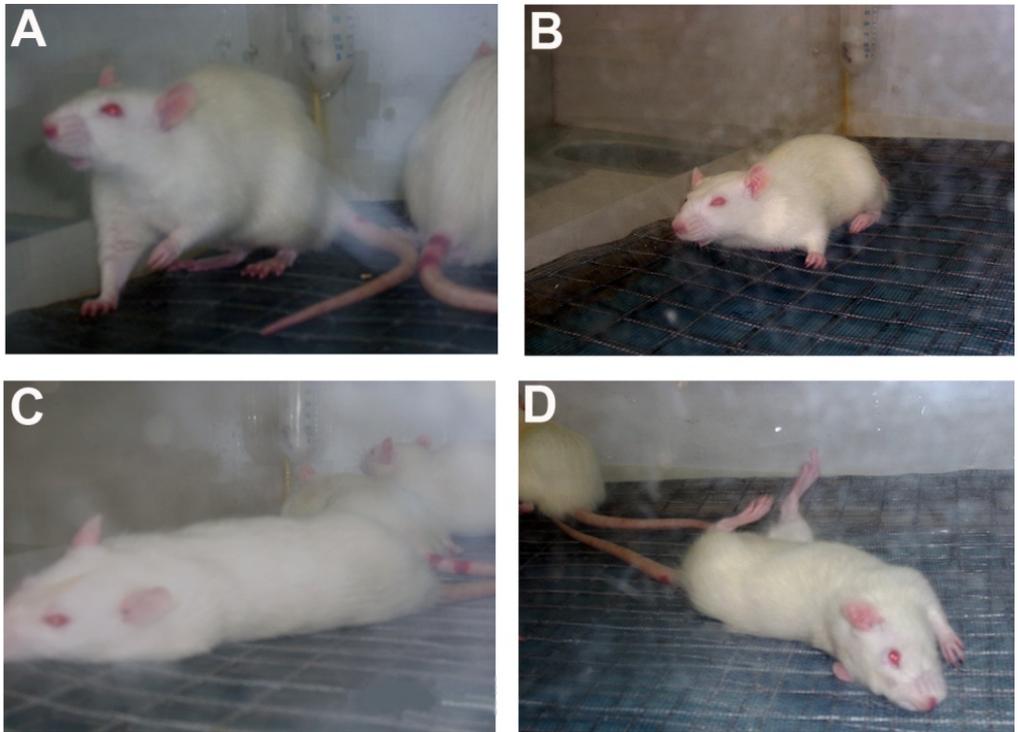


Figura 39. Fotografías de los síntomas de intoxicación por tolueno. Fotografías tomadas durante la exposición al tolueno, donde se muestran algunos de los síntomas típicos: tembores en patas delanteras (A), temblores en todo el cuerpo e incapacidad para mantenerse de pie (B), sedación (C), por último, el animal cae, sufriendo convulsiones y agitando las patas traseras (D).

Una de las características principales de la inhalación de esta droga es la diuresis, por lo que se contó el volumen promedio de orina diariamente, que fue de 12.188 ± 2.63 ml, para los animales expuestos al tolueno, y un volumen de 7.380 ± 1.35 ml, para los animales control, hecho que demuestra que los animales fueron sometidos a exposiciones graves con tolueno.

Con la intención de demostrar que los niveles de tolueno empleados durante los experimentos, producían el grado de intoxicación deseada en los animales expuestos a esta droga, se analizó mediante la técnica de LC/MS/MS, el ácido hipúrico como bioindicador, puesto que se obtiene al metabolizar el tolueno.

Para ello se analizó la presencia del metabolito de ácido hipúrico en las muestras de orina recogidas diariamente durante el experimento de exposición al tolueno durante 24 días. Obteniéndose unas concentraciones de ácido hipúrico del orden de 1 a 5 μM , calculadas a partir del tiempo de elución y del área del pico de la gráfica obtenida al eluirse el ácido hipúrico.

En la figura 40 puede verse la elución del ácido hipúrico a 15.46 min, con ESI negativo para la transición de $178 > 134$ m/z tras una administración de 24 días de tolueno. El pico aparecido antes del pico donde se ha señalado el ácido hipúrico, también se ha considerado como ácido puesto que aparece en la misma transición y en el mismo patrón. Sin embargo, se han descartado otros picos con áreas muy inferiores o mucho mayores puesto

que su tiempo de retención se desplazaba mucho respecto al considerado como pico de retención del ácido hipúrico.

El análisis estadístico de las concentraciones obtenidas tras hacer todos los ajustes necesarios, determinó que existían diferencias significativas entre la orina de los animales control y los tratados con tolueno durante 24 días. Observándose, como era de esperar, valores mayores en la orina de los animales que inhalaron el tolueno, puesto que aparece metabolizado en su orina, y valores con un nivel basal en los animales control (P valor=0.0001, $t=6.773$, $df=13$) (Fig. 40).

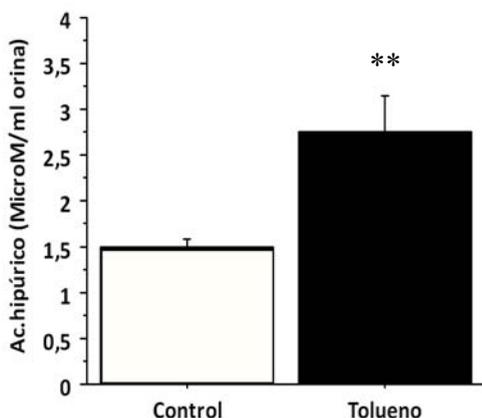


Figura 40. Valores obtenidos para el ácido hipúrico tras el experimento de tolueno durante 24 días. La gráfica muestra como mediante LC/MS/MS se obtuvieron valores mayores de ác. Hipúrico en la orina de los animales tratados con tolueno que en los niveles basales encontrados en los controles. $**P < 0.01$.

4.2.1.2. *PROLIFERACIÓN*

En el presente experimento, los animales inhalaban tolueno durante 24 días, al día siguiente, se inyectó BrdU tanto a los animales control como a los tratados, y dos horas después de la última inyección con el marcador, se perfundieron los animales. Los resultados observados, prácticamente, no mostraron variaciones en las medias de las células marcadas con BrdU, entre el grupo de animales que inhalaban tolueno (11.4 ± 1.1 células BrdU+), con respecto a los animales control (12.2 ± 0.6 células BrdU+). Por ello, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en este caso [$F_{(1,4)} = 1.122$, $P = 0.349$] (Fig.40).

Además de esto, se estudiaron los grupos de células BrdU, es decir, se contabilizaron las veces en las que las células marcadas aparecían en agrupaciones de 3 o más células, situadas unas muy cerca de otras, prácticamente en contacto e incluso solapadas. En este caso, tampoco se obtuvieron diferencias significativas en el estudio de los grupos de células BrdU+ [$F_{(1,4)} = 5.835$, $P = 0.0731$], aunque la reducción entre las medias fue mayor, siendo de un 32.83% la reducción obtenida tras el tratamiento con tolueno respecto a los controles (Fig.41).

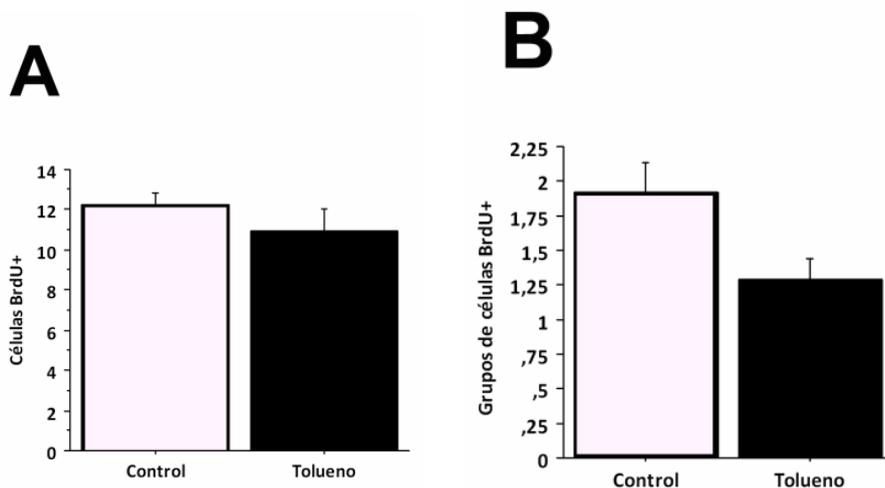


Figura 41. Efectos de la intoxicación con tolueno durante 24 días sobre la proliferación. Para comprobar los efectos del tolueno sobre la proliferación se ha empleado el número de células BrdU + (A), y la cantidad de grupos de células BrdU+ en el DG (B). En ambos casos las diferencias no fueron significativas.

Con la intención de confirmar los resultados obtenidos en el análisis de la proliferación, se estudió la ultraestructura del DG, mediante microscopía electrónica de transmisión. Obteniéndose resultados coherentes con los de la inmunohistoquímica, de modo que no se encontraron diferencias entre los nichos neurogénicos presentes en los controles, ni en los animales tratados con el solvente tras 24 días de exposición. Observándose en ambos tratamientos proporciones similares de nichos neurogénicos, además de conservarse una morfología celular semejante.

4.2.1.3. SUPERVIVENCIA

En el caso de la supervivencia en el que los animales fueron inyectados diariamente durante la primera semana de exposición al solvente, y perfundidos tras los 24 días de tratamiento con la droga, se observaron diferencias en las células marcadas con BrdU. De este modo se encontraron más células BrdU+ en los animales tratados con tolueno (21.877 ± 2.66) que en los controles (13.54 ± 1.10). Este aumento en las células marcadas, resultó en una diferencia estadísticamente significativa [$F_{(1,4)} = 8.368$, $P = 0.044$] (Fig.42). Las células marcadas con BrdU se presentaban distribuidas uniformemente en la capa granular y subgranular del hipocampo independientemente de que fueran controles o los tratados con tolueno.

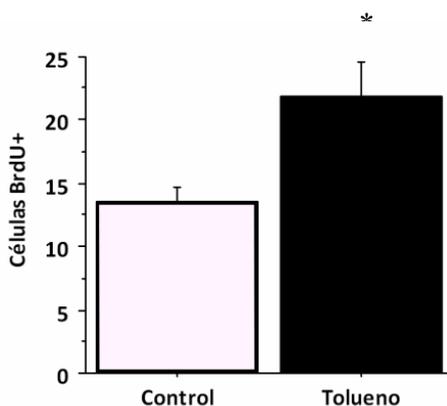


Figura 42. Efecto sobre las células BrdU+ del experimento de supervivencia tras la intoxicación con tolueno durante 24 días. Se muestran los efectos significativos obtenidos tras la exposición de 24 días al tolueno. Observándose un claro aumento en el número de células marcadas con BrdU. * $P < 0.05$.

Para estudiar la maduración en este experimento de supervivencia, se analizó el efecto sobre el marcador DCX, analizándose tanto la longitud total como el número de dendritas de cada una de las neuronas marcadas y dibujadas, y en ambos casos las diferencias obtenidas fueron significativas (Fig.43). De este modo, en el análisis de la longitud total se observó un aumento entre la media obtenida para los animales que inhalaban el tolueno (2.261 ± 0.142 cm) y los animales control (1.651 ± 0.112 cm), obteniéndose un valor estadístico significativo que fue de $[F_{(1,262)} = 10.120, P = 0.0016]$. Analizando el número de dendritas se observaron diferencias significativas para el número de dendritas totales $[F_{(1,4)} = 17.230, P = 0.0142]$. En cuanto al número de dendritas secundarias la diferencia también fue significativa ($[F_{(1,4)} = 17.140, P = 0.0144]$), siendo mayor la media del grupo tolueno (20.93 ± 1.543 dendritas) que la del grupo control (12.50 ± 1.323 dendritas). Al igual que en las dendritas secundarias en las dendritas terciarias las diferencias fueron significativas entre tratamientos ($[F_{(1,4)} = 15.470, P = 0.0171]$), y la disminución de la media del grupo control respecto al grupo tratado con tolueno fue de un 61.24 %. Aún más significativo fue el porcentaje de reducción que se obtuvo para la media de las dendritas cuaternarias, donde la reducción de los controles fue del 85.71%, por lo tanto, las diferencias entre animales control y tratados fueron significativas ($[P = 0.0462, t=4.490, df=2]$) debido a la variabilidad entre animales.

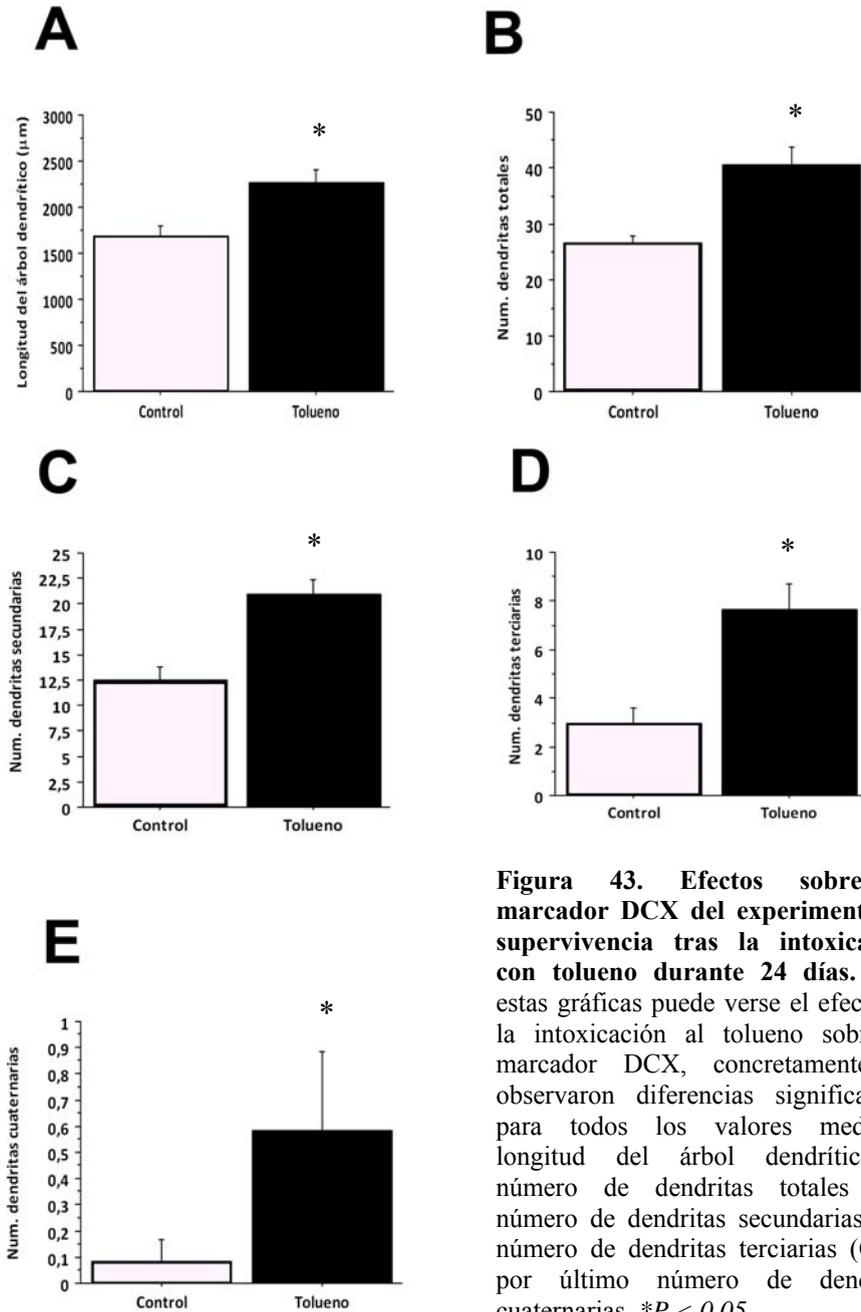


Figura 43. Efectos sobre el marcador DCX del experimento de supervivencia tras la intoxicación con tolueno durante 24 días. En estas gráficas puede verse el efecto de la intoxicación al tolueno sobre el marcador DCX, concretamente se observaron diferencias significativas para todos los valores medidos: longitud del árbol dendrítico(A), número de dendritas totales (B), número de dendritas secundarias (C), número de dendritas terciarias (C), y por último número de dendritas cuaternarias. * $P < 0.05$.

4.2.1.4. MADURACIÓN

En este experimento en el que se administró el BrdU antes del tratamiento con tolueno se obtuvieron los mismos resultados que en el experimento de estudio de la supervivencia y justo el resultado opuesto al observado con la proliferación. Así pues, se observó un incremento del 29.62% de las células marcadas con BrdU+ en los animales que inhalaban tolueno sobre los controles, siendo esta diferencia significativa estadísticamente [$F_{(1,4)} = 7.987, P = 0.0475$] (Fig.44).

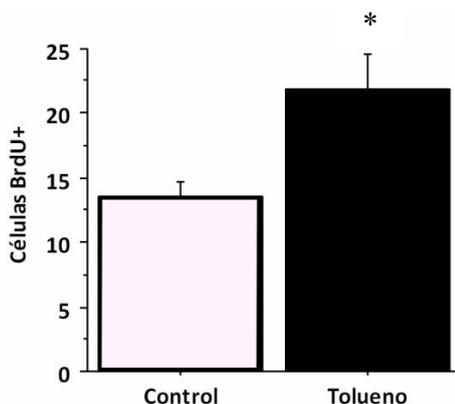


Figura 44. Efectos sobre el número de células BrdU+ del experimento de maduración tras la intoxicación con tolueno durante 24 días. Se muestra el efecto del tolueno sobre el marcador BrdU, siendo la diferencia significativa estadísticamente y obteniéndose una media mayor en los animales tratados con tolueno que en los controles. * $P < 0.05$.

Se realizó el mismo estudio exhaustivo con el marcador DCX para este tercer experimento de maduración, en él también se obtuvieron diferencias significativas tanto en la longitud como en el número de dendritas de las neuronas dibujadas (Fig.45). En cuanto a la longitud, las diferencias significativas observadas fueron las siguientes: [$F_{(1,249)} = 9.066, P = 0.0029$], al igual que en el experimento anterior la media de los animales

tratados con tolueno (1.932 ± 0.112 cm), fue mayor que la media de los animales control (2.492 ± 0.138 cm). También fueron coherentes con los resultados anteriores las diferencias estadísticamente significativas [$F_{(1,4)} = 16.310$, $P = 0.0156$], que se obtuvieron para el número total de dendritas. Aunque en el caso de las dendritas secundarias las diferencias no fueron significativas [$F_{(1,4)} = 4.117$, $P = 0.1123$], la media del grupo control disminuía en un 20.36% respecto al grupo con tolueno. En cambio, en las dendritas terciarias sí que se obtuvieron diferencias significativas [$F_{(1,4)} = 22.140$, $P = 0.0093$], aumentando incluso la diferencia entre controles y tratados (55.91%). Dicha diferencia se incrementó más aún en la medida de las dendritas cuaternarias, puesto que prácticamente eran inobservables en el grupo de animales control y sí que aparecían en los animales que inhalaban de manera crónica el tolueno [$t=6.424$, $df=2$, $P = 0.0234$]. Estos valores se encuentran representados en la figura 46.

Además, se observó que la distribución de las células DCX+ fue mayoritariamente en la capa subgranular, aunque existan algunas células marcadas con DCX en la capa granular, tanto en animales control como en tratados.

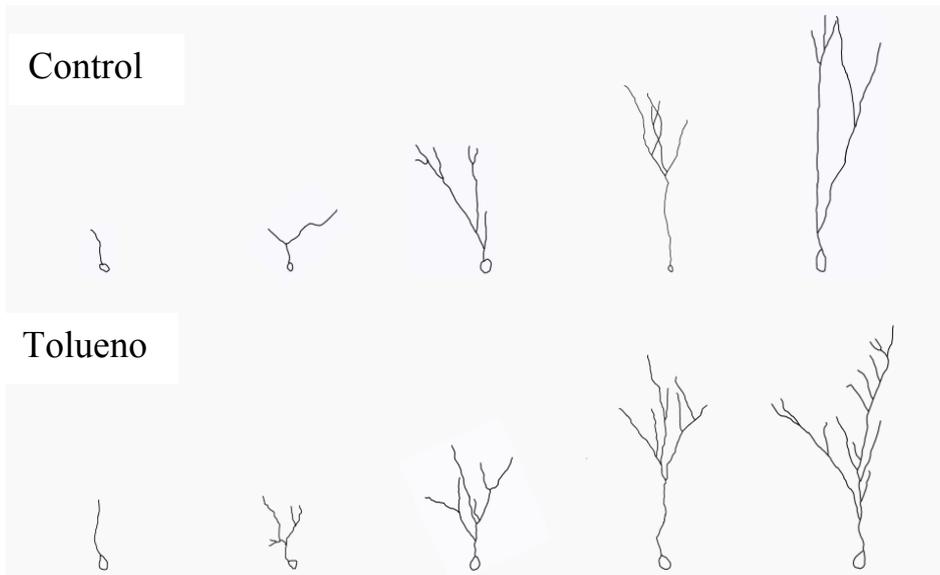


Figura 45. Células DCX+, dibujadas en cámara clara, tras la exposición al tolueno. Se clasificaron las neuronas según su arborización dendrítica, considerando la longitud y número de ramificaciones. En el dibujo se muestran las diferencias observadas entre neuronas representativas de animales tratados con tolueno y de animales control.

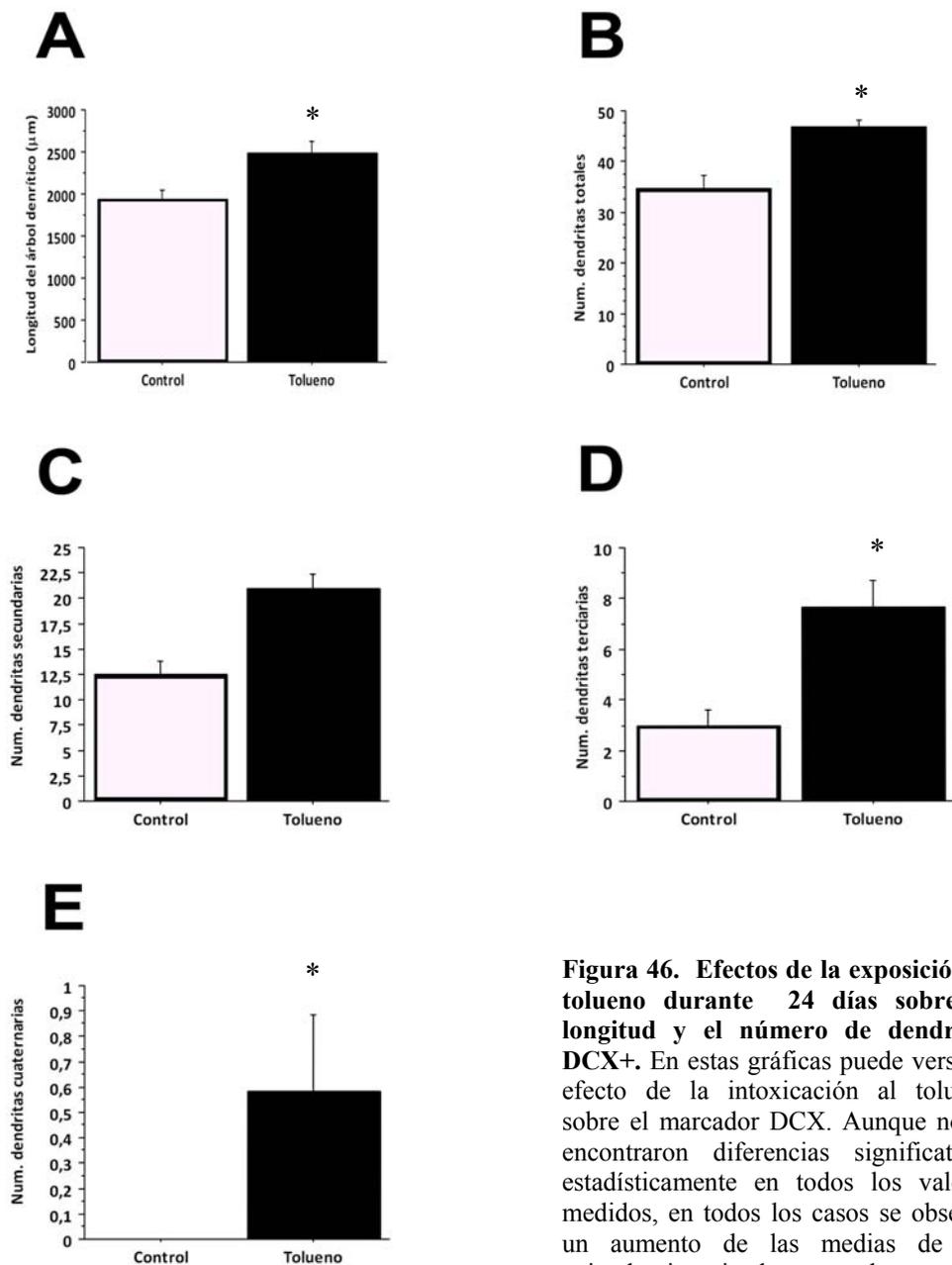


Figura 46. Efectos de la exposición al tolueno durante 24 días sobre la longitud y el número de dendritas DCX+. En estas gráficas puede verse el efecto de la intoxicación al tolueno sobre el marcador DCX. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en todos los valores medidos, en todos los casos se observó un aumento de las medias de los animales intoxicados con tolueno sobre los animales controles. * $P < 0.05$.

4.2.1.5. MUERTE CELULAR

Se realizó una inmunohistoquímica de TUNEL para evaluar la muerte celular producida por tolueno (Fig.47).

Tras realizar el análisis de TUNEL se observaron diferencias significativas estadísticamente entre los animales tratados con tolueno y los controles [$F_{(1,2)} = 14.00$, $P = 0.0454$] (Fig.46), siendo la media de los controles la mitad de la media de los animales con tolueno, situadas principalmente en la capa SGZ.

También se midió la presencia de muerte celular en otras zonas del cerebro, como la zona RMS y la SVZ, encontrándose un mayor número de células TUNEL+ en los animales con tolueno que en los controles, aunque en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas, y puesto que no corresponden a la zona de estudio de esta tesis, estos resultados no serán mostrados en el presente trabajo.

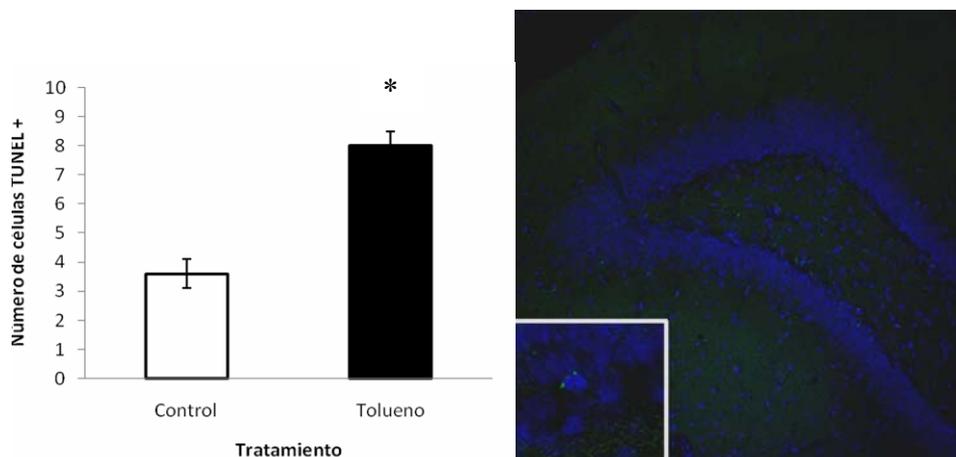


Figura 47. Muerte celular tras la intoxicación con tolueno durante 24 días.

En la gráfica de la derecha se muestra el número de células muertas medidas con TUNEL tanto para los controles como para los animales tratados con tolueno. En la figura de la izquierda puede verse el marcaje típico obtenido en las inmunohistoquímicas de TUNEL realizadas para el análisis, en el margen inferior derecho de esta fotografía se observa una ampliación para apreciar los detalles del marcaje. Los puntos verdes indican el marcaje de las células TUNEL+ y el marcaje azul para las células con DAPI.

A la vista de los resultados obtenidos con las pruebas de TUNEL, en las que se demuestra que la administración de tolueno durante 24 días produce la muerte celular, se decidió analizar las células de microglía, puesto que en este tipo celular se producen alteraciones como consecuencia de estímulos externos como la muerte celular.

Las características morfológicas de las microglías observadas mediante el marcador OX-42, fueron en su mayoría las típicas de la microglía activada para los animales expuestos al tolueno, es decir, con tamaño reducido y sin mostrar prácticamente ramas expuestas. En cambio, en los controles la

morfología de las microglías fue clasificada en una etapa de activación menor a la de los animales tratados, por lo que presentaban un mayor tamaño y desarrollo en sus ramas (Fig.48).

En los anillos concéntricos, separados cada 1 μm , empleados para caracterizar el fenotipo microglial también se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos [$F_{(1,142)} = 12.090$, $P = 0.0007$], observándose una disminución en el número de anillos cruzados por las ramas que fue del 33.61 % en la media de los animales con tolueno respecto a la media de los controles.

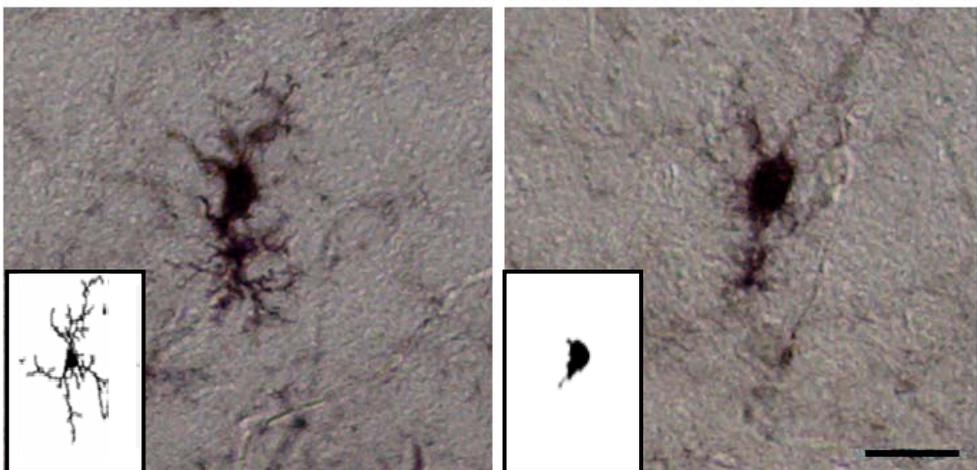


Figura 48. Alteraciones morfológicas de células microgliales. En la fotografía de la izquierda se muestra una célula de microglía del subtipo más abundante en los controles, con un mayor tamaño y desarrollo de sus ramas. En cambio, la fotografía de la derecha muestra una célula típica de los animales tratados con tolueno, cuyo tamaño era menor y por tanto, estas células estaban más activas. En el borde inferior de ambas fotografías aparecen las representaciones esquemáticas empleadas para la clasificación de la activación de los diferentes tipos de la microglía, siguiendo el esquema mostrado en el apartado de material y métodos. *Escala 50 μm .*

Con el objetivo de estudiar los cambios ultraestructurales producidos tras la muerte celular causada por la exposición al tolueno durante 24 días, se analizó la morfología del DG empleando el microscopio electrónico de transmisión.

Al analizar la estructura del DG de los animales tratados con tolueno se observaron diferencias en la organización de las capas que componen la capa granular, sin encontrar el patrón habitual, además de mostrar una menor densidad celular en comparación al control (Fig. 49). Algunas neuronas granulares presentaban anormalidades en su estructura, como abundante citoplasma, ya que una característica de este tipo neuronal es la baja cantidad de citoplasma que exhiben sus células. Además, se observaron diferencias en la morfología de las células granulares del grupo tratado con el solvente, presentando éstas, formas más ovaladas a las habituales redondeadas de las células granulares del grupo control, y presentando mayor variabilidad en el tamaño. Otra característica diferente fue la existencia de un mayor número de células microgliales en las ratas expuestas a tolueno, que mostraban un citoplasma denso con vesículas y aparentes gránulos de lipofucsina, y además en la mayoría de casos, estas células de microglía se situaban junto a astrocitos; algunos de estos contenían abundantes filamentos intermedios.

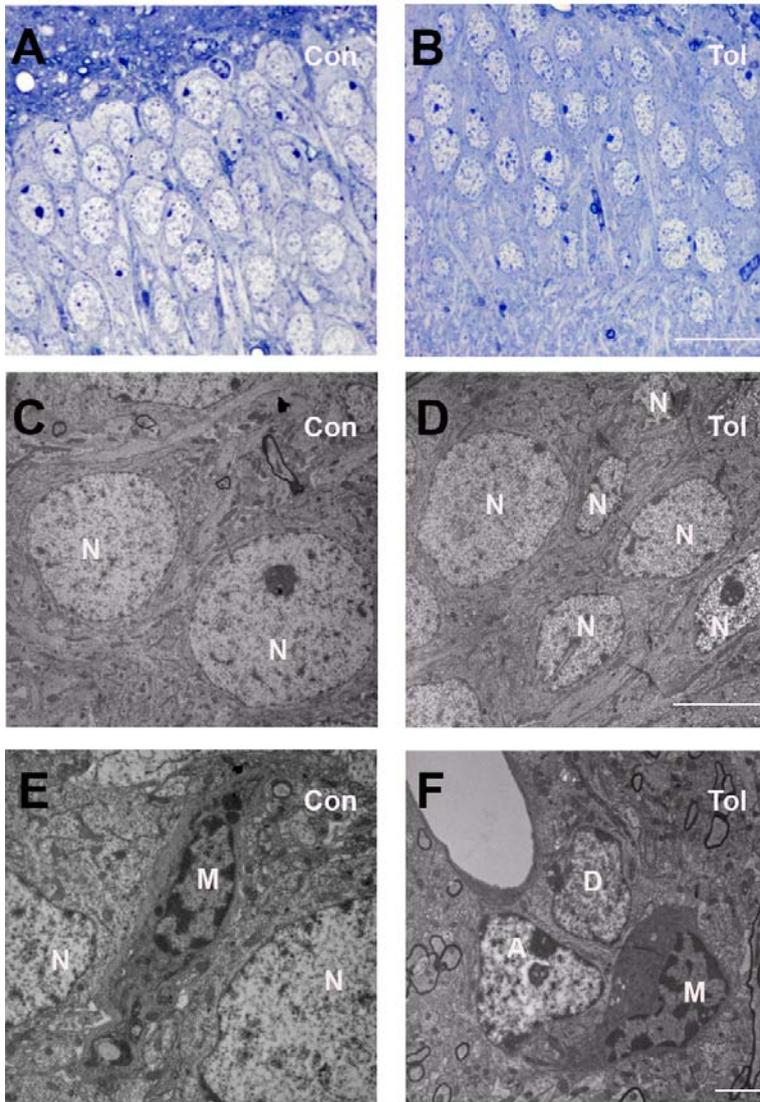


Figura 49. Alteraciones ultraestructurales en el DG tras un tratamiento con tolueno durante 24 días. Las dos primeras imágenes de fotografías de semifinos muestran la organización normal de los controles (A) y la desorganización de la capa granular del DG en los animales expuestos al tolueno (B). (C) Se muestran células redondeadas y de tamaños uniformes en los animales control (D) Mientras que los animales tratados con el solvente poseían células de formas y tamaños variables. (E) Célula de microglía de un animal control (F) diferencias en las células de microglía de los animales expuestos al tolueno. N = neurona, M = célula de microglía, D= célula precursora intermedia, A = astrocitos, *Escala: 10 μ m, 5 μ m, 2 μ m.*

Hasta ahora se había demostrado que el tolueno administrado durante 24 días, producía la muerte celular, comprobado mediante la técnica de TUNEL, y verificado con el aumento de la microglía y el estudio de las características ultraestructurales del DG. A continuación, se procedió a demostrar que la causa de la muerte celular observada, se producía por el estrés oxidativo inducido tras la intoxicación por el solvente. Para ello, se analizó la presencia en orina del metabolito 8-OHdGua, empleándolo como bioindicador del estrés oxidativo (Fig.50). Las concentraciones determinadas a partir del tiempo y el área de elución de las muestras fueron del orden de 0.002 a 0.04 μM .

El pico de elución del 8-OHdGua a 14.68 min, posee un ESI positivo para la transición 284.4>168.3 m/z. Se escogieron los picos que aparecían en la misma transición y en el mismo patrón que el metabolito de estudio.

Al igual que en el caso del ác. hipúrico, el tolueno indujo la aparición de estrés oxidativo, y por tanto, se produjo un aumento del metabolito 8-OHdGua en la orina de los animales expuestos con tolueno. Estas diferencias entre controles y tratados fueron estadísticamente significativas (P valor=0.0001, t=6.773, df=13).

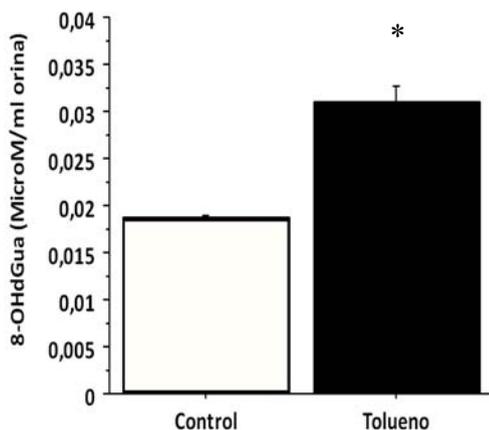


Figura 50. Aumento de los niveles de 8-OHdGua durante la exposición a tolueno durante 24 días. En la gráfica se muestran el incremento de los valores de 8-OHdGua en la orina de los animales tratados con tolueno, respecto a los valores en los animales control, El aumento de este metabolito en los animales expuestos al tolueno, muestran la inducción de estrés oxidativo por este solvente. * $P < 0.05$.

4.2.2. EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE EL DESARROLLO

4.2.2.1. EXPOSICIÓN

Las ratas adultas fueron expuestas al tolueno en la cámara de intoxicación, durante 72 días en dos sesiones diarias. El tiempo medio empleado en obtener síntomas graves de intoxicación fue de 29.04 ± 2.39 min. Estableciéndose la misma escala de síntomas que se observaban para el caso del tratamiento de 24 días con tolueno (Fig.51).

Aunque, en este experimento la variabilidad respecto a la media fue menor, debido al aumento de días de análisis, se siguen produciendo

sesiones menos duraderas en los días 10 y 20, como en el caso de la exposición durante 24 días, y además, cada diez días de exposición aproximadamente, se produce una disminución en el tiempo de exposición necesario para que el animal muestre síntomas graves causados por la exposición al tolueno.



Figura 51. Tiempo de exposición al tolueno durante 72 días. Esta gráfica muestra la duración de cada inhalación al tolueno durante los 72 días de exposición. Puede observarse que el tiempo de exposición es mucho más irregular hasta cerca del día 20, a partir de esta fecha aproximada los animales se expusieron un tiempo parecido durante cada exposición. Aún así en algunas exposiciones se redujo el tiempo de exposición puesto que los animales presentaron los síntomas con mayor rapidez.

El consumo medio de tolueno, al que se sometieron las ratas madre cada día fue de 11.77 ± 0.05 ml, obteniéndose una media idéntica al caso anterior de exposición durante 24 días. El volumen de orina recolectado durante el experimento fue muy variable y la media obtenida fue menor a la del caso

de la exposición crónica de tolueno. El volumen promedio de orina diariamente fue de 1.99 ± 1.80 ml, aunque algunos días se obtuvieron alrededor de los 8 ml y otros entorno a 0.5 ml.

Además, como prueba de esta intoxicación se ha realizado un análisis del biomarcador ácido hipúrico, producido tras metabolizarse el tolueno. Analizándose mediante la técnica de HPLC a partir de la orina recolectada diariamente. Se obtuvieron concentraciones de ácido hipúrico semejantes a las conseguidas en el otro experimento de tolueno, es decir, del orden de 1 a 5 μM .

Se emplearon los mismos patrones que en el experimento de tolueno administrado durante 24 días, por tanto, los picos de elución fueron los mismos, y se consideraron los mismos parámetros para establecer los picos implicados en la medida. Tal y como se esperaba, aparecieron valores mayores de ácido hipúrico en los animales a los que se les administró tolueno, puesto que lo metabolizaron, que en los animales control, cuyo niveles de ácido hipúrico eran basales. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre animales control y con tolueno durante 72 días (P valor=0.0001, $t=16.54$, $df=58$) (Fig.52).

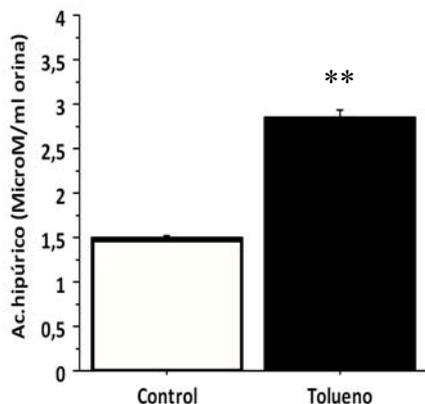


Figura 52. Valores obtenidos para el ácido hipúrico tras la exposición de tolueno durante 72 días. En la gráfica se muestran las diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ácido hipúrico medido mediante LC/MS/MS. **** $P < 0.01$.**

La exposición a tolueno provocó una mayor tasa de mortalidad durante la lactancia, dato que no se observó en el grupo de animales control, siendo la diferencia de un 28.20% significativa estadísticamente [$F(1,7) = 5.669$, $P = 0.0488$]. Cabe destacar que entre las crías nacidas muertas a partir de las madres tratadas con tolueno, muchas presentaban anomalías típicas de la exposición a compuestos tóxicos durante el desarrollo embrionario. Entre las anomalías encontradas se observó: microcefalia, alteraciones en la conformación facial, afectación en la longitud de las extremidades, etc. Algunas de las anomalías obtenidas durante el experimento aparecen descritas en la siguiente figura (Fig.53).

Entre las crías nacidas tras la intoxicación al tolueno, no se encontraron diferencias en el sexo de las crías, ni tampoco en otras características medidas como el peso corporal, ni la longitud corporal, aunque se encontraron algunos casos con alteraciones en el tamaño craneal (Fig. 53).



Figura 53. Crías intoxicadas con tolueno durante su gestación y etapa postnatal temprana. En estas fotografías se pretende mostrar algunas de las malformaciones causadas por la exposición al tolueno. En la fotografía A se muestra una de las crías nacidas muertas con un retraso en el desarrollo. En la foto B aparece una de las malformaciones obtenidas, también con el desarrollo retrasado. En la C puede compararse un animal control (situado a la derecha de la imagen) y un animal expuesto al solvente, nacido muerto y con el desarrollo incompleto debido al tolueno (a la izquierda de la imagen). Por último, las dos últimas fotografías muestran que las crías control y las nacidas tras la exposición al tolueno son prácticamente iguales físicamente, es decir, no se encuentran graves diferencias en el tamaño y peso corporal, aunque si se encuentran en el número de crías vivas.

4.2.2.2. *PROLIFERACIÓN*

En este caso se administró BrdU el día 16 de gestación, y se analizó el DG tanto en madres como en crías. Los resultados para este marcador sobre las madres no fueron significativos [$F_{(1,3)} = 0.7482$, $P = 0.4507$], aunque se observó una disminución del 21.46% de la media del grupo tolueno (4.60 ± 0.87), sobre el grupo control (5.86 ± 1.23) (Fig.54). Estos resultados fueron coherentes con los obtenidos en el experimento de proliferación tras la administración de tolueno durante 24 días.

En cambio, los resultados para las crías marcadas durante su gestación fueron diferentes. Viéndose diferencias significativas entre ambos tratamientos ($[F_{(1,16)} = 7.815$, $P = 0.0130]$), y en este caso, siendo la media de células BrdU+ en las crías que recibieron tolueno (142.10 ± 9.04) mayor a la media de células positivas para este marcador en los animales control (102.70 ± 9.62), por lo que el aumento corresponde al 38.36% (Fig.54).

Posiblemente las diferencias entre madres y crías se deban al diferente momento en el que se les administró el marcador a las madres y a las crías, y las condiciones de exposición al solvente.

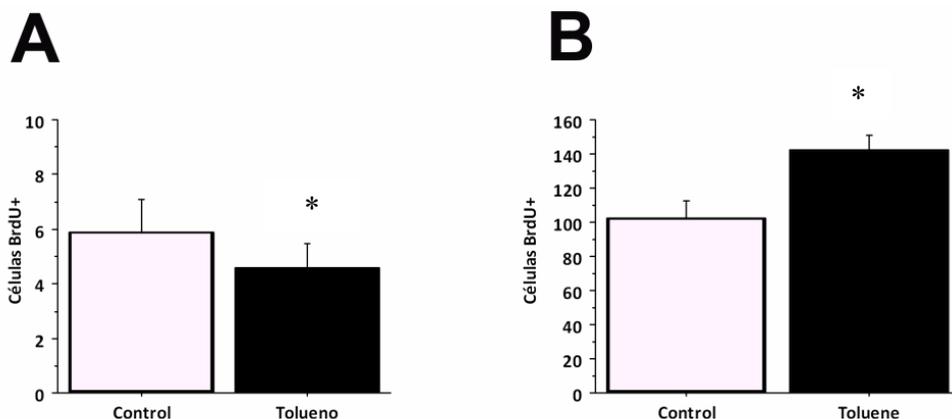


Figura 54. Niveles del marcador BrdU tanto para el grupo de madres y de las crías del experimento de intoxicación del tolueno durante el desarrollo. En la gráfica A, no se muestran diferencias significativas en el número de células BrdU+ para el grupo de animales tratados durante su etapa adulta (madres, intoxicadas durante 72 días). En cambio, en la gráfica B, sí que se observan diferencias significativas estadísticamente para el número de células BrdU+ contadas en el DG de las crías intoxicadas durante su gestación y etapa postnatal temprana. Cabe destacar, la diferencia en el número de células marcadas promedio entre madres y crías, debida a que el marcaje se inyectó en etapas diferentes. * $P < 0.05$.

Con el objetivo de confirmar los datos observados con el estudio de la proliferación, se procedió al estudio de la ultraestructura del DG, con la intención de observar las diferencias morfológicas que la intoxicación con tolueno pudiera causar, tanto en el grupo de las madres como con el de las crías. En este estudio, realizado al microscopio electrónico de transmisión, no se encontraron diferencias entre los nichos neurogénicos presentes en los controles, ni en los animales tratados con el solvente. Existiendo en ambos

casos en nichos celulares en las mismas proporciones y con una morfología celular semejante.

4.2.2.3. SUPERVIVENCIA

Para analizar si el tolueno provoca afectaciones en la maduración y diferenciación celular de las crías a las que se les administró tolueno “*in utero*” y BrdU en el día E16, se cuantificó en número de neuronas BrdU positivas y que coexpresarán NeuN, en una franja de 100 micras en la corteza motora (con coordenadas aproximadas estimadas en el atlas histológico de Paxinos). En ellas se analizó la distribución de estas marcas por las capas celulares que la conforman. Encontrando diferencias significativas en las células doblemente marcadas entre los animales control y los tratados con tolueno, tanto en las crías como en las madres.

Para el caso de las madres, tratadas con tolueno durante 72 días, no se encontraron diferencias significativas para las células doblemente marcadas con BrdU/NeuN en la corteza entre animales control y los tratados [$P = 0.0565$, $t=2.357$, $df=6$], observándose una reducción del 23.80% de la media de los animales que inhalaban tolueno (3.200 ± 0.200) respecto a la media de los animales control (4.200 ± 0.374). Tampoco se encontraron diferencias para el número de células NeuN totales marcadas entre ambos tratamientos [$P = 0.0961$, $t=2.046$, $df=5$], y la diferencia entre las medias de ambos tratamientos fue del 10.59% (Fig.55).

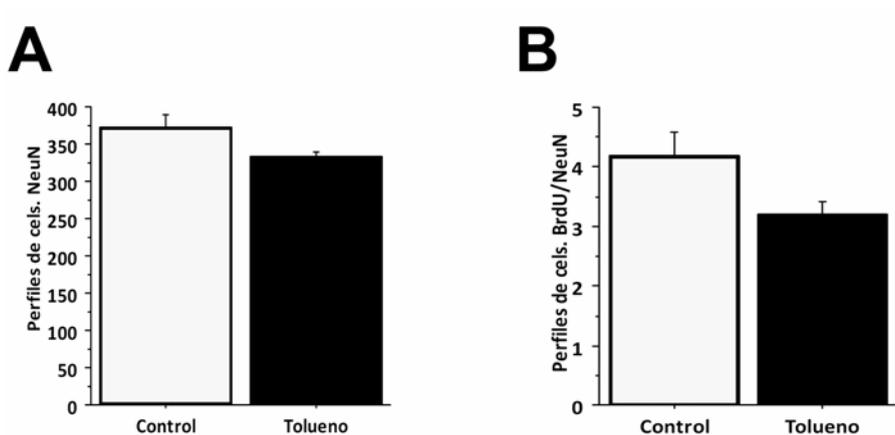


Figura 55. Efectos sobre las células BrdU/NeuN para el grupo de madres tratadas durante 72 días con tolueno. En la gráfica A, no se muestran las diferencias significativas existentes para el número de células NeuN⁺. Del mismo modo, en la gráfica B, tampoco se observan diferencias significativas estadísticamente para el número de células BrdU⁺/NeuN⁺.

En el caso de las crías, para el total de neuronas marcadas la media para los controles fue de 339.8 ± 25.74 y para los animales tratados con tolueno de 151.2 ± 18.08 , con una diferencia estadísticamente significativa de [$F_{(1,8)} = 35,96$, $P = 0.0003$]. Del mismo modo, las células marcadas doblemente con BrdU/NeuN mostraron diferencias significativas entre animales control y los tratados con tolueno [$F_{(1,8)} = 26.13$, $P = 0.0009$], con una diferencia de 38.89 % entre las medias de los controles y los animales tratados (Fig.56).

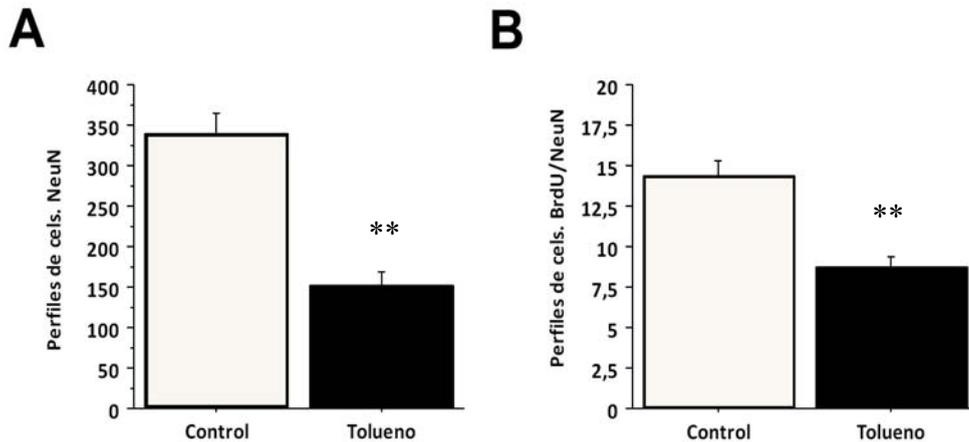


Figura 56. Efectos sobre las células BrdU/NeuN para el grupo de crías expuestas durante su desarrollo y etapa postnatal temprana. En la gráfica A, se muestran las diferencias significativas existentes para el número de células NeuN+ para el grupo de las crías. Del mismo modo, en la gráfica B, se observan diferencias significativas estadísticamente para el número de células BrdU+/NeuN+. ** $P < 0.001$.

En la figura 57 puede verse el tipo de marcaje conseguido para la inmunocitoquímica de BrdU/NeuN realizada sobre los cortes de corteza de los animales expuestos a tolueno durante 72 días (tanto a las madres como para las crías), junto con una ampliación del doble marcaje.

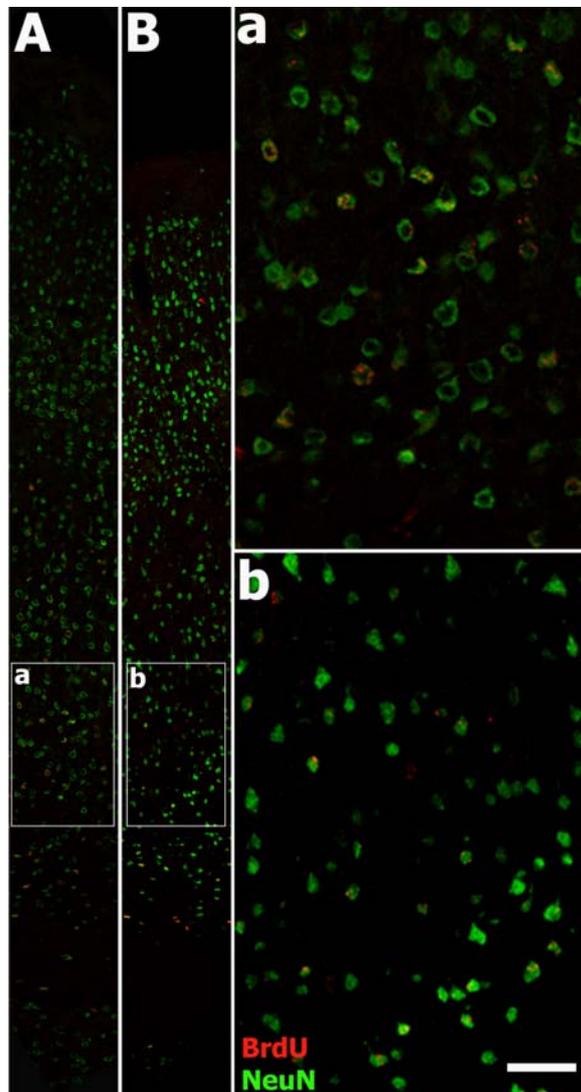


Figura 57. Efecto del tolueno sobre la inmunohistoquímica fluorescente de BrdU/NeuN en la corteza de las crías. Las dos fotografías situadas a la izquierda del panel muestran la reconstrucción completa de la inmunocitoquímica de fluorescencia de la corteza de las crías control (C) y las expuestas al tolueno (T). Las fotografías de la derecha son ampliaciones de la zona señalada en rojo en las fotografías anteriores. Se ha marcado con una flecha blanca la célula con doble marcaje para BrdU (Rojo) y NeuN (Verde). Escala 50 μ m.

4.2.2.4. MADURACIÓN

En cuanto al marcador DCX estudiado tanto en las madres como en las crías del mismo modo que en el experimento anterior, es decir, analizándose tanto la longitud como el número de dendritas de las neuronas marcadas, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, ni en las madres expuestas directamente al tolueno ni en las crías que lo recibieron durante su desarrollo. Y las medias obtenidas en cada caso siempre eran mayores para el grupo control que para el grupo expuesto al solvente.

Analizando en detalle estos resultados, en cuanto al número de dendritas totales para el grupo de madres expuestas directamente al solvente, vemos que las diferencias no fueron significativas [$F_{(1,3)} = 2.241$, $P = 0.2313$], ni tampoco para el número de dendritas secundarias [$F_{(1,3)} = 1.880$, $P = 0.2639$], ni para las terciarias [$F_{(1,3)} = 3.153$, $P = 0.1739$], y ni siquiera se observaron dendritas cuaternarias como para ser analizadas (Fig.58).

En el número de dendritas para las crías expuestas durante su desarrollo, no se obtuvieron diferencias significativas en el total de dendritas [$F_{(1,18)} = 1.725$, $P = 0.2056$], ni para las dendritas secundarias [$F_{(1,18)} = 2.455$, $P = 0.1345$], ni en las terciarias [$F_{(1,18)} = 0.3097$, $P = 0.5847$], ni en las dendritas cuaternarias [$F_{(1,18)} = 0.0608$, $P = 0.8080$] (Fig.59).

Por último, teniendo en cuenta la longitud del árbol dendrítico completo marcado con DCX para las neuronas dibujadas, se observaron diferencias significativas en el grupo de animales expuestos durante su etapa adulta, es

decir, para el grupo de madres ($[F_{(1,198)} = 12.17, P = 0.0006]$), viéndose una diferencia del 26.61%, con una media menor de los animales tratados con tolueno (2278 ± 145.7 micras) que la de los animales control (3104 ± 177.8 micras). Del mismo modo, los resultados también fueron significativos estadísticamente para el grupo de animales crías [$F_{(1,47)} = 8.224, P = 0.0062$].

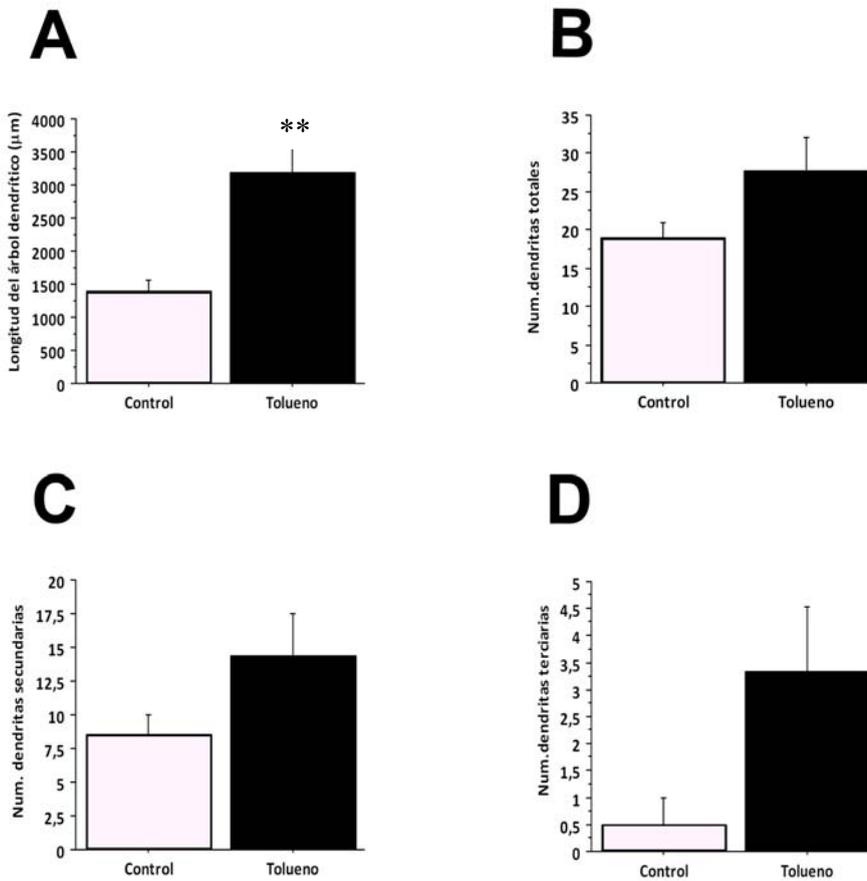


Figura 58. Efectos de la intoxicación con tolueno durante 72 días sobre el marcador DCX. En estas gráficas puede verse el efecto de la intoxicación al tolueno sobre el marcador DCX. En la gráfica A se muestran resultados estadísticamente significativos para la longitud del árbol dendrítico. En el resto de gráficas no se encontraron diferencias significativas, aunque en todos los casos los valores medios de los animales tratados con tolueno fueron mayores que los obtenidos en los controles. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

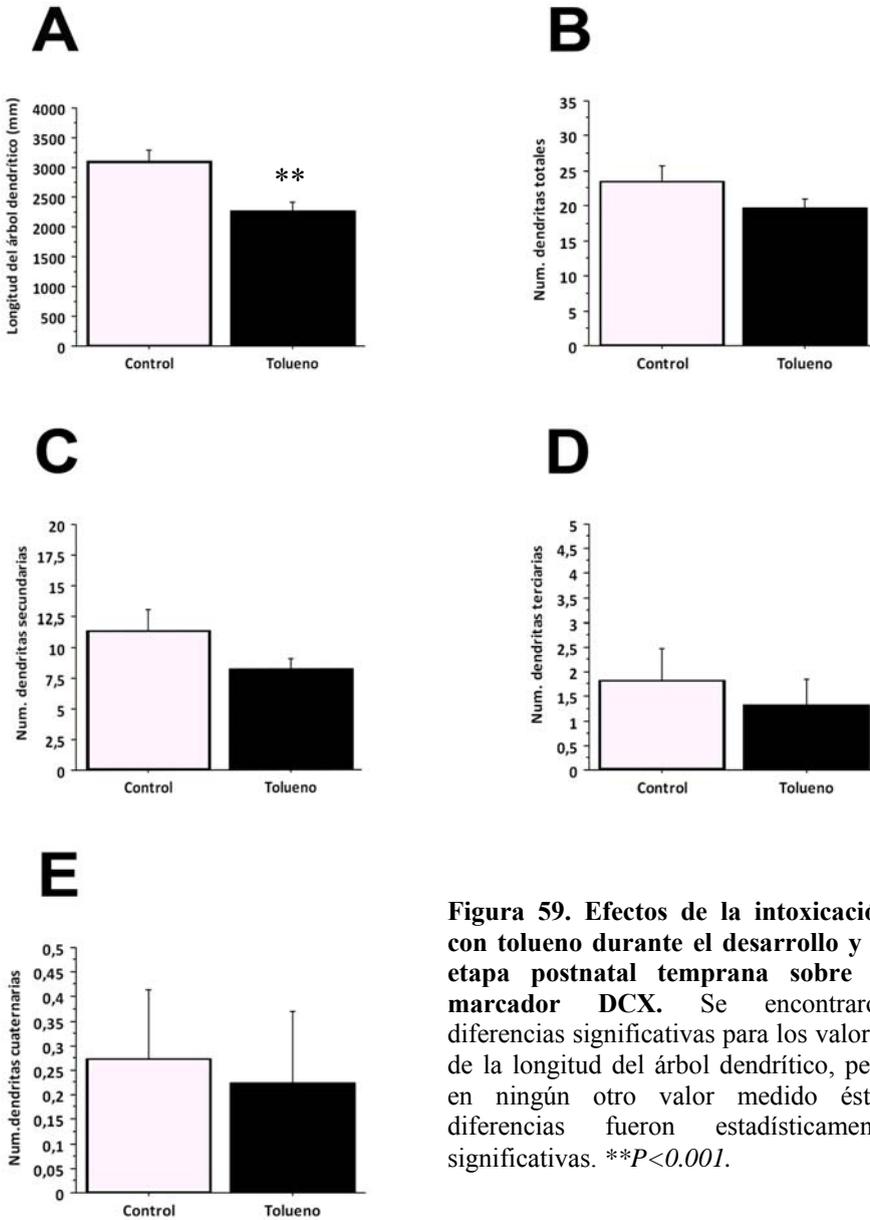


Figura 59. Efectos de la intoxicación con tolueno durante el desarrollo y la etapa postnatal temprana sobre el marcador DCX. Se encontraron diferencias significativas para los valores de la longitud del árbol dendrítico, pero en ningún otro valor medido éstas diferencias fueron estadísticamente significativas. **** $P < 0.001$.**

4.2.2.5. MUERTE CELULAR

Para el estudio de la muerte celular se empleó una inmunohistoquímica contra caspasa 3 en el hipocampo. En ella se observó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las madres control y las tratadas (P valor=0.001, $t=12.67$, $df=44$), al igual que entre las crías control y las expuestas al tolueno (P valor=0.001, $t=9.167$, $df=44$) (Fig.60).

En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre las madres y las crías control (P valor=0.05, $t=1.000$, $df=44$), ni entre las expuestas al tolueno (P valor=0.05, $t=2.50$, $df=44$), pero sí que fueron significativas las diferencias entre madres control y crías tolueno (P valor=0.001, $t=10.17$, $df=44$), o bien, entre madres tolueno y crías control (P valor=0.001, $t=11.67$, $df=44$).

Por tanto, el aumento significativo de los valores de caspasa-3 en animales que inhalaban tolueno, muestra el aumento de muerte celular inducido por el solvente.

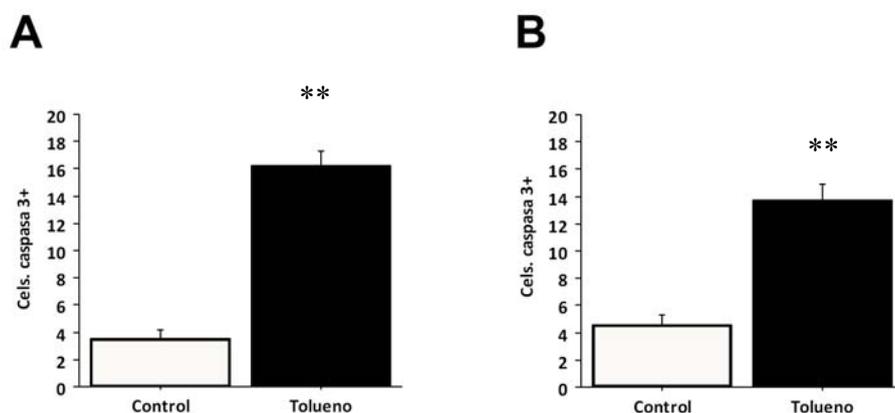


Figura 60. Los niveles de caspasas muestran la muerte celular producida por la intoxicación con tolueno durante el desarrollo. Tanto en el caso de las gráficas de las madres (A), como las de las crías (B), se muestran efectos significativos en los niveles de caspasa, demostrando la aparición de muerte celular inducida por la exposición al tolueno, al tener un valor medio en el número de caspasas mayor en los animales tratados con tolueno que el obtenido para los animales control. No se observaron variaciones significativas en los valores medios entre madres y crías bajo los mismos tratamientos. $*P < 0.001$.

Al igual que en el experimento de administración de tolueno durante 24 días, con el objetivo de confirmar la muerte celular causada por el solvente, se analizaron las células de microglía presentes en el DG, mediante el marcador OX-42, puesto que en este tipo celular se producen alteraciones como consecuencia de estímulos externos como la muerte celular.

Las diferencias morfológicas en la microglía fueron muy evidentes para el grupo de las madres tratadas durante 72 días y para el grupo de las crías expuestas durante su desarrollo y etapa postnatal temprana. La microglía se

encontraba mucho más activada en el grupo tratado con tolueno que con el grupo control (Fig.61 y 62). Tanto la morfología de las células OX-42 dibujadas, como la medida de los anillos que se usaron para medir la activación, mostraron diferencias significativas entre grupos control, con una menor media de activación, y los animales expuestos (tanto directamente como durante el desarrollo) al tolueno, y cuya media de activación era mucho mayor.

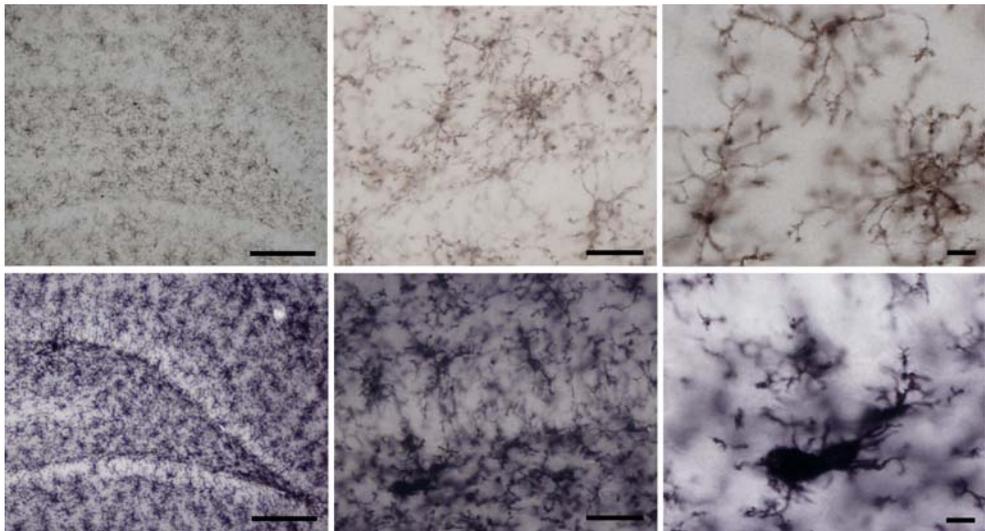


Figura 61. Efectos del tolueno sobre el grupo de las madres para el marcador OX-42. Fotografías a diferentes ampliaciones del DG de animales control (serie superior) y animales tratados con tolueno (serie inferior). En todas las fotografías puede observarse la mayor activación de las células de microglía de los animales que inhalan tolueno, puesto que poseen menor tamaño a las células microgliales observadas en los animales control.

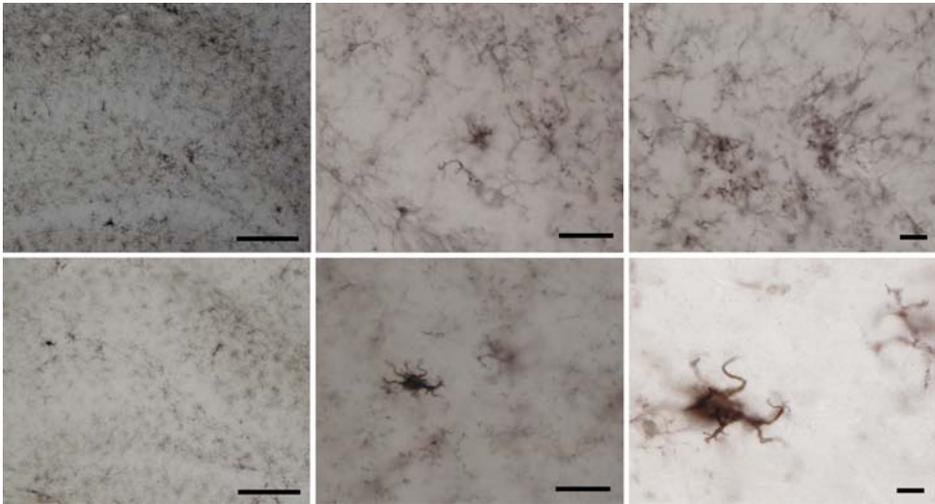


Figura 62. Efectos del tolueno sobre el grupo de las crías para el marcador OX-42. Series de fotografías a diferentes ampliaciones del GD de animales control (serie superior) y animales tratados con tolueno (serie inferior). En ellas se observa claramente la mayor activación de las células microgliales de los animales tolueno sobre los controles.

En los anillos concéntricos separados cada 1 μm , que fueron empleados para caracterizar las células de microglía de las madres se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos [$F_{(1,58)} = 5.523$, $P = 0.0222$]. El mismo resultado se obtuvo para las crías, que mostraron diferencias significativas [$F_{(1,188)} = 69.150$, $P < 0.0001$] y una disminución del 56.81 % en la media de los controles respecto a la media de los animales con tolueno (Fig.63).

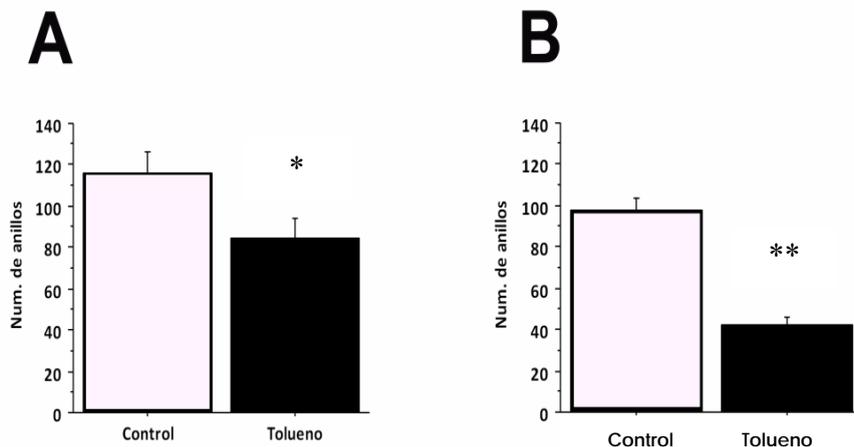


Figura 63. Valores de la microglía tras un tratamiento con tolueno durante el desarrollo y la etapa postnatal temprana. En estas gráficas se observa una disminución, para el grupo tratado con tolueno, en el promedio del sumatorio total del número de anillos que atraviesa cada árbol dendrítico, siendo estas diferencias estadísticamente significativas tanto para las madres (A), como para las crías (B). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

Del mismo modo que tras un aumento de la muerte celular se produce una activación de las células de microglía, se analizó si se producía el mismo efecto sobre las células GFAP+, es decir, si se producía una gliosis reactiva como respuesta ante la situación de muerte celular causada por el tolueno.

Los resultados obtenidos para el marcador GFAP pueden observarse en las imágenes (Fig. 64 y 65), donde se muestra tanto el incremento en la arborización como el aumento en número de células marcadas con GFAP. Las diferencias fueron estadísticamente significativas tanto para el caso de las madres (P valor=0.0007, $t=4.168$, $df=16$) como para el caso de las crías

(P valor=0.008, $t=3.228$, $df=11$). En ambos casos los valores promedios fueron mayores en los animales expuestos al tolueno que para los controles.

A la vista de los resultados obtenidos para el marcador astrocítico GFAP, puede decirse que la intoxicación por tolueno produce gliosis en el DG.

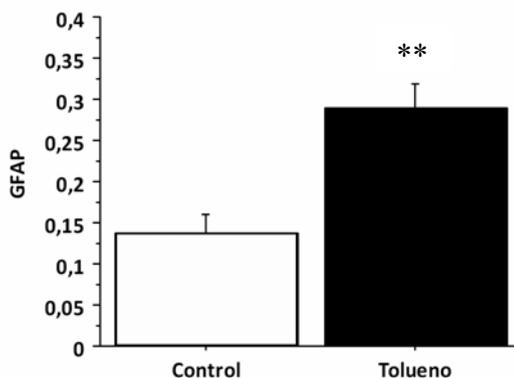
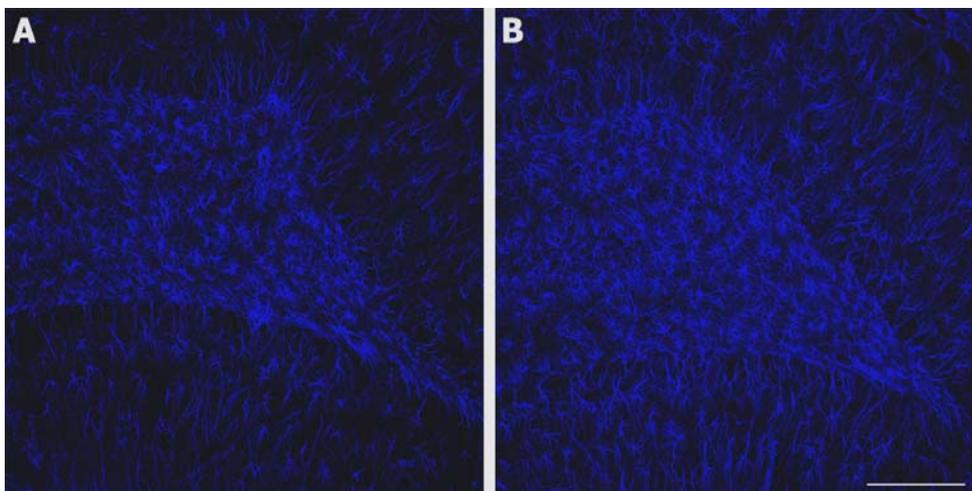


Figura 64. Aumento de la gliosis tras la exposición al tolueno durante 72 días para el grupo de las madres. En las imágenes puede verse el aumento del marcaje de GFAP en los animales tolueno (B) comparándolo con el GFAP presente en los controles(A). Del mismo modo, la gráfica muestra el aumento estadísticamente significativo de los valores promedios de los animales que inhalaron tolueno sobre los controles. $**P < 0.01$.

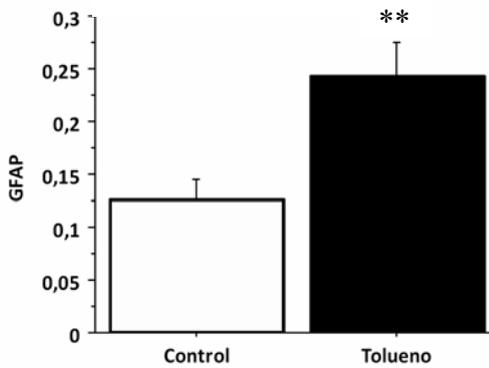
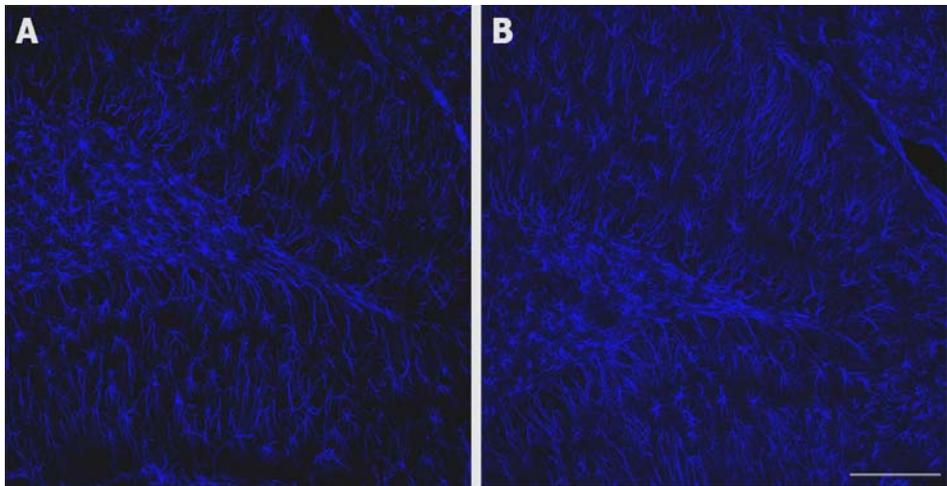


Figura 65. Aumento de la gliosis tras la exposición al tolueno durante el desarrollo y la etapa postnatal temprana para el grupo de las crías. En las imágenes puede verse el aumento del marcaje de GFAP en las crías expuestas durante su desarrollo (B), comparándolo con el GFAP presente en los controles (A). El mismo resultado se ve representado en la gráfica que muestra valores menores de GFAP en los animales control, y valores mayores en las crías expuestas al solvente. **** $P < 0.01$.**

Tras los análisis inmunohistoquímicos realizados para demostrar la presencia muerte celular causada por el tolueno, se procedió a estudiar los cambios ultraestructurales causados por esta muerte. Para ello se analizó la morfología del DG empleando el microscopio electrónico de transmisión.

Se observan tres diferencias principales en la ultraestructura de los animales expuestos al tolueno. La primera diferencia que se observó, fue la visible desorganización existente en la capa granular del hipocampo, en los animales tratados se observa una desestructuración de la habitual alineación existente en las células granulares, y con irregularidades en la cantidad de capas (existiendo zonas con más capas que otras). La segunda característica diferente fue: la existencia de un mayor número de células microglías en las ratas expuestas al tolueno, y además, en la mayoría de casos, estas células de microglía se situaban junto a astrocitos. Por último, se observaron diferencias en la morfología de las células granulares del grupo tratado con el solvente, presentando éstas, formas más ovaladas a las habituales redondeadas de las células granulares del grupo control, y presentando mayor variabilidad en el tamaño (Fig.66).

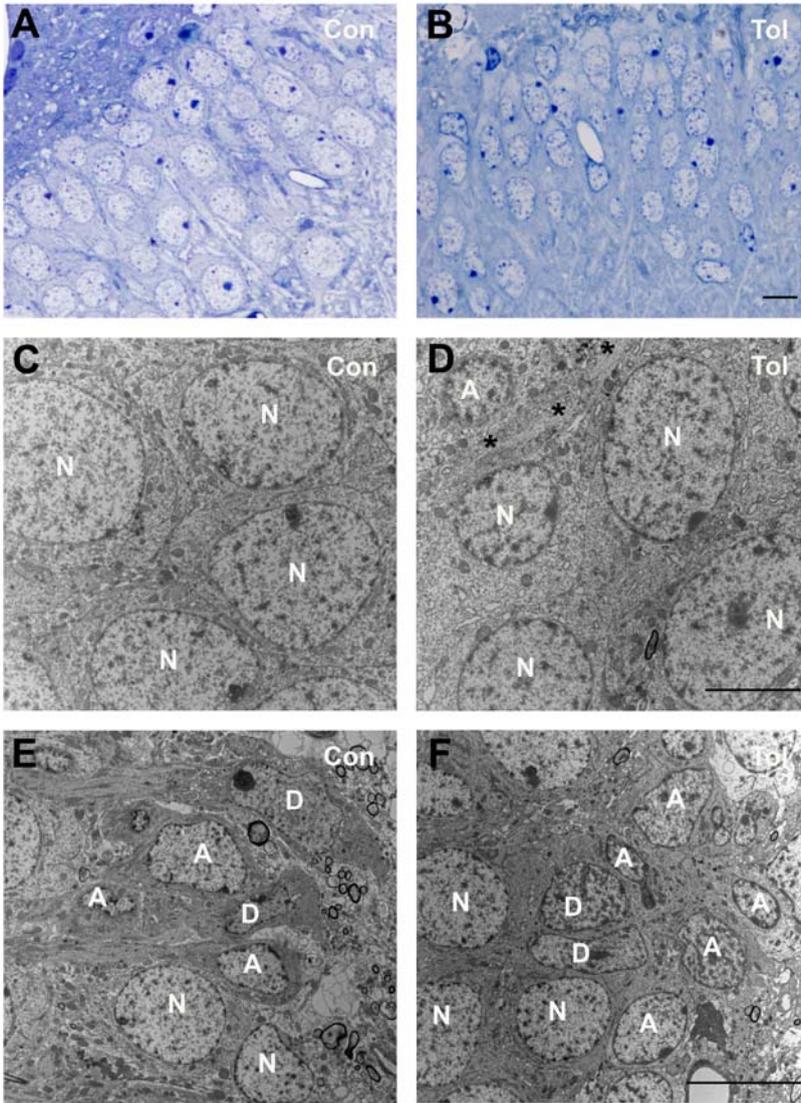


Figura 66. Estudio de la ultraestructura del DG tras un tratamiento con tolueno durante el desarrollo. Las dos primeras imágenes de fotografías de semifinos muestran la organización normal de los controles (A) y la desorganización de la capa granular del DG en los animales expuestos al tolueno (B). (C) células redondeadas y de tamaños uniformes observadas en los animales control, (D) células de formas y tamaños variables causadas por la exposición al tolueno. (E) Nicho neurogénico de un animal control y las diferencias observadas tras la exposición al tolueno (F). N = neuronas, A = astrocitos, D = célula precursora intermedia, *Escala: 10 μ m, 5 μ m, 2 μ m.*

Del mismo modo que en el experimento de tolueno administrado durante 24 días, se procedió a demostrar que la causa de la muerte celular observada, era debida al estrés oxidativo inducido tras la intoxicación por el solvente. Con este objetivo, se analizó la presencia en orina del metabolito 8-OHdGua, empleándolo como bioindicador del estrés oxidativo. Se obtuvieron las mismas concentraciones que en el caso del experimento anterior, que fueron del orden de 0.002 a 0.04 μM .

El pico de elución del 8-OHdGua a 14.68 min, posee un ESI positivo para la transición $284.4 > 168.3$ m/z. Del mismo modo, se escogieron los picos que aparecían en la misma transición y en el mismo patrón que el metabolito de estudio.

En este caso, los niveles de 8-OHdGua fueron significativos estadísticamente (P valor=0.030, $t=3.297$, $df=4$), pero con la media de los animales control mayor a la de los animales que inhalaban tolueno durante 72 días (Fig.67). Es importante destacar este resultado, puesto que nos permitirá discutir la existencia de la homeostasis redox para estos animales, es decir, este resultado permite argumentar la existencia de una tendencia a recobrar la homeostasis en los niveles de estrés oxidativo.

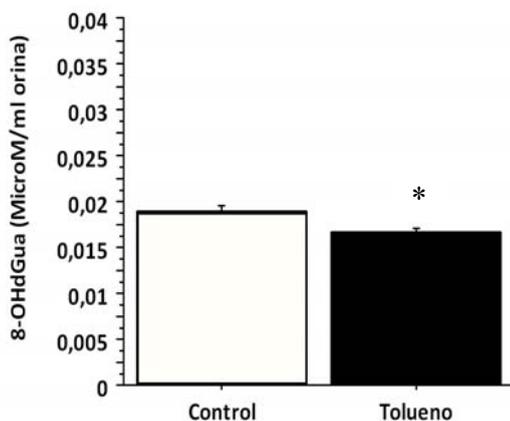


Figura 67. Valores obtenidos para el 8-OHdGua tras la exposición al tolueno durante 72 días. Al contrario que en el caso del experimento de exposición de tolueno durante 24 días, se obtuvieron valores mayores de 8-OHdGua en la orina de los animales control que en el caso de los animales expuestos al tolueno durante 72 días. * $P < 0.05$.

4.2.2.6. ESTUDIOS DE CONDUCTA

Para evaluar los efectos del tolueno administrado durante 72 días en las ratas adultas y de forma indirecta, intrauterinamente, para las ratas crías, se evaluaron las siguientes pruebas de conducta: reconocimiento de objetos y reconocimiento de lugar. Con la finalidad de ver la integridad de los circuitos hipocámpicos involucrados en el aprendizaje y la memoria.

Durante la realización de las pruebas de conducta se controló los niveles de estrés de los animales, computando la aparición de heces durante las

pruebas. En este aspecto, no se encontraron diferencias entre los animales control y los expuestos al tolueno.

❖ Protocolo de campo abierto

La actividad locomotora fue observada en el campo abierto, analizando la distancia recorrida a los tres días, como sumatorio de las tres sesiones realizadas o el valor de la primera sesión. Para los animales expuestos directamente al tolueno y considerando el cómputo global de los tres días juntos, se encontraron diferencias significativas [$F_{(1,22)} = 16.32$, $P = 0.0005$] con una diferencia del 36.48% de la media de los animales tratados con tolueno respecto a la meda de los controles. De igual modo, las diferencias entre grupos tratados y controles fueron significativas para los valores de la primera sesión [$F_{(1,6)} = 7.272$, $P = 0.0357$], obteniéndose una diferencia del 21.24% entre animales control y tratados para este caso.

Los resultados de la actividad locomotora, en los animales expuestos al tolueno durante su desarrollo etapa postnatal temprana, fueron significativos tras tres días de test de campo abierto [$F_{(1,34)} = 4.595$, $P = 0.0393$], pero no para la primera sesión [$F_{(1,10)} = 3.231$, $P = 0.1025$], aunque las diferencias entre animales controles y los que fueron expuestos al tolueno fueron del 36.66% en este caso.

Los resultados obtenidos en el campo abierto, tanto para las madres como para las crías, se encuentran representados en la Fig.68.

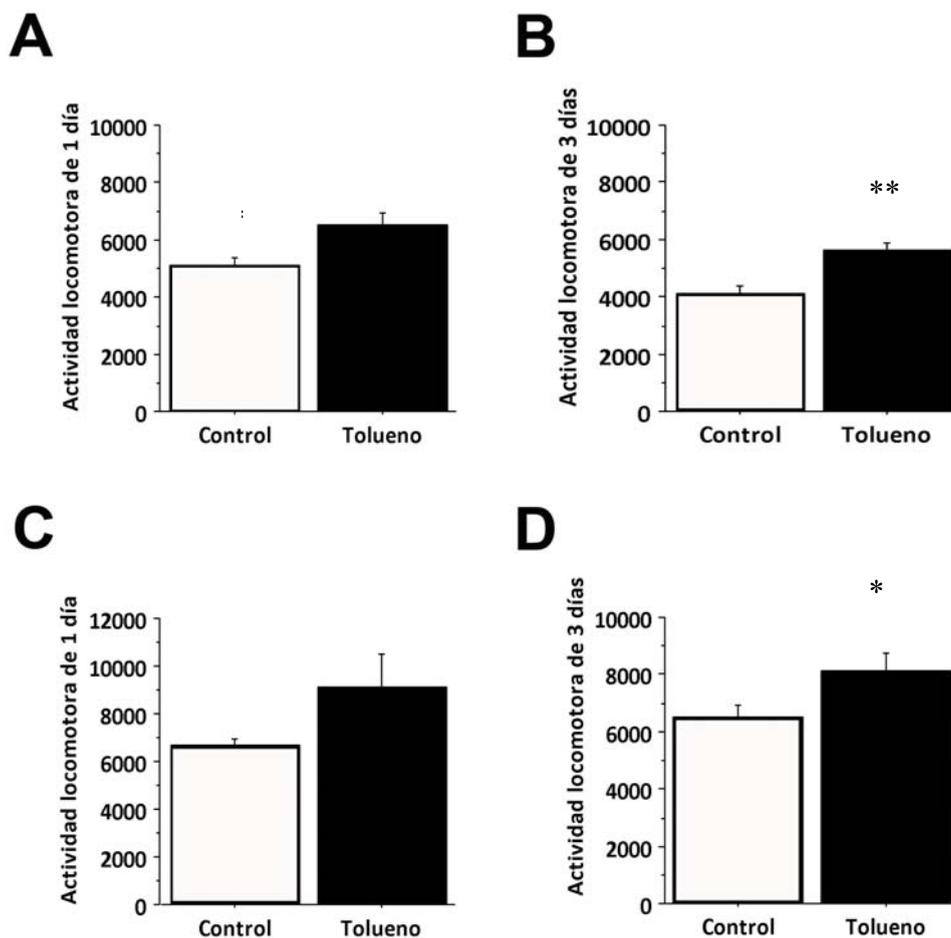


Figura 68. Resultados obtenidos para el test del campo abierto en el experimento de tolueno durante el desarrollo. Las gráficas A y B muestran los resultados obtenidos para el grupo de las madres en los test de campo abierto, tanto para los valores del test en el primer día (A) como para el sumatorio de los 3 días (B). Las gráficas C y D representan los valores para el grupo de las crías, tras el test del primer día (C) como después de realizar el test durante tres días consecutivos (D). Los valores de la actividad locomotora se midieron en milisegundos. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

❖ *Protocolo de reconocimiento de objetos*

El reconocimiento de objetos fue medido de dos formas diferentes. Analizando los eventos discretos, en los que el animal entraba en contacto con el objeto y el tiempo que éste pasaba explorándolo. En este caso los resultados también fueron diferentes entre madres y crías (Fig.69).

En los análisis con las madres, no se mostraron diferencias significativas en ningún caso. En el recuento de los eventos discretos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni para el objeto novel [$F_{(1,6)} = 0.8471$, $P = 0.3929$], obteniéndose una reducción del grupo de animales tratados respecto a los controles de un 41.38%, ni para el objeto conocido [$F_{(1,6)} = 1.190$, $P = 0.3171$]. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exploración que el animal dedicó para explorar el objeto novel [$F_{(1,6)} = 0.6809$, $P = 0.4409$] ni el objeto conocido [$F_{(1,6)} = 1.102$, $P = 0.3343$], a pesar de que en este caso la reducción de la media para los animales expuestos a la droga sobre los controles fue del 60.71%.

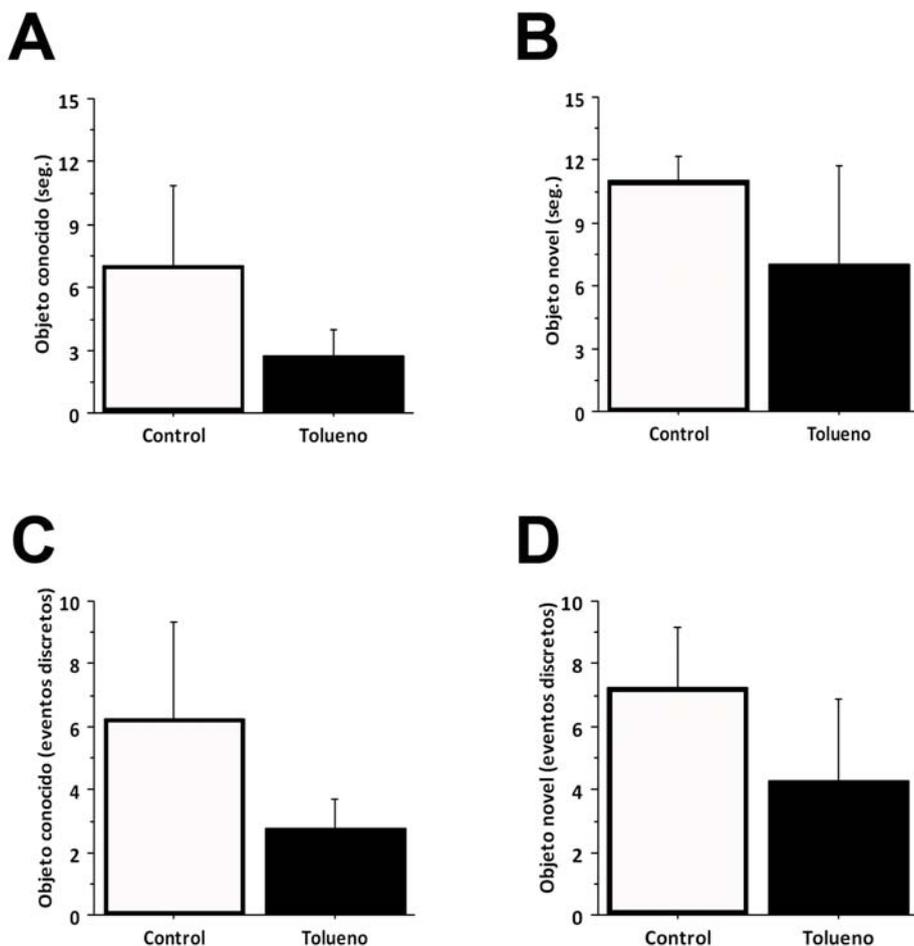


Figura 69. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de objetos para el grupo de las madres expuestas al tolueno durante 72 días. Las gráficas A y B muestran los resultados obtenidos para el grupo de las madres en el test de reconocimiento de objetos, considerando como medida el tiempo de exploración del animal a cada tipo de objeto, para el objeto conocido (A) y para el objeto novel (B). Las gráficas C y D representan los valores obtenidos empleando como medida los eventos discretos, que podemos definir como el número de veces que el animal se acerca a olfatear al objeto conocido (C) o al objeto novel (D).

En cuanto a las crías, mostraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de los eventos discretos para el objeto novel ($[F_{(1,10)} = 12.920, P = 0.0049]$), con una diferencia del 58.73% entre las medias de los dos grupos (control/tolueno), y no fueron significativas para el objeto conocido ($[F_{(1,10)} = 3.128, P = 0.1074]$). En cambio este patrón no se repitió para la medida del tiempo de exploración, así pues, el tiempo que se empleó en el análisis del objeto novel fue diferente estadísticamente, entre animales tratados y los controles $[F_{(1,10)} = 6.469, P = 0.0292]$, con una diferencia entre las medias del 59.13% entre ambos tratamientos. Del mismo modo, fue significativo estadísticamente el tiempo empleado en la exploración del objeto conocido $[F_{(1,10)} = 11.540, P = 0.0068]$ entre diferentes tratamientos, por tanto, en ambos casos los animales tratados con tolueno estaban más tiempo explorando, tanto los objeto conocido como el objeto novel. En ambos tipos de análisis, tanto en el recuento de los eventos discretos, como en el del tiempo de exploración, el grupo de animales tratados con el solvente poseía mayor valor promedio que el grupo control en el análisis del objeto novel, como puede observarse en la siguiente figura (Fig.70).

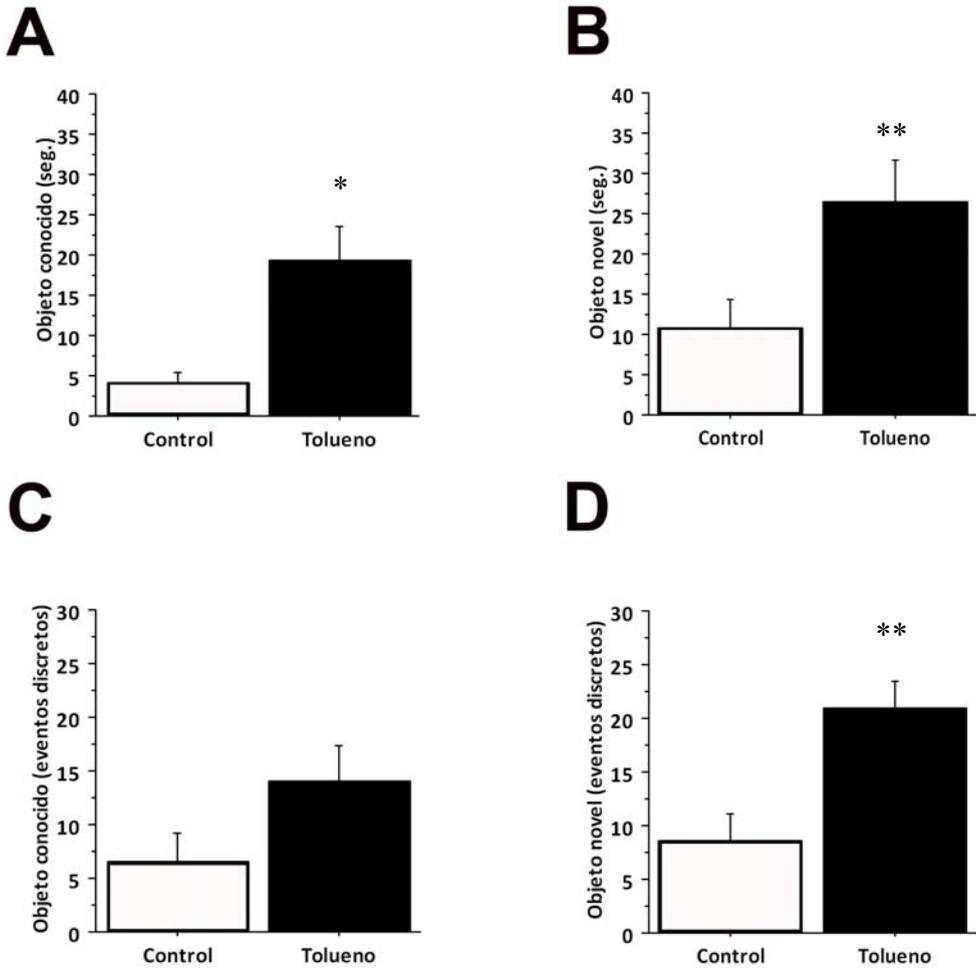


Figura 70 Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de objetos para el grupo de las crías. Las gráficas A y B muestran los resultados obtenidos para el grupo de las crías en el test de reconocimiento de objetos, considerando como medida el tiempo de exploración del animal a cada tipo de objeto, para el objeto conocido (A) y para el objeto novel (B). Las gráficas C y D representan los valores obtenidos empleando como medida los eventos discretos, que podemos definir como el número de veces que el animal se acerca a olfatear al objeto conocido (C) o al objeto novel (D). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Para confirmar los resultados obtenidos para el tiempo de observación de los objetos se empleó el índice de memoria, descrito por Engel y su equipo (Engel et al., 2006) como el tiempo que el animal dedica a observar el objeto novel dividido entre el tiempo total que está observando a los dos objetos (novel y conocido), expresado en porcentaje.

Los resultados obtenidos para el grupo de las madres fueron iguales a los descritos anteriormente, es decir, no se encontraron diferencias significativas [$F_{(1,6)} = 0.0883$, $P = 0.7763$] entre animales control (71.79 ± 13.34) y los expuestos al tolueno durante 72 días (65.26 ± 14.76) (Fig. 72). En cambio los resultados obtenidos para las crías, no mostraron diferencias significativas para el índice de memoria [$F_{(1,6)} = 0.0854$, $P = 0.3772$], entre los animales control (69.74 ± 9.81) y las crías expuestas al tolueno durante su desarrollo y etapa postnatal temprana (57.84 ± 8.34) (Fig.71).

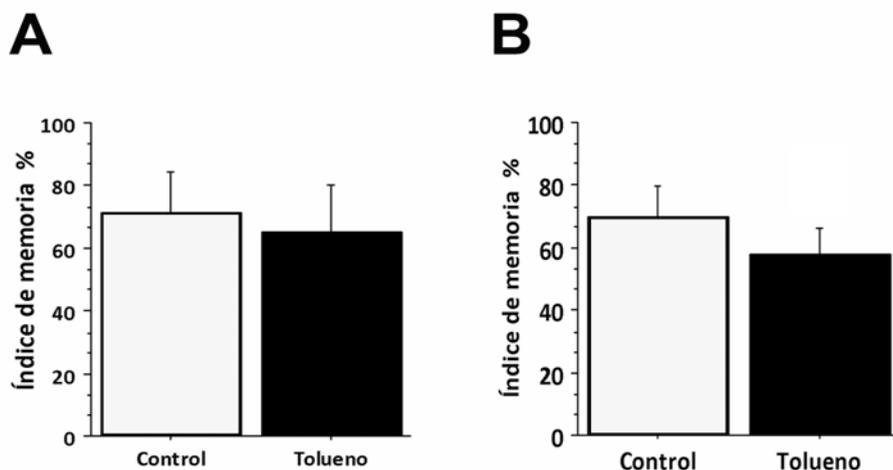


Figura 71. Efectos de la exposición al tolueno sobre el índice de memoria del DG. En la gráfica A se muestran los valores obtenidos para el índice de memoria, calculado a partir del tiempo de observación del objeto novel de las madres, en este caso el efecto no fue significativo. En la gráfica B se observan las diferencias en el grupo de las crías para el índice de memoria, calculado también a partir del tiempo dedicado a observar el objeto novel.

❖ Protocolo de reconocimiento de lugar

En el caso del reconocimiento de lugar, en el que se analizó, si el animal era capaz de identificar el objeto, que había sido cambiado de lugar, también se empleó el recuento de los eventos discretos y el tiempo empleado en la exploración en cada objeto.

En el grupo de las madres, no se encontraron diferencias significativas estadísticamente en los eventos discretos, ni para el objeto que se mantuvo fijo (en la misma posición) [$F_{(1,6)} = 0.1395$, $P = 0.7216$], ni para el objeto móvil (cambiado de posición) [$F_{(1,6)} = 3.589$, $P = 0.1070$], aunque la diferencia entre las medias de los animales tratados y los controles fue del 48.48%. Tampoco fueron significativos los valores para el tiempo de exploración empleado en el objeto fijo [$F_{(1,6)} = 0.0895$, $P = 0.7748$] y en el móvil [$F_{(1,6)} = 5.170$, $P = 0.0633$], aunque también en este caso la diferencia entre las medias de ambos tratamientos fue muy alta, en este caso del 69.23% (Fig.72).

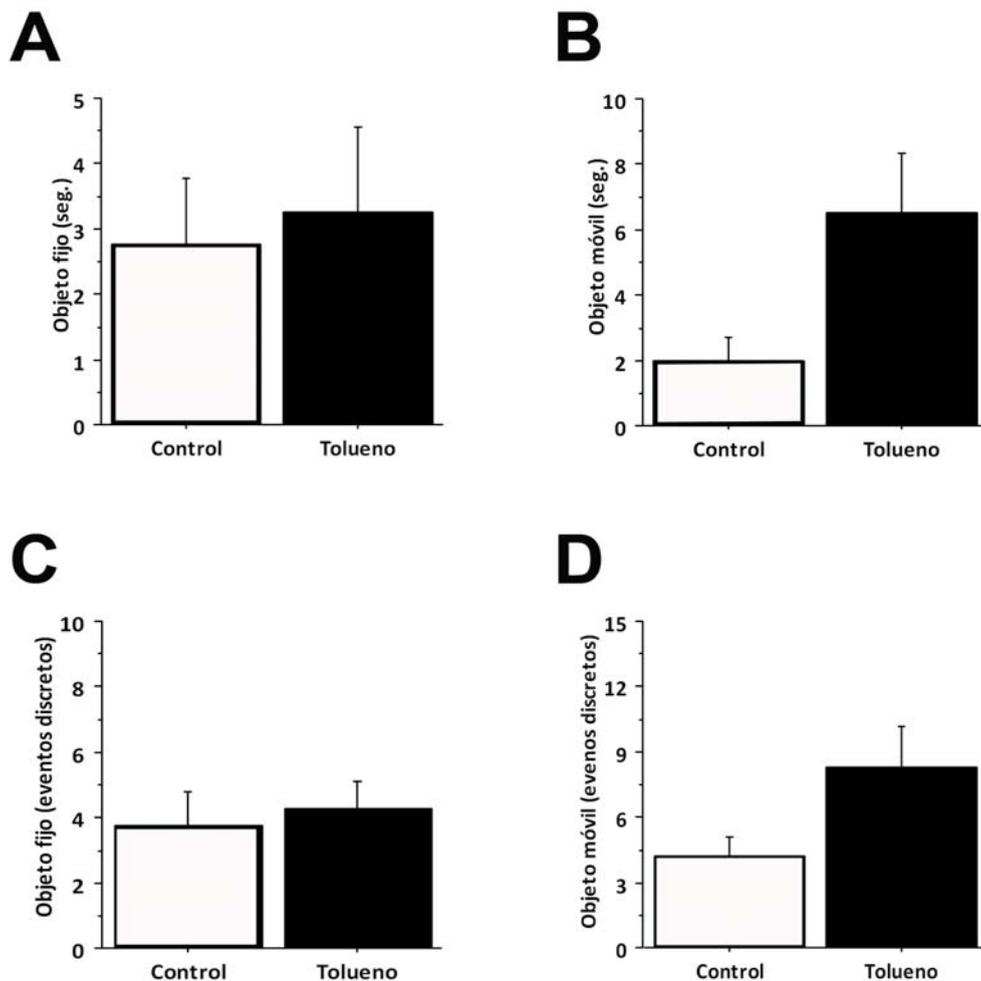


Figura 72. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de lugar para las madres expuestas al tolueno durante 72 días. Las gráficas A y B muestran los resultados obtenidos para el grupo de las madres en el test de reconocimiento de lugar, considerando como medida el tiempo de exploración del animal a cada tipo de objeto, para el objeto conocido (A) y para el objeto novel (B). Las gráficas C y D representan los valores obtenidos empleando como medida los eventos discretos, que podemos definir como el número de veces que el animal se acerca a olfatear al objeto conocido (C) o al objeto novel (D).

En cambio en las crías los resultados fueron diferentes (Fig.73). En el caso del análisis de los eventos discretos, las diferencias entre las medias de los animales control y los expuestos al tolueno durante su desarrollo fue del 51.47%, observándose un aumento de la media de los animales tratados sobre la media de los controles, dichas diferencias resultaron significativas para el objeto móvil [$F_{(1,10)} = 4.967$, $P = 0.0500$], pero no para el objeto fijo [$F_{(1,10)} = 1.613$, $P = 0.2328$]. No se obtuvieron los mismos resultados para el tiempo de exploración, resultando no significativos los valores para el objeto móvil [$F_{(1,10)} = 3.793$, $P = 0.0801$] y tampoco lo fueron para el objeto fijo [$F_{(1,10)} = 0.1444$, $P = 0.7119$]. Aunque la diferencia existente entre el grupo control y el grupo tratado con tolueno en el objeto móvil fue de 62.79% en la disminución de los controles respecto a los animales expuestos al solvente.

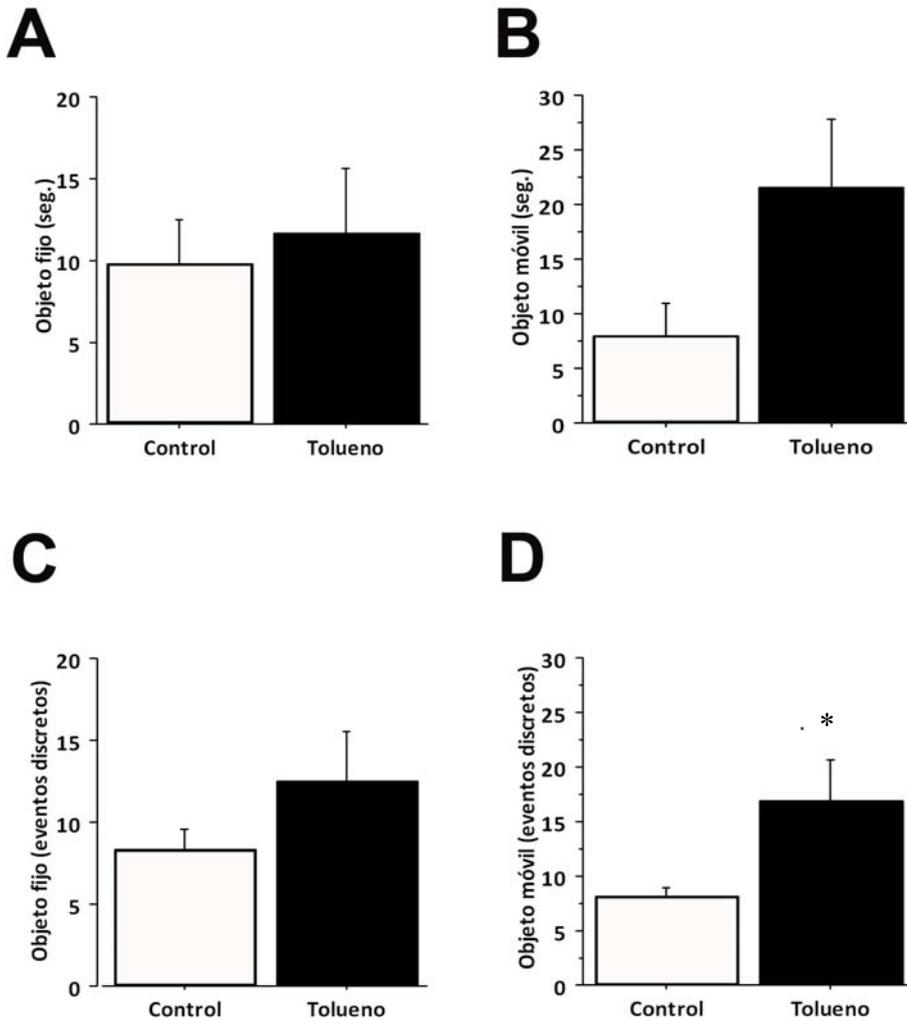


Figura 73. Resultados obtenidos para el test de reconocimiento de lugar para las crías expuestas al tolueno durante su desarrollo y etapa postnatal temprana. Las gráficas A y B muestran los resultados obtenidos para el grupo de las crías en el test de reconocimiento de lugar, considerando como medida el tiempo de exploración del animal a cada tipo de objeto, para el objeto conocido (A) y para el objeto novel (B). Las gráficas C y D representan los valores obtenidos empleando como medida los eventos discretos, que podemos definir como el número de veces que el animal se acerca a olfatear al objeto conocido (C) o al objeto novel (D). * $P < 0.05$.



DISCUSIÓN



CAPÍTULO – 5: DISCUSIÓN

El fenómeno de las drogas ha experimentado en los últimos años un profundo proceso de transformación, en paralelo a la evolución de las sociedades desarrolladas. En España, en la actualidad, las drogas están vinculadas a la cultura del ocio, a diferencia de lo que sucedía en los años 80, donde el consumo de drogas, fundamentalmente de heroína, estaba asociado a la marginalidad y a la delincuencia (Calderón, 2009).

La heroína ha sido sustituida por sustancias como el cannabis, la cocaína o el éxtasis, combinadas entre sí o mezcladas con alcohol y tabaco (Calderón, 2009). Este cambio de las sustancias también se ha acompañado de nuevos patrones de consumo. De este modo, estamos ante consumidores de cocaína cada vez más jóvenes, perfectamente integrados en la sociedad, que consumen con fines recreativos y socializantes y para quienes estos consumos son actos tribales cuyos riesgos desdeñan (Calafat, 2009). A pesar de esto, siguen existiendo drogas asociadas a estratos sociales marginales, como el tolueno, donde su bajo coste y su fácil acceso, convierten a este solvente en la droga de mayor consumo entre la gente de bajo poder adquisitivo, principalmente en los países de América Latina.

En la presente tesis doctoral, se ha estudiado el efecto de las drogas sobre la neurogénesis, cuyo consumo por estratos sociales diferentes, las ha clasificado popularmente como una droga para ricos, para el caso de la

cocaína, mientras que el tolueno se ha considerado la droga de los estratos sociales más marginales.

Cabe destacar, que lo más adecuado para el estudio del consumo de drogas, sería emplear casos reales, es decir, efectuar estudios con humanos y con dosis reales. La dificultad que conlleva esta clase de estudios, ha llevado a que la mayoría de estos se realicen con animales de laboratorio, intentando simular, en lo posible, las condiciones reales del consumo de drogas como uso recreativo. Para ello, en esta tesis doctoral se han empleado ratas Wistar, cuya neurogénesis y estructura cerebral ha sido ampliamente caracterizada en otros estudios.

A pesar de que prácticamente no esté estudiado el efecto que la exposición al tolueno causa sobre la neurogénesis, en cambio, son muchos los artículos que abordan el estudio de las alteraciones neurogénicas causadas por las enfermedades neurodegenerativas. Así pues, en enfermedades como el Alzheimer, se producen graves alteraciones funcionales en el hipocampo que causan deterioro cognitivo (Stackman *et al.*, 2003, Tales *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008).

Para ello se han empleado diferentes estadios temporales de estudio, que pueden ser clasificados en estudios semicrónicos, los realizados para el caso de la administración de cocaína durante 8 días, y en estudios crónicos, como los realizados con ambas drogas administradas durante 24 días, o bien, los realizados con tolueno, para el estudio de los efectos que provoca sobre el

desarrollo. Se han escogido estudios crónicos con la intención de analizar los efectos del consumo prolongado de estas drogas, puesto que las consecuencias son mucho más graves tras una administración repetida que en una aguda. Además, aunque se ha establecido el mismo estadio temporal de 24 días en ambas drogas, para poder establecer una analogía aproximada entre los efectos analizados, cabe mencionar que en ningún caso son comparables estrictamente puesto que sus efectos bioquímicos sobre el cerebro no son iguales, y además, los dos estudios no se realizaron en paralelo ni bajo las mismas condiciones experimentales por lo que su comparación sería inadecuada.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos tras los experimentos con cocaína y tolueno.

5.1. COCAÍNA

En el presente estudio, se observó que la cocaína tiene efectos adversos en la proliferación. Del mismo modo, estudios con opioides y con psicoestimulantes, han permitido establecer dos posibles explicaciones para la disminución de la proliferación en la SGZ del giro dentado del cerebro adulto: (1) por métodos indirectos: alteración del ambiente proproliferativo, (2) por métodos directos: mediante la acción directa de las drogas de abuso sobre las células precursoras, y la alteración del ciclo celular de las células progenitoras de la SGZ (Lee *et al.*, 2008).

(1) indirecta: en este caso la cocaína alteraría el ambiente proproliferativo, donde se encontrarían las células con capacidad para dividirse. Los factores de crecimiento posiblemente medien en la respuesta del comportamiento o en la neuroplasticidad vista después de la exposición crónica a las drogas de abuso (Berhow *et al.*, 1995; Horger *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 1999; Kolb *et al.*, 2003; Castren, 2004; Lu *et al.*, 2004a). Por lo tanto, es posible que la administración crónica de opioides y la exposición a psicoestimulantes alteren los factores de crecimiento en el hipocampo, produciendo una inhibición de la proliferación en la SGZ. Se sabe que la morfina inhibe los niveles de citoquina IL1b del hipocampo (Patel *et al.*, 1996), del mismo modo existen artículos que muestran un cambio dinámico en los niveles de algunos factores de crecimiento hipocámpicos, incluyendo BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), IGF1, IGF2, y IL1b, después de un tratamiento crónico con morfina en rata y en ratón (Mandyam

y Eisch, 2004). Además de esto, hay que considerar que la cocaína es una droga que induce cambios complejos en la neuroquímica del cerebro y por tanto, activa sistemas dopaminérgicos y posiblemente algunos otros, que pueden estar implicados de alguna forma en este mismo proceso.

(2) por métodos directos: en este otro caso pueden abordarse diferentes hipótesis de acción, como son: la acción directa de la cocaína sobre los receptores de los factores de crecimiento, o bien la acción directa de esta droga sobre el ciclo celular.

Los factores de crecimiento se han propuesto como posibles reguladores de las células precursoras de la SGZ (Cameron *et al.*, 1998), puesto que se ha demostrado que estas células progenitoras expresan solamente unos pocos receptores de factores de crecimiento *in vivo* (Okano *et al.*, 1996). Así pues, mientras que muchas alteraciones de la neurogénesis adulta podrían estar relacionadas con alteraciones en los niveles de corticosterona (Jacobs *et al.*, 2000; Duman *et al.*, 2001; Montaron *et al.*, 2003), únicamente una fracción de células de la capa SGZ expresan los receptores de alta o baja afinidad para los glucocorticoides (Cameron *et al.*, 1993), y éstos parecen estar en una etapa del desarrollo concreta de las células precursoras (García *et al.*, 2004a). Del mismo modo, pruebas indirectas sugieren que los receptores de opiáceos y de dopamina pueden estar expresándose en células precursoras de la SGZ (Eisch y Harburg, 2006). Resulta interesante considerar que las células recién nacidas en la SGZ expresan los receptores a través de los cuales los opioides y los psicoestimulantes pueden actuar de manera relativamente directa. A pesar de todo, serán necesarios más

estudios que identifiquen los receptores expresados por las distintas clases de precursores celulares de la SGZ, que proveerán la información necesaria para entender la regulación de la neurogenesis adulta, permitiendo explorar más sobre los mecanismos bioquímicos de las cascadas intracelulares relacionadas con estos receptores.

La hipótesis en la que se contempla la acción directa de las drogas sobre el ciclo celular, se basa en el hecho de que las drogas actúan sobre la dopamina y ésta, a través de sus receptores, puede regular el ciclo celular. Concretamente, ya ha sido publicado que la cocaína puede actuar sobre los receptores tipo D1, abundantemente expresados en las células granulares del DG (Mansour *et al.*, 1992), y de este modo podría actuar impidiendo la entrada de células de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Ohtani *et al.*, 2003). De esta forma, las células se quedarían detenidas en el ciclo celular debido a la exposición crónica a esta droga, mediante un mecanismo en el que podría estar involucrado el receptor de dopamina D1, aunque faltaría por determinar de qué modo estaría actuando. Cabe destacar el estudio de Lee y su equipo (Lee *et al.*, 2008), en cuyo artículo se demuestra que

se produce una inhibición de la proliferación de células neuronales precursoras, causada al producirse un arresto en la fase G1/S del ciclo celular, debido al efecto de la cocaína sobre la ciclina A2, que a su vez, estaría regulada por estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2008).

Posiblemente, este mecanismo de acción de la cocaína sobre el ciclo celular sea el más probable en el caso de los experimentos realizados en la presente tesis doctoral, aunque sería necesario realizar experimentos relacionados con el receptor de dopamina y las proteínas reguladoras del ciclo celular tras la exposición de cocaína, para poder dar una explicación bioquímica detallada de los resultados obtenidos.

También es posible que se produzca el mecanismo de acción a mitad de camino entre un método directo y uno indirecto, es decir, que el mecanismo sea una acción en cascada, en el que la acción producida sobre una célula haga que ésta transmita una señal a una segunda célula, que sea la que realmente muestre los efectos graves inducidos por la droga.

Por otra parte, se podría especular con la posibilidad de que un tratamiento crónico de cocaína podría causar alteraciones en la neurogénesis al limitar la supervivencia y la maduración de las nuevas células nacidas en el DG, de forma semejante a lo que ocurre con una exposición repetida de alcohol (Herrera *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005). Para estudiar la supervivencia y la maduración de las nuevas células generadas, se dieron pulsos de BrdU durante estadios tempranos del tratamiento a largo plazo de la cocaína, o antes del tratamiento. Cuando el BrdU fue administrado durante la primera semana del tratamiento de cocaína, el marcaje de BrdU se redujo, de forma no significativa, mostrando que la mayoría de células nacidas durante la primera semana de exposición a la cocaína sobreviven al tratamiento.

Para confirmar este dato, se diseñaron experimentos en los que se administró BrdU antes de que empezara el tratamiento con droga. Los resultados de estos experimentos mostraron que la supervivencia de los precursores neuronales en el DG no estaba comprometida por una exposición de cocaína a corto o largo plazo.

Tras obtener un descenso proliferativo del 30% en los animales tratados con cocaína, lo que significa que menos células se dividen normalmente tras la exposición de la droga, al usar el marcador de células inmaduras se esperaba que apareciera esta misma reducción del 30% en el número de células DCX+ del tipo menos desarrollado, correspondientes al subtipo 1, en los animales expuestos a la cocaína, puesto que este tipo celular se habría obtenido de una división celular que habría tenido lugar durante el tratamiento con cocaína. Del mismo modo, además de esperar una reducción del subtipo menos desarrollado, también se podría hipotetizar que serían más abundantes las células DCX+ con el árbol dendrítico más desarrollado, es decir los tipos 4 y 5, por lo que se produciría un aumento tanto en el número de dendritas como en la longitud del árbol dendrítico en los animales con cocaína sobre los controles. A pesar de lo que se esperaba, no se obtuvieron diferencias significativas en el número de dendritas ni en la longitud del árbol dendrítico ni tras 8 días de tratamiento con cocaína, ni tras el tratamiento crónico de 24 días con esta droga. Una posible explicación para que el descenso proliferativo no sea observado en el marcador de neuronas inmaduras DCX, es que esta alteración se haga patente en la estirpe glial, es decir, que las células marcadas con BrdU con

capacidad de madurar hacia una estirpe neuronal y glial (Kunze *et al.*, 2009), mantengan su diferenciación a neuronas prácticamente normal y la reducción afecte a la diferenciación hacia la estirpe glial (Cacci *et al.*, 2008).

A la vista de los resultados obtenidos, en los que se puede concluir que la cocaína no muestra ningún impacto en la supervivencia de las nuevas células hipocámpicas formadas, ni sobre la maduración celular, podría establecerse la hipótesis de que el arresto celular que la cocaína produce sólo tuviera lugar durante los primeros días de tratamiento con la cocaína, de este modo, si en las últimas etapas de tratamiento se produjera una adaptación a la droga, de modo que ésta no produjera efectos sobre la división celular, sería normal obtener medias semejantes entre los animales control y los tratados en el experimento de supervivencia y sería lógico que aparecieran células DCX+ del subtipo 1 en los animales con cocaína, puesto que este tipo de células se habrían dividido en estos últimos días del tratamiento con cocaína.

El estudio realizado por Noonan y su equipo en 2008 (Noonan *et al.*, 2008), también muestra un efecto sobre la proliferación celular tras la autoadministración de cocaína (40 mg/Kg) y ningún efecto sobre la maduración celular. En cambio, tras un periodo de abstinencia de 4 semanas de la droga, se produce una recuperación del efecto obtenido sobre la proliferación, de modo que durante el periodo sin droga se produce una normalización en la proliferación y en la supervivencia celular, además de producirse un aumento en las células DCX+, de esta forma el número de

células inmaduras aumenta en la SGZ posterior. Así pues, la hipótesis de una posible adaptación a la droga se vería apoyada por los resultados obtenidos en este estudio, ya que la plasticidad neuronal que permite la rápida recuperación de los efectos causados por la cocaína, sería posiblemente la responsable de la adaptación celular a la droga observada en nuestros experimentos.

Por otra parte, previamente se había demostrado que el desarrollo neuronal en el DG tarda de 10-11 días en extender sus axones en la región de CA3 (Zhao *et al.*, 2006). Debido a la dificultad para marcar selectivamente los axones de las neuronas inmaduras para observarlos al microscopio electrónico, se decidió realizar un estudio más general en el que se buscaron anomalías morfológicas en los animales expuestos a la cocaína, en los que tampoco se encontraron diferencias.

La cocaína afecta a gran variedad de neurotransmisores y sistemas endocrinos, estimulando el eje adrenal-pituitario-hipotalámico (Fiala *et al.*, 1998; Knuepfer *et al.*, 2001; Goeders, 2002), que se liga funcionalmente con la respuesta al estrés. El estrés puede regular la neurogénesis adulta en el DG del hipocampo de rata adulta y se sabe que altera las características sinápticas de la proyección de las fibras musgosas a la región CA3, causando atrofia intrínseca de las neuronas piramidales (Magariños *et al.*, 1997; McEwen, 1999). Además, se conoce que, otros tratamientos como una exposición crónica al alcohol y a la morfina, pueden alterar los patrones morfológicos de la maduración y/o la supervivencia de las nuevas neuronas

hipocámpicas formadas (He *et al.*, 2005; Kahn *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos sugieren que los efectos de la exposición crónica de cocaína son claramente dissociables de la respuesta al estrés, y los causados por otras sustancias adictivas.

La alteración de la neurogénesis adulta en el hipocampo ha sido recientemente asociada con la patofisiología de la depresión (Jacobs *et al.*, 2000; Kempermann y Kronenberg, 2003), al desarrollo de la adicción (Duman *et al.*, 2001; Abrous *et al.*, 2005) y al daño en el procesamiento de la memoria (Prickaerts *et al.*, 2004; Shors, 2004), estas anormalidades funcionales han sido detectadas en los consumidores habituales de cocaína (Rogers y Robbins, 2001). Basándonos en estas consideraciones, los resultados presentados sugieren que el déficit en la capacidad de auto-renovación del hipocampo, producido por la exposición crónica de la cocaína, puede contribuir en las anormalidades cognitivas y emocionales asociadas a la adicción a la cocaína.

5.2. TOLUENO

INTOXICACIÓN CON TOLUENO

La exposición al tolueno se realizó empleando dos dosis diarias con una duración por cada exposición de 30 minutos. Se estableció este parámetro temporal ya que una exposición excesivamente prolongada puede producir la muerte del animal. De este modo, con 30 minutos de exposición los animales mostraban los síntomas graves de una exposición al tolueno y al mismo tiempo, se aseguraba que los animales sobrevivirían al tratamiento, puesto que una exposición a elevadas dosis durante más tiempo puede llegar a producir un coma e incluso la muerte por depresión respiratoria (Evans y Balster, 1991). Además, entre las dosis diarias se dejó un intervalo de dos horas, aunque los animales mostraran una recuperación mucho más rápida, de esta manera, podían eliminar totalmente el solvente del torrente sanguíneo.

Además, durante la inhalación con tolueno se anotaron los síntomas observados sobre la función motora. Los síntomas mostraban un efecto bifásico del tolueno sobre la actividad locomotora, es decir, los cambios que el tolueno produce, varían con la dosis del solvente a la que son sometidos los animales. Tal y como se observaba durante la inhalación de las ratas a bajas concentraciones de tolueno, correspondientes a los primeros minutos de exposición, se produce una excitación motora, mientras que a elevadas concentraciones, cerca de los 30 minutos de inhalación, se perjudica el

movimiento, produciendo sedación y anestesia (Bowen y Balster, 1998, Yavich *et al.*, 1994a, Yavich *et al.*, 1994b).

Es interesante destacar que la exposición repetida a tolueno produce un aumento en la actividad motora, similar a la causada por la administración de cocaína (Beyer *et al.*, 2001). A la vista de los resultados apuntados por Gerasimov y su equipo, podría decirse que la administración conjunta de tolueno y cocaína, produce un aumento mucho mayor en los niveles de dopamina, medidos en el núcleo accumbens, que si la medida se realizaba considerando únicamente la exposición a cocaína. Por tanto, debe existir un mecanismo común entre ambas drogas que correspondería con la vía dopaminérgica (Gerasimov *et al.*, 2002).

ADMINISTRACIÓN DEL TOLUENO DURANTE EL DESARROLLO

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral para el estudio del efecto del tolueno sobre el desarrollo, fueron planteados con un protocolo semejante al descrito por Bowen (Bowen *et al.*, 2006). Quienes administraron tolueno (8000 ppm a 12000 ppm, durante 15 min, 2 veces/día) desde el día 8 de gestación hasta el día GD20. Este tratamiento aumentó significativamente los efectos causados por el solvente, observándose una disminución del peso corporal, en la longitud de las crías, y una mayor alteración en la conducta, así como un aumento en el número de malformaciones craneales (como la mirocefalia), “enanismo” y muerte.

En cambio, obtuvieron pocas diferencias en el ratio entre sexos (Bowen *et al.*, 2005). Los resultados presentados en estos estudios fueron semejantes a los obtenidos en la presente tesis. Estos déficits en el crecimiento son más persistentes tras exposiciones repetidas de 15 minutos de elevadas concentraciones que en los tratamientos de más tiempo (6 h) y menores concentraciones (entorno a los 1800 ppm) observados en otros artículos (Hougaard *et al.*, 1999, Jones y Balster, 1997, Thiel y Chahoud, 1997).

Otros estudios se centraron en los efectos del tolueno durante una exposición postnatal temprana, que también se analizaron en la presente tesis donde las crías recibieron el tolueno hasta el final de su destete. En ellos, se analizó el efecto del tolueno en el momento en el que tiene lugar la sinaptogénesis, y encontraron que este solvente altera varias respuestas relacionadas con el sistema glutamatérgico, observándose diferentes cambios bioquímicos. Por ejemplo, la hiperlocomoción inducida por agonistas de NMDA se reducía en ratas tratadas diariamente con tolueno (500 mg/kg, i.p.) desde el día 4 postnatal hasta el día 9 (Chien *et al.*, 2005), sugiriendo que la exposición al tolueno durante el crecimiento del cerebro puede alterar la respuesta conductual. Lee y su equipo (Lee *et al.*, 2005) demostraron la aparición de un aumento de la subunidad NR2A en el hipocampo y el cerebelo, y una disminución en la expresión de la subunidad NR2B de la capa molecular comparándola con las ratas control. Los mismos autores estudiaron los niveles del receptor NMDA en cultivo de células granulares del cerebelo obtenidas de crías expuestas a tolueno (200-1000

mg/kg, i.p.) durante PN4 a PN7, encontrando una disminución en los niveles de NR2B.

En resumen, todos estos resultados apuntan a que la exposición durante la gestación a elevadas concentraciones de tolueno, pueden causar elevados riesgos en los fetos, e incluso, dosis de menores concentraciones de este solvente muestran efectos adversos sobre las crías, aunque se desconoce la explicación bioquímica para estos cambios.

ESTRÉS OXIDATIVO Y TOLUENO

En nuestro estudio con tolueno podemos observar que tras la intoxicación se produce muerte de las neuronas maduras y posteriormente, de las células precursoras (tipo B). El principal motivo de que se produzca esta muerte es el aumento de la presencia de agentes causantes de estrés oxidativo. Al realizar el estudio con el LC/MS/MS se observó un aumento de la peroxidación lipídica utilizando como marcador el 8-OHdGua (Kasai *et al.*, 2008).

Tal y como se ha observado en los experimentos de tolueno, la exposición a altas concentraciones de este solvente lipofílico, puede desencadenar daño y/o muerte neuronal, posiblemente inducido por un aumento en la producción de ROS y por un aumento sostenido de Ca^{+2} intracelular (Fig.74). Este aumento en la concentración de Ca^{+2} activa la

liberación de neurotransmisores, aunque si se mantienen los niveles de Ca^{+2} aumentados por más tiempo también se activan proteasas, lipasas y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} puede dañar al citoesqueleto y a las proteínas de membrana. Las lipasas activas catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, y además, la activación de las endonucleasas dependientes de Ca^{+2} , pueden provocar la fragmentación del DNA, evento clave en el proceso de la apoptosis (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003) (Fig.71).

El aumento intracelular de Ca^{+2} también estimula la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO), así como la activación de la NOS dependiente de calmodulina. La entrada masiva de Ca^{+2} a la mitocondria hace que se forme el poro de transición en la membrana mitocondrial interna (MTP), llevando a un colapso en el potencial electroquímico de protones, lo que provoca una disminución en los niveles de ATP y un aumento en las especies de oxígeno parcialmente reducidas (Fig.74). La disminución en la producción de ATP resulta en una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más Ca^{+2} a través de varios canales iónicos, creando un círculo vicioso que lleva a la pérdida de la función neuronal y muerte de la célula (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003) (Fig.74).

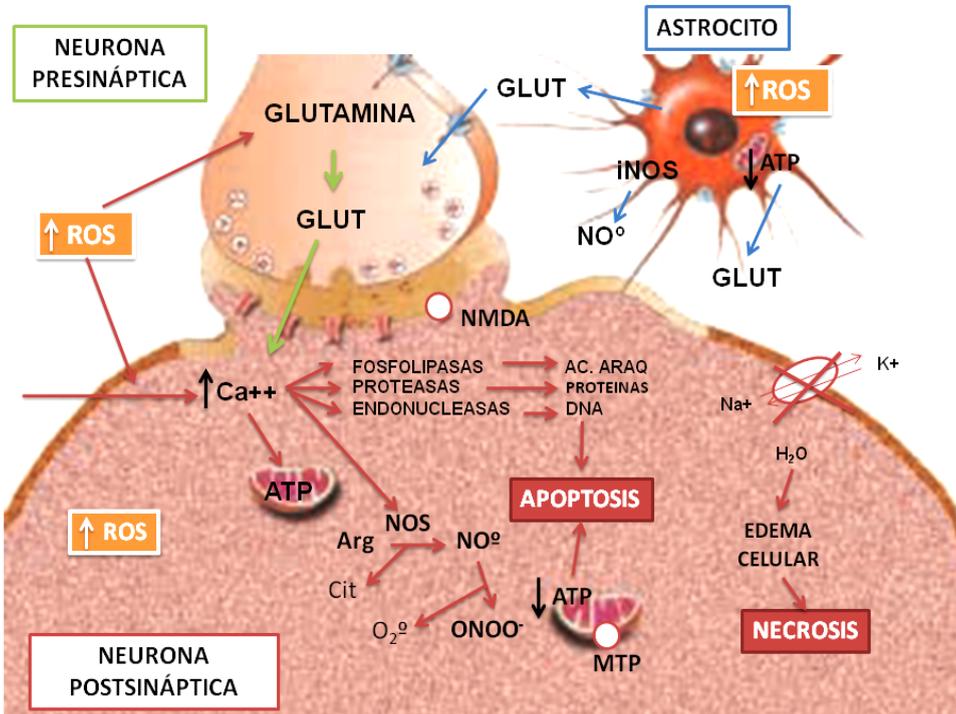


Figura 74. Secuencia de eventos que ocurren durante el daño que lleva a la muerte neuronal. El aumento en los niveles de ROS produce que la neurona presináptica libere el neurotransmisor excitatorio glutamato que es captado por el receptor NMDA en la neurona postsináptica, la entrada de glutamato (Glut) junto con la presencia de especies reactivas llevan a un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} que activa a fosfolipasas, proteasas, y endonucleasas, así como a la óxido nítrico sintetasa (NOS). El aumento de los niveles de calcio y óxido nítrico en la mitocondria hace que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial (MTP), el déficit de ATP no permite el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP que se encuentran en la membrana citoplásmica, este hecho provoca una entrada masiva de agua (H_2O) y sodio (Na^+) y una salida de potasio (K^+) causando edema celular y muerte por necrosis. El daño mitocondrial y el daño al DNA induce la activación de genes que llevan a la muerte por apoptosis. Los astrocitos normalmente captan glutamato y lo regresan a la neurona en forma de glutamina (su precursor), pero cuando hay estrés oxidativo los astrocitos liberan glutamato y óxido nítrico, incrementando y extendiendo el daño a las neuronas vecinas (Modificado de Dorado-Martínez, *et al.*, 2003).

A este respecto, es importante señalar que el daño oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y vasculares entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson, daño isquémico y lesiones traumáticas en las que la microglía juega un papel importante (Markesbery y Carney, 1999). De esto modo, estos eventos de estrés oxidativo pueden actuar como disparadores de la respuesta microglial al daño, evidenciados por un aumento del número de células microgliales (Gehrmann *et al.*, 1995a; Gehrmann *et al.*, 1995b; Gehrmann, 1996; Stoll y Jander, 1999; Banati, 2000; Kato *et al.*, 2003).

POBLACIÓN MICROGLIAL TRAS LA EXPOSICIÓN AL TOLUENO

Cuando sobreviene un estímulo fisiológico o patológico, las células de microglía se activan constituyendo macrófagos cerebrales (Kreutzberg, 1995). Este proceso de activación se caracteriza por una proliferación de este tipo celular, un aumento en la expresión de moléculas propias de los macrófagos (como el número de antígenos del complejo de histocompatibilidad (MHC) (Kreutzberg, 1995), y finalmente, por cambios morfológicos (adoptando una forma redondeada, e incluso puede llegar a transformarse en corpúsculos granuloso que emigran por sus movimientos ameboides y con la carga fagocitada). Las microglías activadas cumplen un papel clave en los procesos inmunológicos del SNC; actúan como células fagocíticas, pueden presentar antígenos a linfocitos-T (Kreutzberg, 1995;

Becher *et al.*, 2000) y tienen capacidades citotóxicas que se llevan a cabo por varios mecanismos. La activación de las células de microglia en el SNC puede ser estimulada experimentalmente, *in vivo*, en respuesta a lesiones isquémicas (Beschoner *et al.*, 2007), inflamatorias (McNally *et al.*, 2008), químicas (Carnevale *et al.*, 2007) y mecánicas (Li *et al.*, 2009). De una manera general, se puede resumir que las células microgliales se activan en respuesta al daño celular y están involucradas en procesos autoinmunes del sistema nervioso mediados por células T (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003).

Durante el periodo de intoxicación del tolueno se produjo reactividad microglial, manifestada por un aumento en el número de estas células, y su modificación de un estadio ramificado a un estadio ameboide en los animales expuestos al solvente. La proliferación de células de microglía, como respuesta a daño o por cambios en el microambiente, ha sido ampliamente estudiada en campos muy diversos, como en estudios tras lesión (Gehrmann y Banati, 1995), e incluso se han publicado trabajos con drogas en los que se produce esta misma respuesta celular tras una exposición intermitente con alcohol (Kloss *et al.*, 1997; Streit *et al.*, 1999; Riikonen *et al.*, 2002), incluso existe una publicación anterior en la que se relaciona un aumento de la población microglial con la exposición al tolueno (Gómez-Pinedo *et al.*, 2007), hecho que confirma los resultados encontrados en la presente tesis bajo protocolos más largos de exposición.

La microglía activada libera una serie de productos citotóxicos que pueden acentuar el daño y muerte neuronal (Fig. 75) (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003).

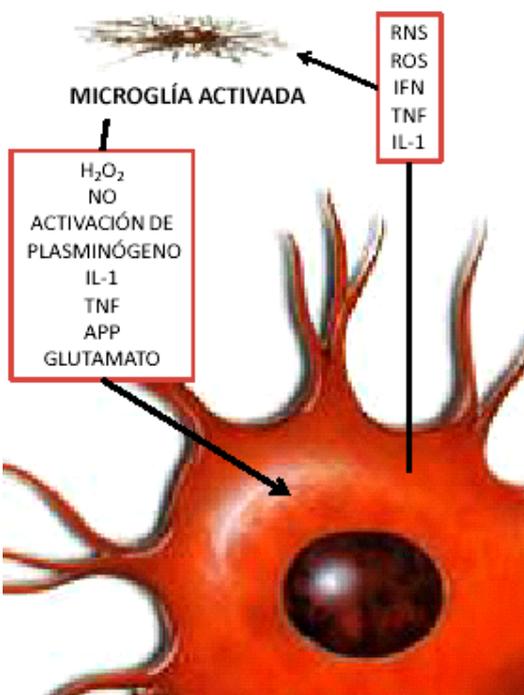


Figura 75. Relación entre la microglía activada y la neurona en una situación de estrés oxidativo.

El daño oxidativo y los mediadores inflamatorios provocan que se active la microglía, su activación produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO^o), catepsina B/L, activación de plasminógeno, interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), proteína precursora de amiloides (APP) y glutamato, lo que provoca daño en la neurona y a su vez mayor activación de la microglía, la presencia de daño neuronal incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), interleucina 1, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), produciendo una mayor activación de la microglía. (Modificado de Dorado-Martínez, *et al.*, 2003).

El •NO producido por la glía activada o por los astrocitos en respuesta a ROS, actúa como mediador en la neurodegeneración y activa procesos inflamatorios. El aumento excesivo de NO y ROS inhibe la respiración mitocondrial en las neuronas que están alrededor, provocando la liberación

de glutamato (a través del transportador de glutamato GluT) proveniente de las neuronas (y en menor medida de los astrocitos) estimulando a los receptores NMDA. La activación de estos receptores dispara la entrada masiva de Ca^{+2} a las neuronas, llevando a las células a la muerte necrótica o apoptótica. Esta sería la razón por la cual se explicaría que el aumento de la poblacional microglial vaya unido a una situación de daño o muerte celular.

GFAP: GLIOSIS

Los astrocitos mantienen elevadas las concentraciones de los antioxidantes en su entorno, protegiendo así a los oligodendrocitos y las neuronas de las alteraciones que les causaría el estrés oxidativo (Dorado-Martínez *et al.*, 2003). Tras la proliferación de los astrocitos, conocida como astrogliosis reactiva, el papel protector de los astrocitos se ve acentuado, produciéndose un aumento del número de actividades que realizan: como la exposición del antioxidante al enzima, el transporte y el metabolismo de la glucosa, que produce una reducción equivalente para la regeneración del antioxidante y para conseguir recuperar el metabolismo neuronal normal del lactato, además participa en la liberación del glutamato (Perea y Araque, 2003) , y en el reciclaje de la vitamina C (Wilson, 1997).

En el último proceso mencionado que cuenta con la participación de los astrocitos, es la absorción de la vitamina C oxidada y su reducción a

ascorbato, que luego libera al fluido extracelular, donde contribuirá a la defensa antioxidante de las neuronas (Wilson, 1997).

Además de este aumento de la microglía como respuesta a la muerte producida por el tolueno, también se produjo una gliosis, observándose un aumento en el número de células GFAP+, junto con una mayor expresión de GFAP en los filamentos intermedios de los astrocitos marcados a lo largo del DG. Del mismo modo, trabajos previos mostraron que, tras la exposición de tolueno (2000 ppm, durante 1 mes, 4 h/día) se producía un aumento en la intensidad y el área determinada por los filamentos marcados con GFAP, aunque no en el número de células GFAP+ presentes en la capa granular del DG. Además, los autores propusieron en este caso, que la hipertrofia de los astrocitos podría deberse a una respuesta neuroprotectora contra el solvente.

Las células cuentan con diversos sistemas de defensa frente la acción del estrés oxidativo, como son: la inducción de la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante, como son las enzimas antioxidantes (la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión peroxidasa) o de moléculas que aumentan el transporte de cistina, que a su vez, aumenta en los niveles intracelulares de glutatión. También el aumento en la proteólisis provee aminoácidos libres que contribuyen al mantener un equilibrio entre las especies derivadas del estrés oxidativo y las que intentan revertirlo (Dorado-Martínez *et al.*, 2003) (Fig. 74).

HOMEOSTASIS REDOX

Analizando los valores obtenidos en el LC/MS/MS podemos ver que el marcador de estrés oxidativo, el 8-OHdGua, se mantiene disminuido en los animales tratados respecto a los controles, en el experimento de administración de tolueno durante 24 días. En cambio, los niveles de este marcador disminuyen en los animales tratados con el solvente en el experimento con exposición de tolueno durante el desarrollo del animal, posiblemente debido a una tendencia a recobrar la homeostasis en los niveles de estrés oxidativo. Este mismo efecto se ha observado para el caso del gen Bcl-2/Bax, que puede actuar tanto como regulador de la supervivencia celular como de la muerte por apoptosis, y que por tanto, tendrá un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, permitiendo el balance entre la proliferación y la muerte celular (Korsmeyer *et al.*, 1993).

La concentración de ROS está determinada por el balance entre la velocidad de producción de especies reactivas y la velocidad de eliminación por otros compuestos y enzimas antioxidantes. Las células cuentan con diversos mecanismos para reestablecer el estado redox después de una exposición temporal a concentraciones elevadas de radicales libres (RL). El aumento en los niveles de estas especies reactivas, induce la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante, como son las enzimas antioxidantes o moléculas que aumentan el transporte de cistina, aumentando así los niveles intracelulares de glutatión. También el aumento

en la proteólisis provee aminoácidos libres que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis redox (Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

El éxito en la regulación redox depende de la magnitud y duración del cambio en las concentraciones, la producción constante de grandes cantidades de especies reactivas, puede conducir a cambios persistentes en la transducción de señales y en la expresión genética dando lugar a condiciones patológicas.

Bajo ciertas condiciones, cuando la producción de radicales de O_2 aumenta excesivamente y de manera prolongada, observándose además una respuesta antioxidante insuficiente, el sistema puede alcanzar el equilibrio en un punto diferente (homeoresis en lugar de homeostasis), que se acompaña de concentraciones altas de aminoácidos libres, así como diferencias en los patrones de expresión genética, permitiendo la supervivencia pero causando un daño irreversible a largo plazo (Dorado-Martínez *et al.*, 2003) (Fig. 76).

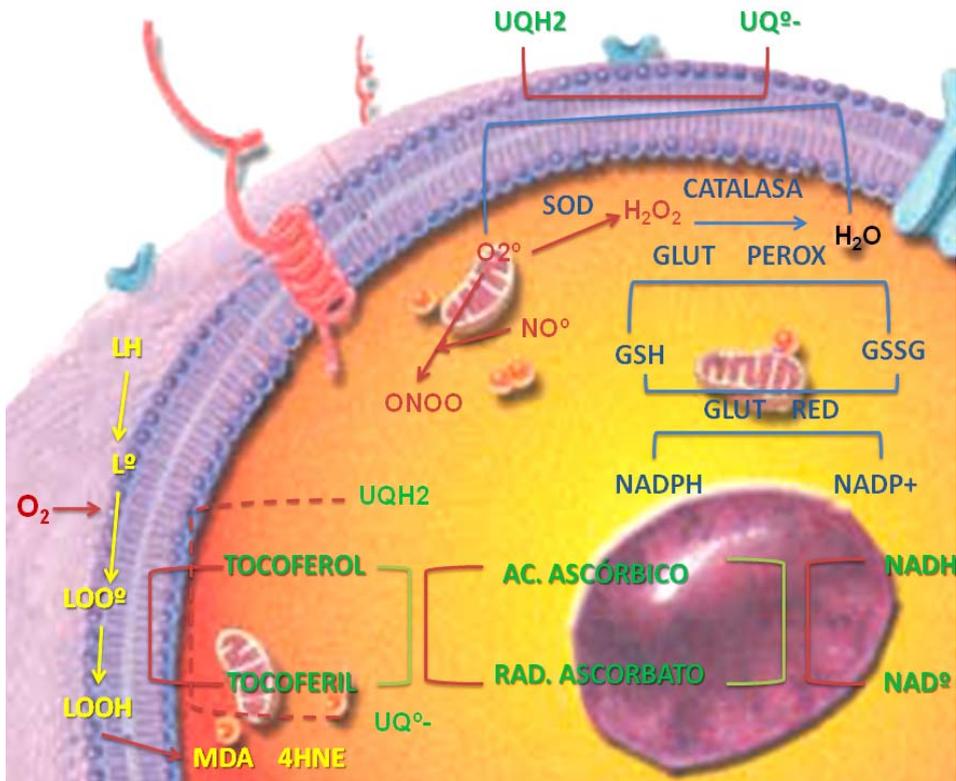


Figura 76. Interrelación existente entre las principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno con los sistemas de defensa antioxidante. El esquema muestra en rojo las ROS: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En anaranjado las RNS: óxido nítrico (NO^{\bullet}), y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). En amarillo productos metabólicos de las anteriores como lípidos oxidados (LH , L^{\bullet} y LOO^{\bullet}), así como los productos finales de su oxidación como: malondialdehído, (MDA) y 4-hidroxinonanal ($4HNE$). En azul se muestran los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatio peroxidasa y los sistemas antioxidantes no enzimáticos; en verde ubiquitina (UQH_2), tocoferol, ácido ascórbico y dinucleótido de nicotin adenina ($NADP$) (Modificado de Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

TOLUENO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Como se ha comentado anteriormente, en la presente tesis doctoral se han establecido diferentes protocolos de inyección del marcador exógeno BrdU, con la intención de analizar si existía un efecto de la droga sobre la proliferación celular, o bien sobre la supervivencia de las células tras la administración del solvente. Por ello, no se discutirá el efecto del tolueno sobre el marcador de BrdU, sino que se expondrán las posibles causas de los efectos observados sobre la proliferación y la supervivencia celular tras la intoxicación por el tolueno.

Así pues, no se encontraron efectos sobre la proliferación tras una administración de tolueno durante 24 días, ni en el caso de los animales adultos del experimento en el que se estudió el efecto del tolueno sobre el desarrollo. Por tanto, puede decirse que el tolueno no afecta a la proliferación celular en cerebros de animales adultos. En cambio, en las crías expuestas al BrdU en el día 16 de su gestación, sí que se observaron diferencias significativas entre los animales que recibían el tolueno a través de la leche materna y durante su gestación, y los controles.

Estas diferencias encontradas respecto a los efectos causados por el tolueno sobre la proliferación cerebral entre cerebros adultos y los cerebros de las crías, puede deberse a varios motivos. En primer lugar, a la diferencia en el momento de inyección del marcador entre las madres (siendo éstas

adultas y realizándose durante su intoxicación con tolueno) y a las crías (con la inyección intra-uterina). En segundo lugar, las variaciones pudieron deberse a las diferencias en las condiciones de exposición al solvente. Y en tercer lugar, podrían deberse a la enorme plasticidad cerebral que posee el cerebro durante las etapas de desarrollo, de este modo, como respuesta a la muerte celular producida por la administración del tolueno durante la gestación y la etapa postnatal temprana del animal, se producirá un incremento de la génesis celular, es decir, se produjo un aumento de la proliferación celular como respuesta a la muerte producida por el estrés oxidativo inducido por el tolueno.

Los mismos efectos encontrados tras la exposición al tolueno durante el desarrollo han sido observados en estudios basados en la dependencia de alcohol. En estos experimentos se demostró que, en diferentes periodos de abstinencia tras la administración de etanol durante 4 días (9g/Kg/día) se producía un aumento en la proliferación celular en múltiples regiones cerebrales, entre ellas en la capa SGZ del giro dentado, también se observó que la mayoría de las células que proliferan eran células de microglía (Nixon *et al.*, 2008). Además de un aumento del marcador DCX (Nixon *et al.*, 2004; Nixon *et al.*, 2008).

Estos modelos de intoxicación con alcohol demostraron que durante la etapa de abstinencia, el glutamato actuaba sobre los receptores sinápticos de NMDA cambiando el equilibrio de señalización hacia la supervivencia y el crecimiento celular. De este modo, se observó un aumento del factor de

transcripción pCREB, y esto representó un mecanismo de retorno de la plasticidad y el aumento de la génesis celular asociada a la abstinencia (Nixon *et al.*, 2008). Posiblemente, este mismo mecanismo bioquímico pueda ser el que produzca la observación de los mismos síntomas tras la intoxicación por el tolueno durante la etapa del desarrollo cerebral.

Para el caso de la supervivencia celular tras la exposición al tolueno, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las células marcadas con BrdU, observándose un aumento de estas células en los animales tratados con tolueno. Aunque se desconocen los mecanismos reales que participen en esta supervivencia celular, posiblemente pueda establecerse una relación entre la astrogliosis observada y este aumento de la supervivencia, ya que autores como Gotohda (Gotohda *et al.*, 2000) apuntan a que este aumento en la activación de células astrocitarias del hipocampo y del cerebelo, junto con un aumento en el marcaje de las células inmunoreactivas para la glutamina sintetasa, podrían contribuir a la supervivencia de las neuronas.

TOLUENO SOBRE LA MADURACIÓN

En cuanto a los efectos del tolueno sobre el marcador DCX, se encontraron diferentes efectos según el procedimiento experimental empleado. De modo que, considerando una exposición de 24 días de tolueno se observó un aumento de las medias de la longitud y el número de

dendritas de las células DCX+, obtenidas para los animales que inhalaban el tolueno. Este resultado resulta coherente con el obtenido por Nixon y su equipo para el alcohol, en el que tras 14 días de abstinencia se producía un aumento en la expresión del marcador de neuronas inmaduras DCX, y un descenso en el número de células BrdU+ (Nixon *et al.*, 2008).

En cambio, solo se observó un cierto incremento en la expresión de DCX sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, en el grupo de madres expuestas al tolueno durante 72 días. En ninguno de los parámetros medidos para el número de dendritas, aunque sí lo fueron para la medida de la longitud del árbol dendrítico. Las medidas para las crías que inhalaban tolueno tanto durante su gestación y su etapa postnatal temprana fueron semejantes, encontrándose diferencias significativas para la longitud del árbol dendrítico pero no se encontraron diferencias para el número de dendritas.

Una posible explicación para las alteraciones observadas en las dendritas de las neuronas granulares es que se produzca un aumento de la expresión de factores neurotróficos (Estrada *et al.*, 2009), como consecuencia de las alteraciones bioquímicas de la administración de la droga, causando un aumento de la longitud dendrítica como respuesta a este aumento de factores, cuya relevancia en el crecimiento dendrítico en la SGZ fue demostrada por Muller y su equipo (Muller *et al.*, 2008).

ACTIVIDAD EN CAMPO ABIERTO

Se encontraron efectos en la actividad locomotora de las madres empleando el sumatorio de los valores obtenidos durante tres días en el campo abierto, además, también se encontraron considerando únicamente los valores del primer día en el que realizaron la prueba de campo abierto. Para el caso de las crías, no se encontraron efectos sobre la actividad locomotora considerando únicamente el primer día, pero sí en el sumatorio de los días de actividad locomotora.

La mayoría de los artículos relacionados al respecto, apuntan a que la administración de tolueno produce un aumento en los niveles de la actividad locomotora. Como se muestra en los trabajos de Von Euler (Von Euler *et al.*, 1993), y Kyvik y Moen (Kyvik y Moen, 1990), quienes demostraron que 30 días después de un periodo de exposición subcrónica con tolueno, aumentó de manera significativa la actividad locomotora de los animales expuestos al tolueno respecto al control, así mismo, se observó que la motilidad espontánea no resulta afectada por el tolueno.

Además se ha vinculado la hiper-actividad dependiente de dosis del tolueno, con la sobre-estimulación de neuronas dopaminérgicas del *núcleo accumbens* (Riegel y French, 2002, Riegel *et al.*, 2003), concretamente estaría medida por un aumento en la expresión de receptores D2 del estriado (Mutti *et al.*, 1988; Martín y Slapper, 2001; Marubio *et al.*, 2003).

El mecanismo que participa en el aumento de la actividad del sistema dopaminérgico es todavía desconocido, y se apunta a la participación de sistemas GABA y glutamatérgicos. Como fue sugerido por Lee (Lee *et al.*, 2004) se demostró que la preferencia de lugar causada por el tolueno podía bloquearse con “Vigabatrin”, un inhibidor de la transaminasa GABA. Además, la inducción de la actividad locomotora por tolueno puede bloquearse con “LY379268”, un agonista de mGluR2/3. Otros autores apuntan a la participación de las interneuronas colinérgicas existentes en el estriado como responsables (junto con la dopamina) de los resultados locomotores y de las estereotipias causadas por el tolueno. De este modo, Stengard (Stengard, 1994), administró 2000 ppm de tolueno durante 2 horas y observó una disminución en el nivel de acetilcolina del estriado, obteniendo una reducción del 20% si los datos de microdiálisis se tomaban durante la exposición, y una reducción mayor (del 60%) si la medida se realiza después de la exposición, como en el caso de la presente tesis, donde las pruebas de conducta se realizaron después de completar la intoxicación.

APRENDIZAJE Y MEMORIA

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en los animales expuestos al tolueno durante su desarrollo en las tareas de reconocimiento de lugar y de objetos. Concretamente, las crías pasaban más tiempo explorando el objeto nuevo o cambiado de posición que los animales

control. Estos resultados fueron similares a los encontrados en un estudio de Bowen (Bowen y Balster, 2006), en el que se expuso a ratones a concentraciones de más de 6000 ppm de tolueno, durante 30 min, para medir su rendimiento en el laberinto elevado que contenía puertas cerradas y otras abiertas para la entrada de los animales. Bajo condiciones normales, los ratones aprenden a evitar las peligrosas puertas abiertas del laberinto y bajo la exposición a tolueno, los animales entraban más veces en las puertas abiertas y permanecían en ellas durante más tiempo que los controles. En cambio, si se contabilizaba el número de entradas totales, las diferencias no eran significativas, puesto que se minimizaba el efecto.

En cambio, en los análisis con las madres, no se mostraron diferencias significativas en ningún caso, ni en el recuento de los eventos discretos, ni en el tiempo de exploración que el animal dedicó para explorar el objeto novel. De igual modo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los eventos discretos considerados para la exploración del cambio de lugar del objeto, ni en el tiempo dedicado a la exploración.

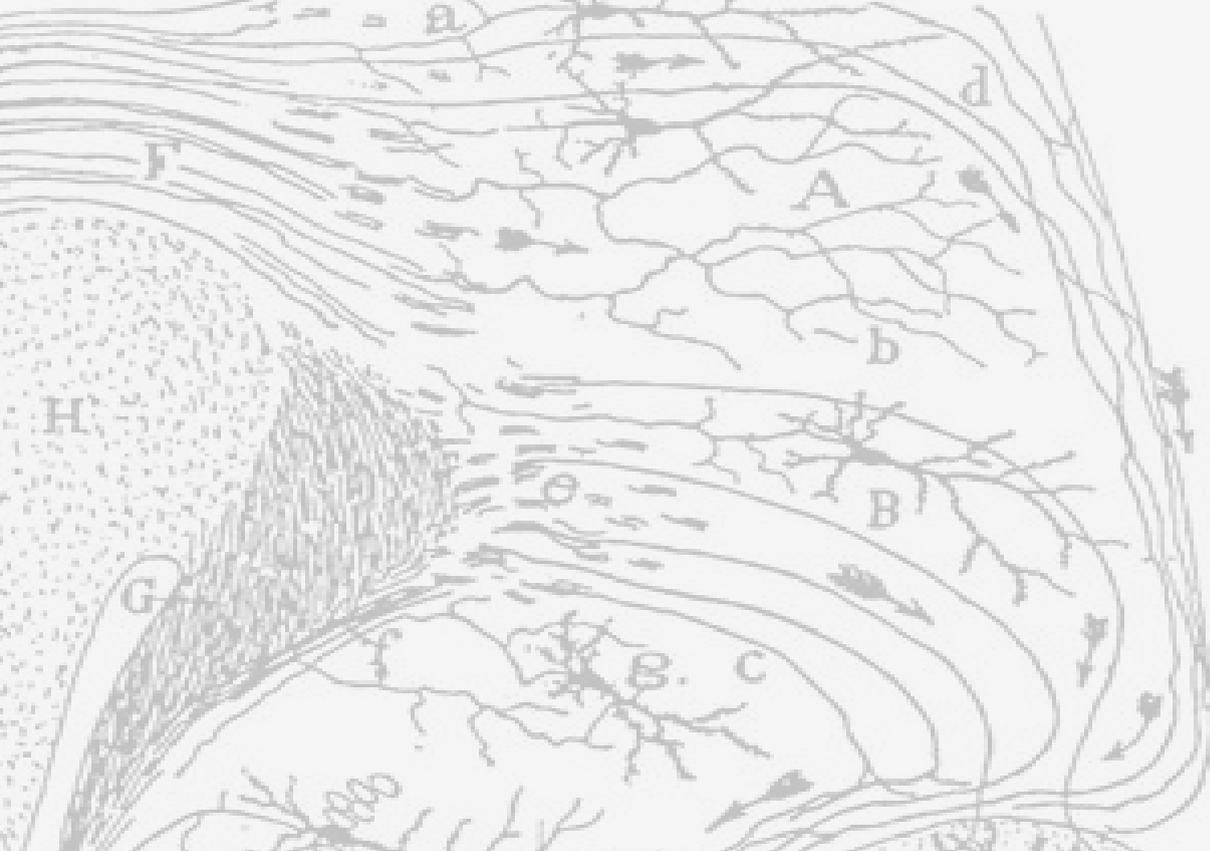
Los tests neuropsicológicos y los testimonios de los que abusan del tolueno de manera crónica, indican que el solvente produce déficits en la memoria y el aprendizaje (Filley *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2002, Rosenberg, 2002). Se encontraron evidencias que mostraban que en trabajadores en imprentas o en pintores existían menores rendimientos cognitivos que en los sujetos control (Bockelmann *et al.*, 2004, Chounaniere *et al.*, 2002, Kaukiainen *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2003, Saddik *et al.*, 2005, Wood y

Lioffi, 2005). A raíz de estos resultados, fueron muchos los artículos destinados a averiguar el efecto de estos solventes sobre la memoria y el aprendizaje. De este modo, se demostró que tanto en ratas expuestas a 80 ppm de tolueno (6h/día, 5días/semana durante 4 semanas), como en ratas intoxicadas con “thinner” (60-70% tolueno), durante 45 días, 1 hora diaria, se producía un daño significativo en la adquisición y retención de memoria en el laberinto de Morris (Von Euler *et al.*, 2000; Baydas *et al.*, 2005).

En conclusión, el tolueno afecta al rango de percepción y cognición de los animales, hecho que interfiere en su rendimiento en la respuesta a tareas como el laberinto o en tareas similares, de manera análoga a como ocurriría tras una intoxicación con benzodiazepinas, barbitúricos y el alcohol, tal como puede observarse en los efectos estudiados con el tolueno (Beningus, 1981, Evans y Balster, 1991).

En resumen, el tolueno es una droga de abuso de la que aún queda mucho por entender, pese a que es una de las drogas cuyo uso está más extendido. Su potencial de abuso continúa afectando la salud de multitud de jóvenes en todo el mundo. Los efectos de la intoxicación de tolueno muestran una conducta bifásica que lleva a complicaciones neuropsiquiátricas, que a menudo resultan análogas a las observadas durante la intoxicación con calmantes o alcohol. La neuropatología de los efectos del tolueno es muy diversa, y muchas investigaciones han podido relacionarla con múltiples sistemas de neurotransmisores capaces de modular la respuesta obtenida tras la intoxicación. Será necesario seguir investigando para conocer con mayor

detalle los efectos del tolueno sobre el SNC, dando relevancia a las investigaciones de los efectos de esta droga durante la gestación, puesto que produce alteraciones más graves a las que se obtienen en la exposición durante otras etapas.



CONCLUSIONES



CAPÍTULO – 6: CONCLUSIONES

6.1. COCAÍNA

- La administración de cocaína disminuye la proliferación celular del giro dentado del hipocampo tras 8 o 24 días de tratamiento con cocaína, tal y como puede observarse a partir de los resultados inmunohistoquímicos con BrdU y Ki67.
- En cambio, un tratamiento con cocaína durante 24 días no afecta la supervivencia de las nuevas células, basándose en células BrdU+, ni a su posterior maduración evaluada a partir de la expresión de DCX.
- Una administración crónica de cocaína no altera el patrón de inervación sináptica de los botones sinápticos situados en las fibras musgosas en CA3. Así pues, no se observaron diferencias significativas en las áreas de la terminal sináptica, ni la de las espinas dendríticas, ni el área ocupada por vesículas ni por mitocondrias. Al igual que tampoco se observaron efectos en el número de zonas activas ni en el de mitocondrias.

En resumen, la cocaína tiene efectos negativos sobre la neurogénesis adulta en el hipocampo, al alterar los niveles basales de proliferación celular.

6.2. TOLUENO

6.2.1 EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE 24 DÍAS

- La intoxicación con el solvente administrado de manera crónica no afecta a la capacidad proliferativa de las células BrdU+ presentes en el DG, aunque aumenta la supervivencia celular evaluada por un marcaje con BrdU.

- La expresión del árbol dendrítico marcado con DCX en el DG se ve afectada tras la inhalación de elevadas concentraciones con tolueno durante 24 días.

- La administración de tolueno durante 24 días produce la muerte celular inducida por estrés oxidativo (comprobada por la presencia de 8-OHdGua), y provoca una activación de la microglía, observada mediante la activación de células en la inmunohistoquímica de OX-42.

- Un análisis de la ultraestructura del DG de los animales expuestos al tolueno durante 24 días, muestra la desorganización de la capa granular, la modificación de la morfología de las células granulares, y el aumento del número de las células microglía activas. Aunque sin encontrar diferencias en los nichos neurogénicos.

6.2.2 EXPOSICIÓN AL TOLUENO DURANTE EL DESARROLLO

- La exposición a tolueno provocó una mayor tasa de mortalidad entre las crías. Aunque no hubo diferencias en el sexo de las crías, ni tampoco en otras características medidas como el peso corporal, ni la longitud corporal.

- La inhalación de tolueno durante 72 días no afecta a la capacidad proliferativa de las células marcadas con BrdU+ presentes en el DG. Aunque sí se observó un aumento significativo en las crías tratadas, puesto que el solvente se les administró durante su gestación y su etapa prenatal temprana.

- No se encontró efecto en los estudios de supervivencia de las células en las madres expuestas al tolueno, analizado con el doble marcaje de BrdU/NeuN en las capas de la corteza prefrontal. En cambio, con este mismo análisis, las crías expuestas durante su desarrollo al tolueno, si que mostraron una reducción, significativa estadísticamente, en la supervivencia celular.

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de madres expuestas al tolueno durante 72 días, en ninguno de los parámetros medidos para el número de dendritas marcadas con DCX, aunque sí lo fueron para la medida de la longitud del árbol dendrítico. Del mismo modo, para las medidas de las crías que inhalaban tolueno tanto durante su gestación como durante su etapa postnatal temprana se

encontraron diferencias significativas para la longitud del árbol dendrítico y no para el número de dendritas DCX+.

- La presencia del metabolito 8-OHdGua demuestra la presencia de estrés oxidativo causado por la exposición al tolueno, que produce un aumento de muerte celular en los animales tratados con el solvente.

- La muerte celular encontrada en los animales expuestos al tolueno induce tanto un aumento en la activación de las células de microglía, como de células marcadas por GFAP.

- Los estudios de conducta mostraron que se produce una hiperactivación en la actividad locomotora de las madres y las crías nacidas tras la exposición al tolueno.

- Los resultados obtenidos en las pruebas de reconocimiento de lugar y de objetos mostraron resultados diferentes para las madres y las crías. Las ratas madres, expuestas al tolueno durante su etapa adulta, no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede concluir que no vieron afectadas sus capacidades cognitivas ni de percepción. En cambio, en las crías expuestas al solvente durante su desarrollo, si que se vieron afectadas ambas capacidades.

- Un análisis de la ultraestructura del DG de los animales expuestos al tolueno durante 24 días, muestra la desorganización de la capa granular, la modificación de la morfología de las células granulares, y el aumento del

número de las células microglía activas. Aunque sin encontrar diferencias en los nichos neurogénicos.

El tolueno induce estrés oxidativo, que produce un aumento en la tasa de muerte celular, que deriva en un aumento en la neurogénesis adulta en el hipocampo.

El tolueno administrado durante el desarrollo produce la muerte celular, causando un aumento de la gliosis y afectando a las funciones cognitivas del hipocampo, como la percepción y la cognición.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., Eriksson, P.S. (2000). Peripheral infusion of IGF-1 selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 20:2896-2903.
- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.M., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., Rosenberg, L.E., Olsson, T. Gage, F.H., Eriksson P.S. (2003). IGF-1 has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 24:23-40.
- Abrous, D.N., Koehl, M., Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.*, 85: 523–569.
- Abrous, D.N., Adriani, W., Montaron, M.F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., Piazza, P.V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.*, 22(9):3656-3662.
- Aguado, T., Palazuelos, J., Monory, K., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., Galve-Roperh, I. (2006). The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J. Neurosci.*, 26(5):1551-1561.
- Almirall, P., Franco, G., Martínez, S., Noriega, M., Villegas, J., Méndez, I. (1999). Evaluación psicológica en trabajadores expuestos a tolueno en una empresa mexicana de autopartes, *Salud de los trabajadores.* 7: 5-11.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-1128.

- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 137(4): 433-457.
- Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.*, 124:319-336.
- Altman, J., Bayer, S.A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *The journal of comparative. neurology*, 301:343-364.
- Amaral, D.G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neur.*, 182:851-914.
- Amaral, D.G., Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S. (2004) Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 359: 13–16.
- Arnold, G.L., Kirby, R.S., Langerdoerfer, S., Wilkils, H.L. (1994). Toluene embriopathy: clinical delineation and developmental follow-up, *Pediatrics*, 93:216-220.

- Auladell, C., Martinez, A., Alcantara, S., Supi, H., Soriano, E. (1995). Migrating neurons in the developing cerebral cortex of the mouse send callosal axons. *Neuroscience*, 64 (4): 1091-1103.
- Álvarez-Buylla, A., Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335: 353-354.
- Álvarez-Buylla, A., Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41:683–686.
- Bai, F., Bergeron, M., Nelson, D.L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44:1013-1021.
- Balu, D.T., Easton, R.M., Birnbaum, M.J., Lucki, I. (2008). Deletion of Akt isoforms reduce hippocampal neurogenesis, fear conditioning and antidepressant behavioural responses. Vol.157.11. Society for Neuroscience, Washington, D.C.
- Baraban, S.C., Wenzel, H. J., Castro, P.A., Schwartzkroin, P.A. (1999). Hippocampal dysplasia in rats exposed to cocaine in utero. *Developmental Brain Research*, 117:213–217.
- Banasr, M., Hery, M., Brezun, J.M., Daszuta, A. (2001). Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 14(9):1417-1424.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29:450-460.

- Banati, R.B. (2000). Visualising microglial activation in vivo. *Glia*, 40:206-217.
- Barnea, A. y Nottebohm F. (1994). Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:11217-11221.
- Bashkatova, V., Meunier, J., Vanin, A., Maurice, T. (2006). Nitric oxide and oxidative stress in the brain of rats exposed in utero to cocaine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1074:632-642.
- Baydas, G., Ozveren, F., Akdemir, I., Tuzcu, M., Yasar, A. (2005). Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. *J. Pineal Res.* 39:50-56.
- Bayer, S.A. (1983). ³H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.*, 50: 329–340.
- Becher, B., Prat, A., Antel, J.P. (2000). Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*, 29(4):293-304.
- Benignus, V.A. (1981). Health effects of toluene: a review. *Neurotoxicology*, 2(3):567-588.
- Berhow, M.T., Russell, D.S., Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Self, D.W., Lindsay, R.M., Nestler, E.J. (1995). Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience*, 68:969–979.
- Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 17:491-500.

- Beschorner, R., Sitmon, P., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schaluesener, H.J., Trautmann, K., Dietz, K., Meyermann, R. (2007). Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology*, 50, 897–910.
- Beyer, C.E., Stafford, D., LeSage, M.G., Glowa, J.R., Steketee, J.D. (2001). Repeated exposure to inhaled toluene induces behavioural and neurochemical cross-sensitization to cocaine in rats. *Psychopharmacology*, 154:798-807.
- Biebl, M., Cooper, C.M., Winker, J., Kuhn, H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.*, 21:6718-6731.
- Bizon, J.L., Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur. J. Neurosci.*, 18 (1):215-219.
- Blackstad, T.W., Brink, K., Hem, J., Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 138:433-450.
- Bockelmann, I., Pfister, E.A., Peters, B., Duchstein, S. (2004). Psychological effects of occupational exposure to organic solvent mixtures on printers. *Disabil. Rehabil.*, 26:798-807.
- Bowen, S.E., Balster, R.L. (1998). A direct comparison of inhalant effects on locomotor activity and schedule-controlled behavior in mice. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*, 6:235-247.

- Bowen, S.E., Batis, J.C., Mohammadi, M.H., Hannigan, J.H. (2005). Abuse patterns of gestational toluene abuse and early postnatal development in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 24:105-116.
- Bowen, S.E., Balster, R.L. (2006). Tolerance and sensitization to inhaled 1,1,1-trichloroethane in mice: results from open-field behavior and a functional observational battery. *Psychopharmacology*, 185:405-415.
- Bowen, S.E., Hannigan, J.H. (2006). Developmental toxicity of prenatal exposure to toluene. *The AAPS Journal*, 8 (2):419-424.
- Brezun, J.M., Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, 89:999-1002.
- Bruckner, J.V., Peterson, R.G. (1981). Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse. *Pharmacology and Pharmacodynamics. Toxicol Appl Pharmacol.*, 61:27-38.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.*, 21:513–521.
- Bursztajn, S., Falls, W.A., Berman, S.A., Friedman, M.J. (2007). Cell proliferation in the brains of NMDAR NR1 transgenic mice. *Brain. Res.* 1172:10-20.
- Cacci, E., Ajmone-Cat, M.A., Anelli, T., Biagioni, S., Minghetti, L. (2008). In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia*, 56(4):412-25.

- Cairney, S., Maruff, P., Burns, C, Currie, B. (2002). The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, 26:81-89.
- Calafat, A. (2009). Para muchos adolescents, el no consumir implica tener menos habilidades sociales. *Diario de Noticias de Ávala*.
- Calderón, I. (2009). Proponer el consumo cero de drogas, es una utopía. *Nota de Prensa. Fundación de Ayuda a la Drogadicción*.
- Callender TJ, Morrow L, Subramanian K, Duhon D, Ristovv M. (1993). Three-dimensional brain metabolic imaging in patients with toxic encephalopathy. *Environ. Res.*, 60(2):295-319.
- Calza, L., Giardino, L., Pozza, M., Betteli, C., Micera, A., Aloe, L. (1998). Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:3209-3214.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., Gould, E. (1993). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res.*, 611:342–346.
- Cameron, H.A., Hazel, T.G., McKay, R.D. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.*, 36:287–306.
- 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.

- Carlsson, A., (1982). Exposure to toluene: Uptake, distribution and elimination in man. *Scandinavian J. W. Environ. Health*, 8: 43-55.
- Carnevale, D., DeSimone, R., Minghetti, L. (2007). Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.*, 6(6):388-397.
- Castren, E. (2004). Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*, 29:289–302.
- Caviness, V.S. Jr., Takahashi, T., Nowaskowski, R.S. (2000). Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis. *Results Probl Cell Differ.*, 30:107-143.
- Chen, H.H., Lee, Y.F., Chan, M.H., Lo, P.S. (2004). The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurobehavioral changes induced by toluene exposure during synaptogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1025:552-555.
- Chen, T.W., Lin, B.J., Brunner, E., Schild, D. (2006). In situ background estimation in quantitative fluorescence imaging. *Biophysical Journal*, 90: 2534–2547.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage, Causes G + T and A + C Substitutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (1):166-172.
- Chicurel, M.E., Harris, K.M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their

- synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 325(2):169-182.
- Chien, T.H., Chan, M.H., Tang, Y.C., Chen, H.H. (2005). Toluene exposure during the brain growth spurt reduces behavioural responses to noncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in adult rats. *Psychopharmacology*, 182:468-474.
- Chiriboga, C. (2003). Fetal alcohol and drugs effects. *Neurologist*, 9:267-279.
- Chouaniere, D., Wild, P., Fontanta, J.M., Hery, M., Fournier, M., Baudin, V., Subra, I., Rouselle, D., Toamain, J.P., Saurin, S., Adriot, M.R. (2002). Neurobehavioral disturbances arising from occupational toluene exposure. *Am. J. Ind. Med.*, 41:77-88.
- Collins, M.A., Corso, T.D., Neafsey, E.J. (1996). Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.*, 20(2):284-292.
- Crews, F.T., Braun, C.J., Hoplight, B., Switzer, R.C., Knapp, D.J. (2000). Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 24(11):1712-1723.
- Crews, F.T., Nixon, K. (2003). Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Res. Health*, 27:197-204.

- Crews, F.T., Mdzinarishvili, A., Kim, A., He, J., Nixon, K. (2006). Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience*, 137:437-445.
- Crews, F.T., Nixon, K. (2009). Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol & Alcoholism*, 44(2):115–127.
- Cunha-Oliveira, T., Rego, A.C., Oliveira, C.R. (2008). Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res. Rev.*, 58(1):192-208.
- Daniel, J.M., Fader, A.J., Spencer, A.L., Dohanich, G.P. (1994). Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm. Behav.*, 32:217–225.
- De Kloet, E.R., Oitzl, M.S., Joëls, M. (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.*, 22:422–426.
- Delgaard, M., Hossaini, A., Hougaard, K., Hass, U., Ladefoged, O. (2001). Developmental toxicity of toluene in male rats: effects on semen quality, testis morphology, and apoptotic neurodegeneration, *Arch. toxicol.*; 75:103-109.
- Díaz, P.H., Linares, F.M., Perdomo, N.M., Rabelo, P.G., González, A.P. (1999). Evaluación de la exposición ocupacional a solventes en trabajadores de una fábrica de calzado, *Hig. Epidemiol.*, 37:114-121.
- Döbrössy, M.D.E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: Learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol. Psychiatry*, 8: 974–982.

- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J. Neurosci.*, 17(13):5046–5061.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., García-Verdugo, J.M. (2002). EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron*, 36:1021–1034.
- Domínguez-Escribà, L., Hernández-Rabaza, V., Soriano-Navarro, M., Barcia, J.A., Romero, F. J., García-Verdugo, J. M., Canales, J.J. (2006). Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 24:586–594.
- Dorado-Martínez, C., Rugerio-Vargas, C., Rivas-Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med. UNAM.*, 46(6):229-235.
- Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:14385–14390.
- Duman, R.S., Malberg, J., Nakagawa, S. (2001). Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299:401–407.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, 59:1116-1127.

- Dupret, D., Montaron, M.F., Drapeau, E., Auroseau, C., LeMoal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. (2005). Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 22:778–783.
- Eisch, A.J. (2002). Adult neurogenesis: implications for psychiatry. *Prog. Brain. Res.*, 138:315–342.
- Eisch, A.J., Harburg, G.C. (2006). Opiates, Psychostimulants, and Adult Hippocampal Neurogenesis: Insights for Addiction and Stem Cell Biology. *Hippocampus*, 16:271–286.
- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:8233-8238.
- Encinas, J.M., Enikolopov, G. (2008). Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods. Cell. Biol.*, 85:243-272.
- Endl, E., Hollmann, C., Gerdes, J. (2001). Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods in Cell Biol.*, 399-418.
- Engel, T., Hernández, F., Avila, J., Lucas, J.J. (2006). Full Reversal of Alzheimer’s Disease-Like Phenotype in a Mouse Model with Conditional Overexpression of Glycogen Synthase Kinase-3. *The Journal of Neuroscience*. 26(19):5083–5090.

- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjoumlrk-Ericsson, T., Alborn, A.M., Nordb, C. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.*, 4:1313-1317.
- Estrada, F.S., Hernández, V.S., Medina, M.P., Corona-Morales, A.A., Gonzalez-Perez, O., Vega-Gonzalez, A., Zhang, L. (2009). Astrogliosis is temporally correlated with enhanced neurogenesis in adult rat hippocampus following a glucoprivic insult. *Neuroscience Letters*, 459:109–114.
- Evans, E.B., Balster, R.L. (1991). CNS depressant effects of volatile organic solvents. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 15:233-241.
- Faust, R.A., (1994). Toxicity summary for toluene. Chemical Hazard Evaluation Group Biomedical and Environmental Information Analysis Section Health Sciences Research Division Oak Ridge National Laboratory Oak Ridge, Tennessee. 1-15.
- Fiala, M., Gan, X.H., Zhang, L., House, S.D., Newton, T., Graves, M.C., Shapshak, P., Stins, M., Kim, K.S., Witte, M., Chang, S.L. (1998). Cocaine enhances monocyte migration across the blood–brain barrier. Cocaine’s connection to AIDS dementia and vasculitis?. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 437:199–205.
- Filley, C.M., Halliday, W., Kleinschmidt-DeMasters, B.K. (2004). The effects of toluene on the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63:1-12.
- Freund, T.F., Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6:347-470.

- Friocurt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex*, 13:620-626.
- Fuentes-Lara, M.T.G., Hernández-González, A. (2005). Abuso de sustancias inhalables. Un problema de salud pública y social.
- Gaarskjaer, F.B. (1978). Organization of mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.*, 178:73-88.
- Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Kempermann, G. (2004). Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*, 3:363-371.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439:589-593.
- Gehrmann, J. (1996). Microglia: a sensor to threats in the nervous system?. *Viol.*, 147:79-88.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.*, 20:269-287.
- Gehrmann, J., Banati, R.B. (1995). Microglial turnover in the injured CNS: activated microglia undergoes delayed DNA fragmentation following peripheral specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend*, 65:243-251.

- Gerasimov, M.R., Schiffer, W.K., Marsteller, D., Ferrieri, R., Alexoff, D., Dewey, S.L. (2002). Toluene inhalation produces regionally specific changes in extracellular dopamine. *Drug Alcohol Depend*, 65:243-251.
- Gerr, F., Letz, R. (1992). Solvents. *Env. and Occ. Med.* 843-859.
- Goeders, N.E. (2002). Stress and cocaine addiction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301:785–789.
- González-Pérez, O., González-Castañeda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gómez-Pinedo, U., Sánchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., García-Estrada, J. (2002). Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.*, 321(1-2):100-104.
- Gómez-Pinedo, U.A. (2007). Efectos neurotóxicos del tolueno. *Investigación en neurociencias*. Ed. Bios-Médica. Editores: Ruth de Celis Carrillo.
- Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*. Ninth edition. (1996). Editors: Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. Mc Graw Hill. Chapters: 9, 17, 23, and 24.
- Gospe, S.M., Zhou, S.S., Saeed, D.B., Zeman, F.J. (1996). Development of a Rat Model of Toluene-Abuse Embryopathy. *Pediatric Res.*, 40:82-87.
- Gospe, S.M., Zhou, S.S. (2000). Prenatal exposure to toluene results in abnormal neurogenesis and migration in rat somatosensory cortex. *Pediatric Res.*, 47:362-368.

- Gotohda, T., Tokunaga, I., Kubo, S., Morita, K., Kitamura, O., Eguchi, A. (2000). Effect of toluene inhalation on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain. *Forensic Sci. Int.*, 113:233-238.
- Gould, E., Woolley, C.S., McEwen, B.S. (1991). Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp. Neurol.*, 313(3):479-485.
- Gould, E., Tanapat, P. (1997). Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*, 80:427-436.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A.M., Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 17(7):2492–2498.
- Gould, E. Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, C., Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursor in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.*, 95:3168-3171.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.*, 2: 260–265.
- Hass, U., Lund, S.P., Hougaard, K.S., Simonsen, L. (1999). Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 21:241-250.
- Hastings, N.B., Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 413:146-154.

- Hastings, N.B., Tanapat, P., Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult mammalian brain. *Clinical Neuroscience Research*, 1:175-182.
- Hatten, M.E. y Mason, C.A. (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, 46(9):907-916.
- He, J., Nixon, K., Shetty, A.K., Crews, F.T. (2005). Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 21:2711–2720.
- 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*, 1-7.
- Herrera, D.G., Yague, A.G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F.J., Garcia-Verdugo, J.M. (2003). Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100:7919–7924.
- Horger, B.A., Iyasere, C.A., Berhow, M.T., Messer, C.J., Nestler, E.J., Taylor, J.R. (1999). Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, 19:4110–4122.
- Höglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.*, 7(7):726-735.

- Hogstedt, C., Lundberg, I. (1992). Epidemiology of occupational neurobehavioural hazards. Methodological experiences from organic solvent research. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.*, 40 Suppl 1:7-16.
- Hougaard, K.S., Hass, U., Lund, S.P., Simonsen, L. (1999). Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal developmental and behavior in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 21:241-250.
- Iversen, L. (2000). Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol. Psychiatry.*, 5:357–362.
- Ivins, J.K. y Pittman, R.N. (1989). Growth cone-growth cone interactions in cultures of rat sympathetic neurons. *Dev Biol.*, 135(1):147-157.
- Jacobs, B.L., Praag, H., Gage, F.H. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry*, 5:262–269.
- Jay, T.M., Glowinski, J., Thierry, A.M. (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.*, 505(2):337-340.
- Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, Jr.G.D., Li, Y., Gage, F.H. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labelling. *J. Neurosci.*, 27:9400-9407.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Batter, S., Simon, R.P. Greenberg, D.A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after local cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98:4710-4715.

- Johansson, C.B. Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell. Res.*, 253:733-736.
- Jones, H.E., Balster, R.L. (1997). Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicol. Teratol.* 19:305-313.
- Kahn, L., Alonso, G., Normand, E., Manzoni, O.J. (2005). Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, 21:493–500.
- Kaplan, M.S., Bell, D.H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11- month-old rodent hippocampus. *J. Neurosci.*, 4:1429-1441.
- Kasai, H., Kawai, K., Li, Y. (2008). Analysis of 8-OH-dG and 8-OH-Gua as biomarkers of oxidative stress. *Genes and Environment*, 30(2):33-40.
- Kato, H., Takahashi, A., Itoyama, Y. (2003). Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain. Res. Bull.*, 60:215-221.
- Kaukiainen, A., Riala, R., Maartikainen, R., Akila, R., Reijula, K., Sainio, M. (2004). Solvent-related health effects among construction painters with decreasing exposure. *Am. J. Ind. Med.*, 24:627-636.
- 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. Meth.*, 115:97–105.

- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495.
- Kempermann, G., Kronenberg, G. (2003). Depressed new neurons adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol. Psychiatry.*, 54:499–503.
- Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F.H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14:186–191.
- King, P.J., Morris, J.G., Pollard, J.D. (1985). Glue sniffing neuropathy. *Aust. N. Z. J. Med.*, 15(3):293-299.
- Kloss, C.U., Kreutzberg, G.W., Raivich, G. (1997). Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *N. Engl. J. Med.*, 275:1494-1496.
- Knuepfer, M.M., Purcell, R.M., Gan, Q., Le, K.M. (2001). Hemodynamic response patterns to acute behavioral stressors resemble those to cocaine. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281:1778–1786.
- Kochman, L.J., Dos Santos, A.A., Fornal, C.A., Jacobs, B.L. (2006). Despite strong behavioral disruption, Delta (9)-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Brain Res.*, 1113(1):86-93.
- Kolb, B., Gorny, G., Li, Y., Samaha, A.N., Robinson, T.E. (2003). Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:10523–10528.

- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., Oltvai, Z.N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.*, 4(6):327-332.
- Kozorovitskiy, Y., Gould, E. (2003). Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair?. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, 25(5):721-732.
- Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung.*, 45(3A):357-360.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Streiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.*, 467:455-463.
- Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., Gage, F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, 17(15):5820–5829.
- Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Fuchs, E. (2001). Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 251(4):152-158.
- Kumagai, S., Matsunaga, I. (1997). Quantitative determination of urinary metabolites of o-dichlorobenzene using a gas chromatograph. *Ind. Health.*, 35 (3):399-403.
- Kunze, A., Congreso, M.R., Hartmann, C., Wallraff-Beck, A., Hüttmann, K., Bedner, P., Requardt, R., Seifert, G., Redecker, C., Willecke, K., Hofmann, A., Pfeifer, A., Theis, M., Steinhäuser, C. (2009). Connexin

expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(27):11336-11341.

- Kyvyk, K.R., Moen, B. (1990). Nervous system impairment caused by solvents. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, 110:1342-1345.

- Laming, P.R., Kimelberg, H., Robinson, S., Salm, A., Hawrylak, N., Muller, C., Roots, B., Ng, K. (2000). Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24:295-340.

- Lang, B., Liu, H.L., Liu, R., Feng, G.D., Jiao, X.Y., Ju, G. (2004). Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience*, 128(4):775-783.

- Lara, M.A., Medina, M.M., Romero, M., Domínguez, M. (1998). Un estudio cualitativo sobre el consumo de disolventes inhalables en estudiantes, *Psiquiatría Pública.*, 10:399-406.

- Lauwerys, R. (1994). *Toxicología Industrial e intoxicaciones profesionales*, Barcelona España, Editorial Masson. 1ª edición.

- Lee, Y.L., Pai, M.C., Chen, J.H., Guo, Y.L. (2003). Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup. Med.*, 53:479-482.

- Lee, D.E., Schiffer, W.K., Dewey, S.L. (2004). Gamma-vinyl GABA (vigabatrin) blocks the expression of toluene –induced conditioned place preference (CPP). *Synapse*, 54:183-185.

- Lee, Y.F., Lo, P.S., Wang, Y.J., Hu, A., Chen, H.H. (2005). Neonatal toluene exposure alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in

the hippocampus and cerebellum in juvenile rats. *Neuropharmacology*, 48:195-203.

- Lee, C.T., Chen, J., Hayashi, T., Tsai, S., Sanchez, J.F., Erico, S.L., Amable, R., Su, T.P., Lowe, R.H., Huestis, M.A., Shen, J., Becker, K.G., Geller H.M., Freed, W.J. (2008). A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. *PLoS Med* 5(6): e117. doi:10.1371/journal.pmed.0050117.

- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Shors, T.J. (2004). High levels of estrogen enhance associative memory formation in ovariectomized females. *Psychoneuroendocrinology*, 29:883–890.

- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 11032–11037.

- Leshner, A.I. (1997). Addiction is a brain disease, and it matters. *Science*, 278:45-47.

- Li, B., Mahmood, A., Lu, D., Wu, H., Xiong, Y., Qu, C., Chopp, M. (2009). Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases Interleukin-1b level after traumatic brain injury. *Neurosurgery.*, 65(1):179-186.

- Lidow, M.S., Song, Z.M. (2001). Effect of cocaine on cell proliferation in the cerebral wall of monkey fetuses. *Cerebral Cortex*, 11:545-551.

- Lim, D.A., Huang, Y.C., Alvarez-Buylla, A. (2007). The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 18(1):81-92.

- Lin, H.M., Liu, C.Y., Jow, G.M., Tang, C.Y.(2009). Toluene disrupts synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. *Toxicol. Lett.*, 184(2):90-96.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162): 1145-1148.
- López-García, C., Molowny, A, García-Verdugo, J.M., Ferrer, I. (1988). Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Brain Res.*, 471:167-174.
- Lu, L., Dempsey, J., Liu, S.Y., Bossert, J.M., Shaham, Y. (2004). A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J. Neurosci.*, 24:1604–1611.
- Lucas, G., Rymar, V.V., Du,J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., manta, S., Lambas-Senas, L., Wiborg, O., Haddjeri, N., Pineyro, G, Sadikot, A.F., Debonnel, G. (2007). Serotonin (4) (5-HT (4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. *Neuron*, 55:712-725.
- Luderer, U., Morgan, M.S., Brodtkin, C.A., Kalman, D.A., Faustman, E.M. (1999). Reproductive endocrine effects of acute exposure to toluene in men and women. *Occupational Environm. Health.*, 56:657-666.
- Luine, V.N., Richards, S.T., Wu, V.Y., Beck, K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm. Behav.*, 34:149–162.

- Magarinos, A.M., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14002–14008.
- Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405:951-955.
- Mandyam, C.D., Eisch, A.J. (2004). Chronic morphine alters the pro-proliferative environment in the adult rodent hippocampus. Program No. 357.16 Abstract Viewer and Itinerary Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, (online).
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H., Watson, S.J. (1992). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience*, 46:959–971.
- Martin, K.A., Slapper, D. (2001). Toxicity Toluene. *Med. J.*, 2:2-10.
- Markesbery, W.R., Carney, J.M. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, 9(1):133-146.
- Marubio, L.M., Gardier, A.M., Durier, S., David, D., Klink, R., Arroyo-Jimenez, M.M., McIntosh, J.M., Rossi, F., Champtiaux, N., Zoli, M., Changeux, J.P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Neurosci.*, 17:1329-1337.
- Matthews, D.B., Silvers, J.R. (2004). The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 82:299–308.

- Mattia, C.J., Ali, S.J., Bondy, S.C. (1993). Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 18(3):313-328.
- Mayor-Ríos, J. (1995). Efectos de los solventes orgánicos sobre el sistema nervioso. los métodos neurológicos. *Salud de los Trabajadores*, 3(2):108-115.
- McDougal, J.N., Jepson, G.W., Clewell, H.J., Gargas. M.L., Andersen, M.E. (1990). Dermal absorption of organic chemical vapors in rats and humans. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 14(2):299-308.
- McEwen, B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22:105–122.
- McNally, L., Bhagwagar, Z., Hannestad, J. (2008). Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr.*, 13(6):501-510.
- Melichar, J.K., Daghlish, M.R.C., Nutt, D.J. (2001). Addiction and withdrawal – current views. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1:84-90.
- Menn, B. , Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.*, 26(30): 7907-7918
- Miller, P.W., Mycyk, M.B., Leikin, J.B., Ruland, S.D. (2002). An unusual presentation of inhalant abuse with dissociative amnesia. *Vet. Hum. Toxicol.*, 44:17-19.
- Ming, G. y Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28:223–250.

- Mirescu, C. y Gould, E. (2004). From neurotoxin to neurotrophin. *Nat. Neurosci.*, 7(9):899-900.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.*, 3(3):265-278.
- Morgan, D.L., Cooper, S.W., Carlock, D.L., Sykora, J.J., Sutton, B., Mattie, D.R., y McDougal, J.N., (1991). Dermal absorption of neat and aqueous volatile organic chemicals in the Fischer 344 rat. *Environ Res.*, 55:51-63.
- Morris, R.G., Moser, E.I., Riedel, G., Martin, S.J., Sandin, J., Day, M., O'Carroll, C. (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: The role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 358:773–786.
- Montaron, M.F., Piazza, P.V., Aourousseau, C., Urani, A., Le Moal, M., Abrous, D.N. (2003). Implication of corticosteroid receptors in the regulation of hippocampal structural plasticity. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 3105–3111.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.*, 116:201-211.
- Muller, S., Chakrapani, B.P., Schwegler, H., Hofmann, H.D., Kirsch, M. (2008). Neurogenesis in the dentate gyrus depends on CNTF and STAT3 signaling. *Stem Cells*, 27(2)431-441.

- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning & Memory*, 9:49-57.
- Mutti, A., Falzoi, M., Romanelli, A., Bocchi, M.C., Ferroni, C., Franchini, I. (1998). Brain dopamine as a target for solvent toxicity: effects of some monocyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology*, 49:77-82.
- Nacher, J., Crespo, C., McEwen, B.S. (2001). DCX expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, 14:629–644.
- Ness, R.B., Grisso, J.A., Hirschinger, N., Markovic, N., Shaw, L.M., Day, N.L., Kline, J. (1999). Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N. Engl. J. Med.*, 340:333-339.
- Nestler, E.J., Aghajanian, G.K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278:58-63.
- Nestler, E.J. (2000). Genes and addiction. *Nature genetics*, 26:277-281.
- Nixon, K., Crews, F.T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 83:1087–1093.
- Nixon, K., Crews, F.T. (2004). Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci.*, 24:9714–9722.
- Nixon, K. (2006). Alcohol and adult neurogenesis: roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism. *Hippocampus*, 16:287–295.

- Nixon, K., Kim, D.H., Potts, E.N., He, J., Crews, F.T. (2008). Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis. *Neurobiol Dis.*, 31(2):218-229.
- Ohtani, N., Goto, T., Waeber, C., Bhide, P.G. (2003). Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J. Neurosci.* 23(7):2840-2850.
- Ohnuma, S. y Harris, W.A. (2003). Neurogenesis and the Cell Cycle. *Neuron*, 40:199–208.
- Okano, H.J., Pfaff, D.W., Gibbs, R.B. (1996). Expression of EGFR-, p75NGFR-, and PSTAIR (cdc2)-like immunoreactivity by proliferating cells in the adult rat hippocampal formation and forebrain. *Dev. Neurosci.*, 18:199–209.
- O’Keefe, J., Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map.* Oxford: Clarendon Press., 570:614.
- Oleskevich, S., Descarries, L., Watkins, K.C., Seguela, P., Daszuta, A. (1991). Ultrastructural features of serotonin innervations in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience*, 42:777-791.
- Orbaek, P., Lindgren, M., Olivecrona, H., Haeger-Aronsen, B. (1987). Computed tomography and psychometric test performances in patients with solvent induced chronic toxic encephalopathy and healthy controls. *Br J Ind Med.*, 44(3):175-179.
- Packer, M.A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., Goldman, S.A., Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide

negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100:9566-9571.

- Páez-Martínez, N., Cruz, S.L., López-Rubalcava, C. (2003). Comparative study of the effects of toluene, benzene, 1,1,1-trichloroethane, diethyl ether and fluorothyl on anxiety and nociception in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 193:9-16.

- Páez-Martínez, N., López-Rubalcava, C., Cruz, S.L. (2003). Avances recientes en la investigación de los mecanismos celulares de acción de los disolventes de abuso. *Salud Ment.*, 26:43-50.

- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., Lowenstein, D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 17:3727-3738.

- Patel, N.A., Romero, A.A., Zadina, J.E., Chang, S.L. (1996). Chronic exposure to morphine attenuates expression of interleukin-1 beta in the rat hippocampus. *Brain Res.*, 712:340-344.

- Pearson, M.A., Hoyme, H.E., Seaver, L.H., Rimsza, M.E. (1994). Toluene embryopathy: delineation of phenotype and comparison with fetal alcohol syndrome. *Pediatrics*, 93:211-215.

- Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J., Luskin, M.B. (2001). Neurogenesis in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream of the Neonatal and Adult Primate Forebrain. *Experimental Neurology*, 172:1-16.

- Perea, G., Araque, A. (2003). Nuevas vías de información en el sistema nervioso: comunicación entre astrocitos y neuronas. *Rev. Neurol.*, 36 (2): 137-144.
- Pérez-Cañellas, M.M., Font, E., García-Verdugo, J.M. (1996). Postnatal neurogenesis in the telencephalon of turtles: evidence for nonradial migration of new neurons from distant proliferative ventricular zones to the olfactory bulbs. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 101(1-2):125-137.
- Peterson, D.A. (2002). Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr. Op. Pharmacology*, 2:34-42.
- Philipps Frederick C. (1980) NIOSH Manual of Analytical Methods. Method P&CAM 327, U.S. Department of Health and Human Services, Publ. (NIOSH), 2nd. Ed. Vol. 6 80-25.
- Pierce, R.C., Pierce-Bancroft, A.F., Prasad, B.M. (1999). Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J. Neurosci.*, 19:8685-8695.
- Poldrack, R.A., Packard, M.G. (2003). Competition among multiple memory systems: Converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41:245-251.
- Pongvarin, N. (1991). Multifocal brain damage due to lacquer sniffing: the first case report of Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.*, 74(7):296-300.
- Prickaerts, J., Koopmans, G., Blokland, A., Scheepens, A. (2004). Learning and adult neurogenesis: survival with or without proliferation? *Neurobiol. Learn. Mem.*, 81:1-11.

- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.*, 494(3): 415-434.
- Rai, K.S., Hattiangady, B., Shetty, A.K. (2007). Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *Eur.J.Neurosci.*, 26:1765-1779.
- Ramón-Cajal, S. (1904). *Textura del Sistema Nervioso Central del Hombre y los Vertebrado*. Ed. Moya, Madrid.
- Rana, S.V., Kumar, S. (1994). Lipid peroxidation in liver, kidney and brain of rats after combined exposure to xylene, toluene and methyl alcohol. *Indian J Exp Biol.*, 32(12):919-921.
- Rao, M.S., Shetty, A.K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 19:234-246.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 12(11): 4565-4574.
- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 85(17):6465-6467.

- Riegel, A.C., Ali, S.F., French, E.D. (2003). Toluene-induced locomotor activity is blocked by 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mGluR2/3 agonist LY379268. *Neuropsychopharm.*, 28:1440-1447.
- Riegel, A.C., French, E.D. (2002). Abused inhalants and central reward pathways: electrophysiological and behavioral studies in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 965:281-291.
- Riegel, A.C., Zapata, A., Shippenberg, T.S., French, E.D. (2007). The Abused Inhalant Toluene Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens by Directly Stimulating Ventral Tegmental Area Neurons. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1558–1569.
- Riikonen, J., Jaatinen, P., Rintala, J., Porsti, I., Karjala, K., Hervonen, A. (2002). Intermittent ethanol exposure increases the number of cerebellar microglia. *Alcohol Alcohol.*, 37:421-426.
- Rodríguez, J.J., Jones, V.C., Tabuchi, M., Allan, S.M., Knight, E.M., LaFerla, F.M., Oddo, S., Verkhratsky, A. (2008). Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.*, 3(8):e2935.
- Rogers, R.D. y Robbins, T.W. (2001). Investigating the neurocognitive deficits associated with chronic drug misuse. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11:250–257.
- Rosenberg, N.L. (2002). Neuropsychologic impairment and MRI abnormalities associated with chronic solvent abuse. *J. Toxicol., Clin. Toxicol.*, 40:21-34.

- Rueda, D., Navarros, B., Martinez-Serrano, A., Guzman, M., Gave-Roperh, I. (2002). The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J. Biol. Chem.*, 277:46645-46650.
- Saddik, B., Williamson, A., Nuwayhid, I., Black, D. (2005). The effects of solvent exposure on memory and motor dexterity in working children. *Public Health Rep.*, 120:657-663.
- Sahay, A., Hen, R (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.*, 10:1110 –1115.
- Sakakibara, S., Okano, H. (1997). Expression of Neural RNA-Binding Proteins in the Postnatal CNS: Implications of Their Roles in Neuronal and Glial Cell Development *The Journal of Neuroscience*, 17(21):8300–8312.
- Scemes, E. (2000). Components of astrocytic intercellular calcium signalling. *Mol. Neurobiol.*, 22:167-179.
- Scerri, C., Stewart, C.A., Breen, K.C., Balfour, D.J. (2005). The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology*, 16:1–7.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 86(24):9697-9701.
- Schaar, B.T., Kinoshita, K., McConnell, S.K. (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron*, 41:203-213.

- Schanzer, A., Wachs, F.P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K.H., Kuhn, H.G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.*, 14:237-248.
- Schneider, D.J. (1991). Cardiac ramifications of cocaine abuse. *Coronary Artery Disease*, 2:267-273.
- Seppäläinen, A.M., Laine, A., Salmi, T., Verkkala, E., Riihimäki, V., Luukkonen, R. (1991). Electroencephalographic findings during experimental human exposure to m-xylene. *Arch. Environ. Health.*, 46(1):16-24.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J. Neurosci.*, 21(18):7153–7160.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Álvarez-Buylla, A. (2004). Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 478:359–378.
- Shingo, A.S., Kito, S. (2005). Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J. Neural. Transm.*, 112(11):1475-1478.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.
- Shors, T.J. (2004). Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness. *Trends Neurosci.*, 27:250–256.

- Snyder, S.H., Ferris, C.D. (2000). Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *An. J. Psychiatric*, 157(11):1738-1751.
- Solomons-Graham, T.W. (1992). *Organic Chemistry*. New York, USA: Wiley, 5th edition.
- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature*, 5(5): 39-44.
- Spain, J.W., Newsom, G.C. (1991). Chronic opioids impair acquisition of both radial maze and Y-maze choice escape. *Psychopharmacology*, 105:101–106.
- Spranger, M., Lindholm, D., Bandtlow, C., Heumann, R., Gnahn, H., Njer-No, M., Thonen, H. (1990). Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte culture and in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 2:69-76.
- Stackman, R.W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., Quinn, J.F. (2003). Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp Neurol.*, 184 (1):510-520.
- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., Hoog, C. (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J. Cell Sci.*, 109:143-153.

- Stengård, K., O'Connor, W.T. (1994). Acute toluene exposure decreases extracellular gamma-aminobutyric acid in the globus pallidus but not in striatum: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 292(1):43-46.
- Stoll, G., Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.*, 58:233-247.
- Streit, W.J., Walter, S.A., Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.*, 57:563-581.
- Swanson, L.W., Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 172(1):49-84.
- Szucs, S., Tóth, L., Legoza, J., Sárváry, A., Adány, R. (2002). Simultaneous determination of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Arch. Toxicol.*, 76(10):560-569.
- Tales, A., Snowden, R.J., Haworth, J., Wilcock, G. (2005). Abnormal spatial and non-spatial cueing effects in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurocase*, 11(1):85-92.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.*, 19:5792-5801.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Rydel, T.A., Galea, L.A., Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult

rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J. Comp. Neurol.*, 437:496-504.

- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E. (2005). Ovarian Steroids Influence Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of the Adult Female Rat in a Dose- and Time- Dependent Manner. *J. Com. Neurol.*, 19(14):5792–5801.

- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442:929-933.

- Tenenbein, M., Pillay, N. (1993). Sensory evoked potentials in inhalant (volatile solvent) abuse. *J. Paediatr. Child Health.*, 29(3):206-208.

- Thiel, R., Chahoud, I. (1997). Postnatal development and behaviour of Wistar rats after prenatal toluene exposure. *Arch. Toxicol.*, 71:258-265.

- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47(6):803-815.

- Trejo, J.L., Llorens-Martín, M.V., Torres-Aleman, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behaviour are mediated by an IGF-1 dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol.Cell. Neurosci.*, 37:402-411.

- Teuchert-Noodt, G., Dawirs, R.R., Hildebrandt, K. (2000). Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J. Neural Transm.*, 107:133–143.

- Tsuruta, H. (1996). Skin Absorption of Solvent Mixtures Effect of Vehicles on Skin Absorption of Toluene. *Industrial Health*, 34: 369-378.
- Ukai, H., Kawai, T., Inoue, O., Maejima, Y., Fukui, Y., Ohashi, F., Okamoto, S., Takada, S., Sakurai, H., Ikeda, M. (2007). Comparative evaluation of biomarkers of occupational exposure to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 81:81-93.
- Ulla, H., Soren, P.L., Karin, S.H., Leif, S. (1999). Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats, *Neurotoxicol. and teratol.*, 21(4):349-357.
- van Groen, T., Wyss, J.M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.*, 302(3):515-528.
- Van Kampen, J.M., Robertson, H.A. (2004). Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *Eur. J. Neurosci.*, 19:2377-2387.
- Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *PNAS.*, 96 (23):13427-13431.
- Van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415:1030-1034.
- Vernadakis, A. y Mangoura, D.A. (1988). Factors influencing glia growth in culture: nutrients and cell-secreted factors. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 259:57-79.

- Vertes, R.P. (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 326(4):595-622.
- Von Euler, G., Ogren, S.O., Li, X.M., Fuxe, K., Gustafsson, J.A. (1993). Persistent effects of subchronic toluene exposure on spatial learning and memory, dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 agonist binding in the rat. *Toxicology*, 77:223-232.
- Von Euler, M., Pharm, T.M., Hillefors, M., Bjelke, B., Henriksson, B., vonEuler, G. (2000). Inhalation of low concentrations of toluene induces persistent effects on a learning retention task, beam-walk performance, and cerebro cortical size in rat. *Exp. Neurol.*, 163:1-8.
- Wallen, M. (1986). Toxicokinetics of toluene in occupationally exposed volunteers. *Scann. J. Work Environ. Health*, 12: 588-93.
- Warner, E.A. (1993). Cocaine Abuse. *Ann. Inter. Med.*, 119:226-235.
- Warner, E.A. (1995). Is your patient using cocaine? Clinical signs that should raise susposicion. *Postgrad. Med.*, 98:173-180.
- Wilkins-Haung, L. (1997). Teratogen update: toluene, *Teratology*, 55:145-151.
- Wilkins-Haung, L., Gabow, P.A. (1991). Toluene abusing during pregnancy: obstetric complications and perinatal outcomes. *Obstet. Gynecol.*, 77:504-509.
- Wilson, J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75(10-11):1149-1163.
- Wise, R.A. (2000). Addiction becomes a brain disease. *Neuron*, 26:27-33.

- Wood, G.E., Beylin, A.V., Shors, T.J. (2001). The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning in males versus females. *Behav. Neurosci.*, 115:175–187.
- Wood, R.L., Lioffi, C. (2005). Long-term neuropsychological impact of brief occupational exposure to organic solvents. *Arch. Clin. Neuropsychol.*, 20:655-665.
- 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.
- Yamaguchi, M., Suzuki, T., Seki, T., Namba, T., Liu, J., Arai, H., Hori, T., Shiga, T. (2005). Decreased cell proliferation in the dentate gyrus of rats after repeated administration of cocaine. *Synapse*, 58:63–71.
- Yavich, L., Zvartau, E. (1994). A comparison of the effects of individual organic solvents and their mixture on brain-stimulation reward. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48:661-664.
- Yavich, L., Patkina, N., Zvartau, E. (1994). Experimental estimation of addictive potential of a mixture of organic solvents. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 4:111-118.
- Yoshimura, S., Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S.S., Waeber, C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O., Mokowitsz, M.A. (2001). FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98:5874-5879.

- Zhang, L., Corona-Morales, A.A., Vega-González, A., García-Estreda, J., Escobar, A. (2009). Dietary tryptophan restriction in rats triggers astrocyte cytoskeletal hypertrophy in hippocampus and amygdale. *Neuroscience Letters*, 450:242–245.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G. Jr, Ming, G.L. y Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.*, 26:3–11.
- Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Zhou, Y.X., Lu, B., Deng, C.X. (2007). Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol. Psychiatry.*, 62:381-390.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I. (1995). Proliferations zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.*, 160:78-87.
- Zwain, I.H., Yen, S.S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140:3843-3852.

Imagen de la portada de cada capítulo: “Hippocampus”. Santiago Ramón y Cajal [1909] (1911). “*Histologie du Système Nerveux de l’Homme et des Vertébrés*”. Paris: A. Maloine.

