



CEU | *Universidad
Cardenal Herrera*

**“Efecto del consumo de cocaína
sobre el cerebro de rata.
Tratamiento con topiramato”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Dña. Rosa M^a López Pedrajas

Dirigida por: Dr. D. Francisco Javier Romero Gómez

Dr. D. María Muriach Saurí

VALENCIA

2013

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

Ministerio de Educación y Ciencia. Proyecto SAF 2007-66801.

Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto SAF 2010-21317.

Ministerio de Sanidad. Plan Nacional sobre Drogas. Proyecto 2010/059.

Universidad CEU-Cardenal Herrera: Proyecto Consolidado (PRCEU-UCH 23/11) y Proyecto Copernicus

Beca FPDI de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

Beca FPU del Ministerio de Educación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	19
1. ADICCIÓN	21
2. COCAÍNA	23
2.1 Mecanismos de acción de la cocaína	24
2.2 Consecuencias del consumo de cocaína	26
3. TOPIRAMATO	28
4. MEMORIA Y APRENDIZAJE	30
4.1 Hipocampo	33
4.2 Corteza frontal	36
4.3 Memoria y aprendizaje y drogas.....	37
4.4 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB).....	39
4.5 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).....	41
5. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB)	43
5.1 Funciones	45
5.2 NF-κB en el sistema nervioso central	46
5.2.1 Relación de NF-κB con el aprendizaje y la memoria.....	47
5.2.2 NF-κB y drogas de abuso.....	48
6. ESTRÉS OXIDATIVO	49
6.1 Generación de radicales libres	50
6.2 Papel fisiológico de los radicales libres	51
6.3 Papel patogénico de los radicales libres.....	51
6.4 Defensas antioxidantes	52
6.4.1 El sistema glutatión	53
6.5 Sistema dopaminérgico y estrés oxidativo.....	55
6.6 Muerte celular por apoptosis	55
6.6.1 Efectores de la apoptosis. Caspasas	56
6.6.2 Estrés oxidativo y apoptosis	59
6.6.3 Apoptosis y drogas de abuso	60
6.7 Óxido nítrico y estrés nitrosativo.....	60
HIPÓTESIS	63
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71

1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	73
1.1 Condiciones de estabulación.....	73
1.2 Manejo de los animales.....	73
2. MODELO EXPERIMENTAL.....	74
3. LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	75
4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	77
4.1 Orina.....	77
4.2 Tejido nervioso.....	77
4.2.1 Estudio de las defensas antioxidantes.....	78
4.2.2 Determinación de la actividad de NF- κ B.....	78
4.2.3 Análisis mediante wester blot.....	79
4.2.4 Histoquímica.....	80
5. DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN ORINA.....	80
6. ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	80
6.1 Determinación de proteínas.....	80
6.2 Determinación del Glutati3n.....	81
6.3 Determinación de la actividad glutati3n peroxidasa.....	83
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.....	85
7.1 Determinación de proteínas (Método Bradford).....	85
7.2 Técnica de western blot.....	85
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-KB.....	88
9. HISTOQUÍMICA DE LA NADPH-DIAFORASA.....	88
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	89
10.1 Estadística descriptiva.....	89
10.2 Pruebas estadísticas.....	90
RESULTADOS.....	93
I. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 20 DÍAS Y TRATAMIENTO CON TOPIRAMATO.....	95
1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	95
2. ACTIVIDAD DE NF-KB.....	98
3. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.....	100
4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3.....	105
5. HISTOQUÍMICA DE NADPH-DIAFORASA.....	106
II. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 36 DÍAS.....	111
1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	111

2. ACTIVIDAD DE NF-KB.....	114
3. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.....	116
4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3.....	118
5. ESTUDIO DE OTRAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	120
5.1 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB).....	120
5.2 Proteína quinasa A (PKA).....	123
5.3 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).....	125
5.4 Glutamato descarboxilasa (GAD65).....	127
DISCUSIÓN.....	131
I. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 20 DÍAS Y TRATAMIENTO CON TOPIRAMATO.....	133
1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	133
2. ACTIVIDAD DE NF-KB.....	135
3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	136
4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3.....	139
5. HISTOQUÍMICA DE NADPH-DIAFORASA.....	140
II. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 36 DÍAS.....	142
1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	142
2. ACTIVIDAD DE NF-KB.....	143
3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	144
4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3.....	145
5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	145
CONCLUSIONES.....	151
PHD THESIS (EXTENDED SUMMARY IN ENGLISH)	
INTRODUCTION.....	157
1. ADDICTION.....	157
2. COCAINE.....	158
3. TOPIRAMATE.....	160
4. MEMORY AND LEARNING.....	162
5. NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NF-KB).....	167
6. OXIDATIVE STRESS.....	169
HYPOTHESIS.....	176
OBJECTIVES.....	177

RESEARCH DESIGN AND METHODS	178
1. ANIMALS CARE	178
2. EXPERIMENTAL MODEL	178
3. MORRIS WATER MAZE TEST	179
4. STUDY OF ANTIOXIDANT DEFENSES	180
5. WESTERN BLOT ANALYSIS	181
6. NF-KB ACTIVITY	181
7. HISTOCHEMICAL NADPH-DIAPHORASE	181
8. STATISTICAL ANALYSIS	182
RESULTS.....	183
I. COCAINE ADMINISTRATION FOR 20 DAYS AND TOPIRAMATE TREATMENT.....	183
1. MORRIS WATER MAZE TEST	183
2. NF-KB ACTIVITY	186
3. ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS	187
4. NADPH-DIAPHORASE HISTOCHEMISTRY	189
II. COCAINE ADMINISTRATION FOR 36 DAYS.....	190
1. MORRIS WATER MAZE TEST	190
2. NF-KB ACTIVITY.....	193
3. STUDY OF OTHER PROTEINS INVOLVED IN LEARNING AND MEMORY PROCESSES.....	194
DISCUSSION.....	200
I. COCAINE ADMINISTRATION FOR 20 DAYS AND TOPIRAMATE TREATMENT.....	200
1. MORRIS WATER MAZE TEST	200
2. NF-KB ACTIVITY.....	201
3. ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS	202
4. NADPH-DIAPHORASE HISTOCHEMISTRY	204
II. COCAINE ADMINISTRATION FOR 36 DAYS.....	206
1. MORRIS WATER MAZE TEST	206
2. NF-KB ACTIVITY.....	207
3. STUDY OF OTHER PROTEINS INVOLVED IN LEARNING AND MEMORY PROCESSES.....	208
CONCLUSIONS	211
 BIBLIOGRAFÍA	 213

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos primarios usados para Western Blot.....	87
Tabla 2: Anticuerpo secundarios usados para Western Blot.....	87
Tabla 3: Actividad de NF- κ B en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs todos los grupos.	98
Tabla 4: Actividad de NF- κ B en hipocampo.	99
Tabla 5: Concentración de GSH en corteza frontal.	100
Tabla 6: Actividad de la enzima GPx en corteza frontal.	101
Tabla 7: Concentración de GSH en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos.	102
Tabla 8: Actividad de GPx en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos. ...	103
Tabla 9: Número de células NADPH Diaforasa positivas en corteza frontal.	107
Tabla 10: Número de células NADPH-Diaforasa positivas en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos.	109
Tabla 11: Actividad de NF- κ B en corteza frontal e hipocampo. * $p < 0.05$ vs grupo cocaína.....	114
Tabla 12: Concentración de GSH y actividad de GPx en corteza frontal e hipocampo.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular del topiramato.....	27
Figura 2: Esquema de las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria. (Adaptado de Squire et al. 1996)(Squire and Zola, 1996)	34
Figura 3: Diagrama básico del circuito hipocampal. PP: vía perforante; GD: giro dentado, fm: fibras musgosas, sch: fibras colaterales de Schaeffer.....	35
Figura 4: Esquema general de la corteza frontal (Adaptado de Tirapu-Ustarroz and Munoz-Céspedes, 2005)	37
Figura 5: Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB. (Adaptado de Carlezon et al., 2005 (Carlezon et al., 2005).	41
Figura 6: Ruta de señales de NF- κ B. Diferentes estímulos pueden inducir la activación por la vía canónica de NF- κ B por activación de I κ B quinasa (1), la cual fosforila a I κ B (2), y la marca para su ubiquitinación. El NF- κ B libre se trasloca al núcleo (3) y activa la expresión de genes (4). (Adaptado de Lorenzo et al., 2011).	45
Figura 7: Esquema de la síntesis de glutatión. (Adaptado de Massaad et al. 2011).	54
Figura 8: Esquema mostrando las dos principales vías que dan lugar a la apoptosis: la vía extrínseca a través de las proteínas TNF y FAS; y la vía intrínseca a través de la mitocondria y la liberación de citocromo-c.....	58
Figura 9: Esquema de la reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa	61
Figura 10: Esquema de la enzima óxido nítrico sintasa	62
Figura 11: Esquema de la piscina del laberinto de agua de Morris	76
Figura 12: Esquema general de la tarea del laberinto de agua de Morris	77
Figura 13: Test del laberinto de agua de Morris. Latencia acumulada (s). * $p < 0.05$ vs todos los grupos. $n = 8-16$	93
Figura 14: Comparación de latencias (s) entre el pase 9 (último pase antes del tratamiento) y pase 10 (primero después del tratamiento). * $p < 0.05$ vs todos los grupos, † $p < 0.05$ vs pase 9. $n = 8-16$	96
Figura 15: Comparación de latencia (s) entre el pase 12 (último pase después del tratamiento) y el test de transferencia (plataforma cambiada de posición). * $p < 0.05$ vs pase 12. $n = 8-16$	97

Figura 16: Representación del número de veces que el animal entre en el cuadrante diana entre la latencia acumulada (pases 10-12). n=8-16.....	97
Figura 17: Representación de la actividad de NF-κB en corteza frontal. *p<0.05 vs todos los grupos. n=6	98
Figura 18: Representación de la actividad de NF-κB en hipocampo. n=6... ..	99
Figura 19: Correlación entre la actividad de NF-κB en la corteza frontal y el incremento de la latencia entre los pases 9 y 10. p=0.021.....	100
Figura 20: Representación de la concentración de GSH en corteza frontal. n=8	101
Figura 21: Representación de la actividad de GPx en corteza frontal. n=8.....	102
Figura 22: Representación de la concentración de GSH en hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos. n=8	103
Figura 23: Representación de la actividad de GPx en hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos. n=8	104
Figura 24: Correlación entre la actividad de GPx en hipocampo y diferencia entre el test de transferencia y el pase 12. p=0.003.....	104
Figura 25: Western blot de Caspasa 3 (17/19 kDa), Procaspasa 3 (35 kDa) y β-Actina (42 kDa). A. Corteza frontal. B. Hipocampo.	105
Figura 26: Expresión de procaspasa 3. A. Corteza frontal. B. Hipocampo. n=4	106
Figura 27: Representación comparativa del número de células NADPH Diaforasa positivas en corteza frontal. n=6.	107
Figura 28: Representación del número de células NADPH Diaforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos. n=6.	109
Figura 29: Correlación entre NADPH-diaforasa en hipocampo y diferencia entre el test de transferencia y el pase 12.....	111
Figura 30: Test laberinto de agua de Morris. Latencia acumulada (s). *p<0.05 vs grupo cocaína pase 9. n=8.....	112
Figura 31: Comparación de la latencia (s) entre el pase 9 (último pase antes del tratamiento) y el pase 10 (primer después del tratamiento). * p<0.05 vs pase 9. n=8	113

Figura 32: Comparación de la latencia entre el pase 12 (último pase después del tratamiento) y el test de transferencia (plataforma cambiada de posición). n=8.	113
Figura 33: Representación del número de veces que el animal entre en el cuadrante diana entre la latencia acumulada (pases 10-12). n=8.....	114
Figura 34: Representación de la actividad de NF-κB en corteza frontal. *p<0.05 vs grupo cocaína. n=6.....	115
Figura 35: Representación de la actividad de NF-κB en hipocampo. *p<0.05 vs grupo cocaína. n=7.....	115
Figura 36: Correlación entre la actividad de NF-κB en la corteza frontal y el incremento de la latencia entre los pases 9 y 10. p=0.023.....	116
Figura 37: Representación de la concentración de GSH en corteza frontal. n=6.	117
Figura 38: Representación de la actividad de GPx corteza frontal. n=6.....	117
Figura 39: Representación de la concentración de GSH en hipocampo. n=6.....	118
Figura 40: Representación de la actividad de GPx hipocampo. n=6.....	118
Figura 41: Western blot de Caspasa 3 (17/19 kDa), Procaspa 3 (35 kDa) y β Actina (42 kDa). A. Corteza frontal. B. Hipocampo.	119
Figura 42: Representación de la cuantificación de procaspasa 3 en corteza frontal. n=4.	119
Figura 43: Representación de la cuantificación de procaspasa 3 en hipocampo. n=4.	120
Figura 44: Representación del western blot de pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.....	121
Figura 45: Representación de la densidad de pCREB entre CREB en corteza frontal. n=6.	121
Figura 46. Representación del western blot de pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.....	121
Figura 47: Representación de la cuantificación del western blot de pCREB entre CREB en hipocampo. *p<0.05 vs control. n=6.	122
Figura 48: Representación de la correlación entre pCREB/CREB y la actividad de NF-κB en hipocampo. p=0.046.....	122
Figura 49: Representación del western blot de PKAc α (42 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.	123

Figura 50: Representación de la cuantificación de PKAc α en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs grupo control. $n = 6$	123
Figura 51: Representación de la correlación de PKAc α y actividad de NF- κ B en corteza frontal. $p = 0.028$	124
Figura 52: Representación del western blot de PKAc alpha (42 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.	124
Figura 53: Representación de la cuantificación del western blot de PKAc alpha en hipocampo. $n = 6$	125
Figura 54: Representación del western blot de BDNF (20 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.	125
Figura 55: Representación de la cuantificación de BDNF en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs grupo control. $n = 6$	126
Figura 56: Representación de la correlación entre BDNF y la actividad de NF- κ B en corteza frontal. $p = 0.022$	126
Figura 57: Representación del western blot de BDNF (20 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.	127
Figura 58: Representación de la cuantificación del western blot de BDNF en hipocampo. $n = 7$	127
Figura 59: Representación del western blot de GAD65 (65 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.	128
Figura 60: Representación de la cuantificación de GAD65 en corteza frontal. $n = 6$	128
Figura 61: Representación del western blot de GAD65 (65 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.	129
Figura 62: Representación de la cuantificación del western blot de GAD65 en hipocampo. $n = 6$	129
Figura 63: Representación de la correlación entre GAD65 y la actividad de NF- κ B en hipocampo. $p = 0.04$	130
Figure 64: Morris water maze test. Accumulated latency (s). * $p < 0.05$ vs all groups. $n = 8-16$	183
Figure 65: Latencies comparison (s) between trial 9 (last trial before treatment) and trial 10 (the first trial post-treatment). * $p < 0.05$ vs all groups, † $p < 0.05$ vs trial 9. $n = 8-16$	184

Figure 66: Latencies comparison (s) between trial 12 (final trial after treatment) and transfer test (platform position changed). *p<0.05 vs trial 12. n=8-16.	185
Figure 67: Number of times that animal enters target quadrant and accumulated latency (trials 10-12). n=8-16.....	185
Figure 68: NF-κB activity in frontal cortex. *p<0.05 vs all groups. n=6.	186
Figure 69: NF-κB activity in hippocampus. n=6.	186
Figure 70: Correlation between NF-κB activity in the frontal cortex and latency increased between trials 9 and 10. p=0.021.....	187
Figure 71: GSH concentration in hippocampus. *p<0.05 vs all groups. n=8.	188
Figure 72: GPx activity in hippocampus. *p<0.05 vs all groups. n=8.....	188
Figure 73: Correlation between GPx activity in hippocampus and the difference between the transfer test and trial 12. p=0.003.	189
Figure 74: Number of NADPH diaphorase-positive cells in subgranular layer of the dentate gyrus of hippocampus. *p<0.05 vs all groups. n=6.....	189
Figure 75: Correlation between NADPH-diaphorase in hippocampus and difference between the transfer test and trial 12.....	190
Figure 76: Test Morris water maze. Accumulated latency (s). *p<0.05 vs cocaine group trial 9. n=8.	191
Figure 77: Latency comparison (s) between trial 9 (last trial before treatment) and trial 10 (first trial post-treatment). *p<0.05 vs trial 9. n=8.....	192
Figure 78: Number of times that animal enters to target quadrant and accumulated latency (trials 10-12). n=8.....	192
Figure 79: NF-κB activity in frontal cortex. *p<0.05. n=6.	193
Figure 80: NF-κB activity in hippocampus. *p<0.05. n=7.....	193
Figure 81: Correlation between NF-κB activity in the frontal cortex and increased latency between trials 9 and 10. p=0.023.....	194
Figure 82: Western blot representation of pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) and β actin (42 kDa) in hippocampus.....	195
Figure 83: Western blot quantification of pCREB related with CREB in hippocampus. * p <0.05. n=6.....	195
Figure 84: Correlation between pCREB/CREB and NF-κB activity in hippocampus. p = 0.046.....	196
Figure 85: Western blot representation of PKAc α (42 kDa) and β Actin (42 kDa) in frontal cortex.....	196

Figure 86: Western blot quantification of PKAc α in frontal cortex. * $p < 0.05$. $n = 6$	197
Figure 87: Correlation between PKAc α and NF- κ B activity in frontal cortex. $p = 0.028$	197
Figure 88: Western blot representation of BDNF (20 kDa) and β Actin (42 kDa) in frontal cortex.	198
Figure 89: Western blot quantification of BDNF in frontal cortex. * $p < 0.05$. $n = 6$	198
Figure 90: Correlation between BDNF and NF- κ B activity in frontal cortex. $p = 0.022$	198
Figura 91: Correlation between GAD65 and NF- κ B activity in hippocampus. $p = 0.04$	199

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AC	Adenilato Ciclasa
AVT	Área Tegmental Ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CAMKII	Ca ²⁺ /calmodulina quinasa II
CaMIV	Calmodulina dependiente de Ca ²⁺ IV
CRE	Elemento de respuesta del AMPc
CREB	Elemento de respuesta a la unión de AMPc
pCREB	fosfo-CREB
DA	Dopamina
DLP	Depresión a largo plazo
ERK	Quinasa reguladora de señales extracelulares
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
MAPK	Proteína quinasa activada por mitogenes
NAc	Núcleo Accumbens
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PBS	Tampón fosfato salino
PKA	Proteína quinasa A

PKAc α	Proteína quinasa A catalítica alfa
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Proteína fosfolipasa C
PLP	Potenciación a largo plazo
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
TNF	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

1. ADICCIÓN

La adicción a drogas es una enfermedad crónica, en la que a menudo se producen recaídas (Leshner, 1997). Se caracteriza por la búsqueda y el uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias nocivas que éstas provocan en la vida del adicto y de los que le rodean. La drogadicción se considera una enfermedad porque el abuso de drogas produce cambios en la estructura y en el funcionamiento del cerebro. Si bien es cierto que en la mayoría de las personas la decisión inicial de tomar drogas es voluntaria, con el tiempo los cambios en el funcionamiento cognitivo causados por el continuo consumo de drogas pueden afectar el auto-control y la habilidad del sujeto para tomar decisiones adecuadas. Debido a estos cambios, dejar de consumir se convierte en una meta compleja (NIDA, 2008), ya que las drogas interactúan fuertemente con los circuitos cerebrales que nos permiten aprender y adaptarnos a estímulos ambientales. En concreto a aquellos que nos aportan recompensa, como puede ser la comida, el sexo o refuerzos sociales, o ante situaciones de peligro (Everitt and Robbins, 2005; Kelley, 2004), que además son esenciales para la supervivencia.

Las drogas son sustancias químicas que afectan el sistema de comunicación e interrumpen el envío, la recepción y el procesamiento normal de información entre las células nerviosas. Por ello pueden imitar los mensajes químicos naturales del cerebro o sobreestimularlo. Algunas drogas, como la marihuana y la heroína, tienen una estructura similar a neurotransmisores que el cerebro produce de manera natural. Debido a esta semejanza, este tipo de drogas actúa sobre los receptores del cerebro logrando activar a las células nerviosas para que envíen mensajes anormales.

Por lo general, las drogas, directa o indirectamente afectan el sistema de recompensa del cerebro, cuya área central es el Núcleo Accumbens (NAc), y cuyo principal neurotransmisor es la Dopamina (DA) (Bardo, 1998; Koob and Nestler, 1997). La DA es un neurotransmisor que actúa en regiones del cerebro que regulan el movimiento, las emociones, la cognición, la motivación y los sentimientos de placer. La sobreestimulación del sistema de recompensa

normalmente refuerza nuestros comportamientos naturales vinculados a la supervivencia (comer, pasar tiempo con los seres queridos, etc.), produce efectos de euforia como respuesta a las drogas. Esta reacción inicia un patrón que induce a las personas a repetir comportamientos de abuso de drogas.

Cuando una persona continúa abusando de las drogas, el cerebro se adapta a la excesiva DA produciendo menos, y disminuyendo el número de receptores para este neurotransmisor en el circuito de recompensa. Además, también se sabe que los adictos muestran una hiporespuesta a estímulos biológicos, porque se reduce la actividad de la corteza prefrontal. Como resultado, el impacto de la DA sobre el circuito de recompensa se puede volver muy limitado, reduciendo así la habilidad del usuario de gozar de las drogas, así como de otras situaciones y actividades que previamente le provocaban placer. Esta disminución obliga al drogadicto a continuar consumiendo drogas en un intento de lograr que la función de la DA regrese a su estado normal. Sin embargo, llegados a este punto necesita consumir una cantidad mayor de droga a fin de elevar la función de DA a su nivel normal anterior. Este efecto se conoce como tolerancia (Hyman and Malenka, 2001; NIDA, 2008).

El abuso a largo plazo también causa cambios en otros sistemas y circuitos del cerebro. El glutamato es un neurotransmisor que influye también sobre el circuito de recompensa y en la habilidad para aprender (McFarland et al., 2004). Cuando el abuso de drogas altera la concentración óptima del glutamato, el cerebro intenta compensar este desequilibrio, lo que puede deteriorar la función cognitiva. Las drogas de abuso facilitan el aprendizaje no consciente (condicionado), lo que hace que el usuario sienta deseos incontrolables de consumir droga cuando se sitúa en un contexto que asocia al consumo, aún cuando la droga no está presente. Los estudios de neuroimagen de adictos que consumen droga de forma abusiva, muestran cambios en áreas cerebrales esenciales para el juicio, la toma de decisiones, el aprendizaje, la memoria y el control del comportamiento (Kaufman et al., 1998; Volkow et al., 1999; Volkow et al., 1997). En conjunto, todos estos cambios pueden hacer que el drogadicto busque y consuma drogas compulsivamente a pesar de las consecuencias adversas (NIDA, 2008). Cuando la adicción se instaura, las drogas llegan a tener más importancia que otros aspectos de la vida, y todas

las actividades del adicto están dirigidas hacia el consumo y la obtención de la droga (Hyman et al., 2006).

Como se ha indicado anteriormente, las drogas consumidas de forma crónica producen cambios en el sistema nervioso central (SNC) e incluso neuroplasticidad duradera que se manifiesta en un punto clave de la adicción: las recompensas naturales no son tan placenteras como las causadas por el abuso de drogas (Thomas et al., 2008), este hecho se produce porque las drogas afectan al sistema de recompensa, cuyo núcleo central se localiza en el sistema límbico (Koob and Nestler, 1997).

Las rutas más importantes implicadas en la adicción son:

- Ruta dopaminérgica mesolímbica: Formada sobre todo por neuronas dopaminérgicas, cuyos cuerpos celulares están localizados en el Área Tegmental Ventral (ATV) y proyectan sus axones al NAc, también lleva proyecciones a regiones de la corteza prefrontal y a la amígdala entre otras (Gardner and Ashby, 2000; Rockville, 1996). Esta ruta está implicada en las emociones, en la memoria, en el aprendizaje, así como en la planificación y la ejecución de conductas (Di Chiara et al., 1999).
- Ruta mesocortical: La función de esta ruta es controlar las decisiones, principalmente usando valores de recompensa asociados con estímulos para elegir la acción apropiada (Pierce and Kumaresan, 2006).

2. COCAÍNA

La cocaína es un compuesto producido por un arbusto del género *Erythroxylum*, originario de América del Sur. Aunque existen más de doscientas especies de este género, sólo dos contienen cantidades apreciables de cocaína (*E. coca* y *E. novogranatense*). Por sus características químicas se considera una droga psicoestimulante y un anestésico local.

El consumo de cocaína es un problema global, según La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD) se estima que en 2009 la prevalencia anual del consumo de cocaína en la población de 15 a 65 años fue

de entre el 0,3% y el 0,5%, es decir, consumieron cocaína entre 14,2 y 20,5 millones de personas de esas edades. El mayor mercado de cocaína sigue siendo Estados Unidos, con un consumo calculado de 157 toneladas, el 36% del consumo mundial. El segundo mercado de cocaína es Europa, sobre todo Europa occidental y central, donde se encuentra España, calculándose un consumo de 123 toneladas de cocaína (Oficina de las Naciones Unidas contra la Drogas y el Delito, 2011).

Si nos centramos en España, la cocaína es la segunda droga ilegal más consumida después del cannabis, se calcula que el 2.3% de la población entre 15 y 64 años ha consumido alguna vez cocaína en los últimos 12 meses. (Observatorio Español Sobre Drogas, 2012). En la población adolescente de entre 14 y 18 años este porcentaje aumenta, se calcula que el 3.6% ha consumido cocaína alguna vez en los últimos 12 meses (Observatorio Español Sobre Drogas, 2010), por lo tanto se prevé que el consumo de cocaína no se estabilice y mucho menos se erradique de nuestra sociedad.

Por otro lado, la adicción a estimulantes como la cocaína o anfetamina es un desorden psiquiátrico difícil de tratar, ya que poseen unos efectos reforzantes muy acusados, los cuales provocan unos altos ratios de recaída que pueden ocurrir después de varios meses o años de abstinencia (Kalivas and Volkow, 2005; Majewska, 1996).

2.1 Mecanismos de acción de la cocaína

El principal efecto de la cocaína es la inhibición específica del transportador de monoaminas de la membrana neuronal presináptica. Impide por ello la recaptación de la DA, pero también de la serotonina y la noradrenalina (Cunha-Oliveira et al., 2008; Nestler, 2005; Ritz et al., 1987). Como consecuencia, la concentración de estos neurotransmisores se incrementa en el espacio sináptico, facilitándose su unión a los receptores y aumentando de forma muy intensa su acción fisiológica, particularmente en el ATV y en el NAc.

Si nos centramos en la DA, también debemos conocer cuales son sus receptores. Existen 5 tipos de receptores de DA (D1-D5). Estos se agrupan en

dos familias farmacológicas denominadas D1 y D2. Todos ellos están acoplados a proteínas G. Los receptores de la familia D1 (subtipos D1 y D5) están acoplados a proteínas Gs que activan a la adenilato ciclasa (AC) y estimulan la formación de AMPc. En cambio, la familia D2 (subtipos D2, D3 y D4) está acoplada a proteínas Gi cuya acción es inhibir a la AC (Hartman and Civelli, 1996; Sibley et al., 1993). La familia D1 también se ha demostrado que activa a la proteína fosfolipasa C (PLC) (Undie et al., 1994), mientras que la familia de receptores D2 aumenta la conductancia de potasio (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994) y atenúa la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje (Missale et al., 1998).

Es conocido que la activación de los receptores D2 media los efectos agudos de la cocaína y en última instancia son los responsables de la sensación de euforia. Además potencia los efectos reforzantes inducidos por la cocaína (Welter et al., 2007). En cambio, los receptores D1, al activar a la enzima AC inducen activación de genes inmediatos que son importantes mediadores de la neuroadaptación tras el consumo de cocaína, como pueden ser elemento de respuesta del AMPc (CREB) y cFOS (Seger, 2010; Thomas et al., 2008) y también media los posibles cambios en el comportamiento.

La cocaína tiene además otras acciones en el SNC como la de incrementar el secuestro de DA en las vesículas nerviosas (Cunha-Oliveira et al., 2008), o aumentar la actividad glutamatérgica mediada por los receptores D1 (Kalivas and Duffy, 1998), concretamente se ha observado un aumento de glutamato extracelular después de la administración de cocaína (Pierce et al., 1996). Además se sabe que la cocaína provoca un descenso del tono inhibitorio GABAérgico, por medio de la modulación de sus receptores (Frankowska et al., 2009; Gasió et al., 2004; Huang et al., 2007a; Liu et al., 2005). La cocaína también actúa como anestésico local, esto se debe a que bloquea los canales de sodio y por eso inhibe la propagación de los potenciales de acción (Gass and Olive, 2008), este efecto puede explicar también algunas de las complicaciones cardíacas de la cocaína.

Si nos centramos en estudios de neuroimagen cerebral, se ha demostrado que la cocaína reduce el flujo sanguíneo cerebral, especialmente en zonas

ricas en DA. Esta reducción del flujo cerebral se relaciona con los efectos placenteros de la cocaína y la duración de los mismos (O'Brien, 2006). Además, en humanos hay una relación directa entre la tasa de ocupación del transportador de DA y los efectos placenteros de la cocaína (Volkow et al., 1999).

Con el consumo continuado de la droga se producen cambios en el SNC que pueden dar lugar al desarrollo de la adicción. El principal de ellos es la reducción de la disponibilidad de los receptores D2 en el estriado (Volkow et al., 2004; Volkow et al., 1990), que ocurre cuando la DA se mantiene en niveles suprafisiológicos durante un periodo de tiempo. Esta neuroadaptación intenta mantener la homeostasis, pero tiene consecuencias, ya que el descenso de estos receptores incrementa la vulnerabilidad al consumo (Moore et al., 1998; Seger, 2010). Otras proteínas importantes del sistema dopaminérgico, también se modifican después de un consumo prolongado de cocaína, como la tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de DA) y transportadores de DA, entre otras (Nestler and Aghajanian, 1997). Además también se ven afectados los sistemas glutamatérgico y GABAérgico (Bell et al., 2000).

También es sabido que la exposición repetida a cocaína induce un aumento progresivo de la actividad motora. Este fenómeno se denomina sensibilización conductual, y se asocia a cambios plásticos en circuitos nerviosos. Por otra parte, incrementa el valor motivacional de la droga y además subyace al fenómeno de ansia de droga ("craving") una vez que se abandona el consumo (Nestler and Aghajanian, 1997).

2.2 Consecuencias del consumo de cocaína

En función de la vía de administración la cocaína ejerce sus efectos de forma diferente. Fumada o por vía intravenosa produce sus efectos en segundos, mientras que el consumo intranasal provoca unos efectos más lentos. La absorción oral es baja (30%), necesita de la administración de dosis elevadas para obtener efectos perceptibles.

En el organismo la cocaína tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, llegando al SNC. Igualmente, es capaz de atravesar la barrera placentaria. La cocaína se metaboliza en el organismo por la acción de diferentes enzimas dando lugar a benzoilecgonina (BE, 45%) y ecgonina metil éster (EME, 50%), ambos metabolitos inactivos.

Tan sólo un 1-5% de la cocaína consumida es eliminada sin ser transformada en la orina siendo la presencia de los metabolitos BE y EME mayoritarios en la misma. De hecho, tras una dosis de cocaína se puede detectar BE en la orina durante 48-72 horas y en el caso de consumidores crónicos la orina puede ser positiva a este metabolito durante una semana.

Entre los efectos farmacológicos que se producen tras el consumo de cocaína destacan los siguientes: aumento de la sensación de alerta, mejora del rendimiento intelectual y de la ejecución de tareas manuales, sensación de energía, disminución del cansancio, del sueño y del hambre. También provoca una intensa sensación de placer, euforia y bienestar. En animales de experimentación, la cocaína y otros psicoestimulantes producen un aumento de la actividad locomotora y la aparición de movimientos repetitivos a los que se denominan estereotipias (Moya et al., 2007).

Entre los efectos nocivos que puede producir el consumo de cocaína, destacan los siguientes:

- Cardiovasculares: hipertensión, taquicardia, angina, infarto agudo de miocardio, arritmias, aumento de la demanda de oxígeno, disección aórtica, isquemia de vasos nasales (Karch, 1993).
- Psiquiátricos: ansiedad, agitación psicomotora, agresividad, delirio y alucinaciones, insomnio y conducta estereotipada (Majewska, 1996).
- Complicaciones gastrointestinales: dolor abdominal y náusea (National Institutes of Health, 2001).
- Neurológicos: ictus, convulsiones, vasculitis, coma, neuropatía óptica (Majewska, 1996).

- Otros: Dilatación pupilar o midriasis, sudoración, temblor, aumento de la temperatura corporal y rechinar de dientes o bruxismo (Majewska, 1996).

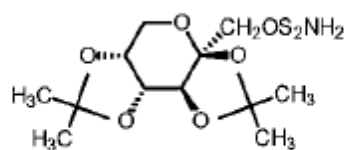
Las muertes ocasionadas por la cocaína se suelen producir por paros cardiacos o convulsiones seguidas de un paro respiratorio (National Institutes of Health, 2001).

Los efectos del consumo de dosis moderadas o altas desaparecen tras un tiempo, para dar paso a un periodo (de duración variable) que se caracteriza por cansancio, en ocasiones disforia o malestar y un deseo intenso de volver a consumir cocaína (“craving”).

Es frecuente la administración de dosis repetidas de forma compulsiva, en forma de atracones (“binges”), que dejan al sujeto en un estado de completo agotamiento o intoxicación.

3. TOPIRAMATO

El topiramato (Topamax®) es un fármaco antiepiléptico, derivado del monosacárido D-fructosa (Maryanoff et al., 1987).



Topiramate

Figura 1: Estructura molecular del topiramato

Como otros anticonvulsionantes, el topiramato tiene múltiples mecanismos de acción: 1) Potencia la actividad GABAérgica inhibitoria (Gordey et al., 2000; White et al., 2000). 2) Bloquea los receptores AMPA(GluR5)/kainato de glutamato (Kaminski et al., 2004). 3) Inhibe la actividad neuronal de canales Na⁺ y Ca²⁺ sensibles al voltaje (Gibbs et al., 2000; White, 2005). 4) Además,

inhibe ligeramente la actividad de la anhidrasa carbónica (Dodgson et al., 2000).

Un efecto secundario de estas acciones consiste en la neuroestabilización y reducción de la salida de DA en el sistema corticomesolímbico, el cual se sabe que está involucrado en mecanismos de recompensa y refuerzo (Nuijten et al., 2011; Shinn and Greenfield, 2010).

El topiramato inicialmente, no ha sido utilizado para tratar adicciones, sino que se administraba para el tratamiento de ataques epilépticos (Privitera, 1997), y más recientemente ha sido aprobado para el tratamiento de migraña (Brown et al., 2005; Bussone et al., 2005; Diamond et al., 2005; White, 2005). Actualmente, sus usos han aumentado, prescribiéndose para desórdenes alimenticios (De Bernardi et al., 2005; Winkelman, 2003), y tratamiento de obesidad (Ioannides-Demos et al., 2005; Wilding, 2004), así como para el tratamiento de diversos desórdenes psiquiátricos (Arnone, 2005; Nickel et al., 2005; Tiihonen et al., 2005) e incluso para el tratamiento de hiperactividad (Shaldubina et al., 2002).

En los últimos años se ha empezado a utilizar el topiramato como agente terapéutico para el tratamiento de la adicción a drogas, ya que entre otras propiedades atenúa los síntomas somáticos de la retirada de varias drogas de abuso (Zullino et al., 2004). El “craving” que aparece durante el tratamiento de diferentes adicciones es una de las situaciones más difíciles de tratar (George et al., 2001). Por lo tanto, el incremento de GABA (neurotransmisor inhibitorio) en regiones del cerebro de pacientes tratados con topiramato, así como el efecto del antiepiléptico sobre el sistema glutamatérgico podrían ser útiles en el tratamiento de este desorden en pacientes con dependencia a sustancias. Así, varias pruebas clínicas recientes han demostrado la eficacia del topiramato en la atenuación del “craving” del alcohol y de su consumo (Anderson and Oliver, 2003; Johnson et al., 2003; Johnson, 2005; Johnson et al., 2004; Kenna et al., 2007; Rubio et al., 2004), así como su utilidad para la retirada de opioides (Zullino et al., 2004). Igualmente, se ha demostrado que promueve la abstinencia de nicotina (Kenna et al., 2007; Khazaal et al., 2006) y de 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) (Akhondzadeh and Hampa, 2005). En lo

que se refiere a la adicción a cocaína varios investigadores han avalado el uso del topiramato para tratar la adicción a esta droga (Johnson, 2005; Johnson et al., 2013; Kampman et al., 2004; Karila et al., 2008; Muriach et al., 2010; Nuijten et al., 2011; Preti, 2007; Sofuoglu and Kosten, 2006; Uys and LaLumiere, 2008).

Como se puede observar la cocaína y el topiramato tienen efectos opuestos sobre los neurotransmisores GABA y Glutamato, por esto se ha seleccionado este fármaco como posible tratamiento para la adicción a cocaína. Además, el topiramato al bloquear los receptores AMPA puede reducir la recaída y el uso de cocaína (Gass and Olive, 2008), ya que en la adicción a cocaína se ha visto que el receptor AMPA juega un papel crítico en el comportamiento de búsqueda de las drogas y en la recaída al consumo.

4. MEMORIA Y APRENDIZAJE

Anteriormente se ha explicado que las drogas tienen la capacidad de modificar las rutas implicadas en el aprendizaje y la memoria relacionados con la recompensa (Everitt and Robbins, 2005), cambiar la conducta y desarrollar el comportamiento de búsqueda de drogas.

El aprendizaje es el fenómeno neurobiológico por el cual adquirimos una determinada información, y la memoria es el proceso por el cual esta nueva información es retenida (Bailey et al., 1996), siendo ambos procesos una de las características del encéfalo más importante: almacenar información y recuperar gran parte de ésta.

El aprendizaje y la memoria son los mecanismos más importantes a través de los cuales el medio puede alterar la conducta (Kandel and Schwartz, 1982). Aunque el proceso de aprendizaje es beneficioso, ya que, nos permite desarrollar capacidades motoras y de lenguaje para transmitir todo lo que hemos aprendido y mantenerlo durante generaciones, no todo lo que aprendemos es beneficioso dado que, el aprendizaje también puede producir

alteraciones en la conducta que no siempre son positivas, y en casos extremos constituir trastornos mentales.

La memoria se puede clasificar de acuerdo con el tiempo durante el cual es efectiva en: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo y también se puede dividir de acuerdo a la naturaleza de lo que se recuerda, en memoria declarativa y memoria no declarativa.

- La memoria a corto plazo o también conocida como memoria de trabajo, se refiere a la memoria que mantiene los procesos el tiempo suficiente como para llevar a cabo acciones secuenciales.
- La memoria a largo plazo declarativa está compuesta por todos los datos que uno ha aprendido. El acceso a esta memoria es consciente y es dependiente de áreas cerebrales como el hipocampo (Squire, 1992). Tulving establece, dentro de este tipo de memoria, una distinción entre la memoria episódica (memoria de las experiencias personales) que es de naturaleza autobiográfica, y la memoria semántica (memoria de los hechos) que comprende el conocimiento general del mundo y puede ser verbal o visual (Tulving, 2002).
- La memoria a largo plazo no declarativa o procedimental es probablemente la más duradera. Se trata de los hábitos, o habilidades que son aprendidas por repetición. El acceso a esta memoria es inconsciente. En ella se incluye una colección heterogénea de habilidades que no requieren de la participación del hipocampo, pero sí de otras estructuras como el neocórtex en el caso de los hábitos y destrezas motoras, el cerebelo en el condicionamiento de la musculatura esquelética, la amígdala en el condicionamiento emocional y la neocórtex posterior (Passig, 1994).

Una cuestión que se puede plantear es cómo se transforma la memoria de corto plazo, que abarca de minutos a horas, en una memoria de largo plazo que puede durar días, semanas e incluso toda la vida. La primera sólo requiere modificaciones covalentes de las proteínas preexistentes mientras que la memoria a largo plazo, más estable, necesita crecimiento y formación de

nuevas sinápsis que requiere expresión de genes y formación de nuevas proteínas (Bailey et al., 1996).

En lo referente a la memoria a corto plazo, un estímulo que la desencadena provoca el aumento de AMPc por medio de la activación de la AC. A su vez, este AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) la cual potencia la salida de mediadores: se cierran los canales de potasio y se amplía el potencial de acción, debido a esto se potencia el flujo de Ca^{2+} necesario para la exocitosis de moléculas importantes para la formación de memoria (Byrne and Kandel, 1996). Con un estímulo repetitivo o prolongado se produce la memoria a largo plazo. En este caso, la subunidad catalítica de PKA activada se trasloca al núcleo y allí fosforila a CREB que activa genes de respuesta inmediata, para dar lugar a la generación de nuevas conexiones sinápticas (Bailey et al., 1996; Martin et al., 1997).

Concretamente en hipocampo, principal área cerebral donde se almacena la memoria declarativa en mamíferos, cuando se produce una estimulación de frecuencia alta, sucede un incremento de la eficacia sináptica que puede durar horas o días, esto se denomina potenciación a largo plazo (PLP). La PLP también posee una fase temprana que no requiere síntesis de proteínas y una tardía que si requiere, basándose en mecanismos moleculares similares de la memoria a largo plazo (PKA-CREB) (Bailey et al., 1996; Kandel, 2001). Experimentos en torno a este asunto han concluido que la PLP requiere a) activación de la sinapsis, y b) despolarización de la membrana postsináptica. Se sabe que la PLP se puede iniciar por activación de los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA), receptores de glutamato (Morris et al., 1986; Watkins and Jane, 2006). El receptor NMDA se encuentra principalmente a lo largo de la formación hipocampal y controla la abertura de canales de Ca^{2+} que, habitualmente, se encuentran bloqueados por iones Mg^{2+} (Malenka et al., 1988). La elevación del Ca^{2+} en el interior celular induce la activación de la Ca^{2+} /calmodulina quinasa II (CAMKII) y de la proteína quinasa C (PKC) (Malinow et al., 1989), además de inducir la activación de otras quinasas como la PKA y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK). Estas quinasas pueden fosforilar a AMPA (otro receptor de glutamato) aumentando la

sensibilidad al glutamato, lo cual contribuye al mantenimiento de la PLP (Kauer et al., 1988).

Se puede decir que la memoria pasa a ser duradera cuando se produce la síntesis de proteínas, este proceso se conoce como consolidación, y con él las modificaciones que se generan por lo aprendido pasan a ser estables (McGaugh, 2000). Durante años los investigadores pensaron que una vez consolidada la memoria pasaba a ser resistente a cambios posteriores, pero se sabe que no es así, varios estudios demuestran que cuando la memoria es reactivada, es de nuevo lábil y necesita para su mantenimiento síntesis de nuevas proteínas, (Koh and Bernstein, 2003; Lee et al., 2004; Morris et al., 2006; Nader et al., 2000; Rossato et al., 2006) este proceso se conoce como reconsolidación. Sin embargo, otros estudios muestran que no es necesaria la síntesis de proteínas para la reconsolidación (Bahar et al., 2004; Hernandez et al., 2002), en áreas como la amígdala y NAc.

Así, la reactivación de la memoria presenta una oportunidad para modificaciones adaptativas, puede dar lugar a cambios plásticos en la intensidad de memoria o mantener la relevancia de un recuerdo en la orientación de una conducta futura (Lee, 2009).

Sin embargo, existe controversia sobre si la consolidación y la reconsolidación comparten mecanismos moleculares, (Bozon et al., 2003; Kida et al., 2002; Lee et al., 2004). En general parece que los mecanismos que median consolidación y reconsolidación son los mismos que median la memoria a largo plazo (Alberini, 2005), y que sobre todo dependen del área estudiada y del tipo de memoria.

4.1 Hipocampo

El hipocampo es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica en el interior del lóbulo temporal, se curva a lo largo del ventrículo lateral y forma parte del sistema límbico, la parte emocional del cerebro.

El hipocampo juega un papel fundamental en la memoria, ejerce una función determinante en el almacenamiento de la información nueva antes de que ésta se consolide (Squire, 1992). Una vez procesada, la información llega al hipocampo, donde se mantiene activa durante un periodo de tiempo. Durante ese tiempo, el hipocampo establece una relación bidireccional con distintas regiones de la corteza, como la corteza auditiva o la visual. Estas conexiones bidireccionales son las que constituyen el proceso de consolidación. Para ello, se requieren interacciones complejas entre las diferentes zonas de procesamiento cerebral, especialmente entre la neocorteza y el denominado lóbulo temporal medial, que incluye la formación hipocámpal y las cortezas parahipocámpal y perirrinal adyacentes.

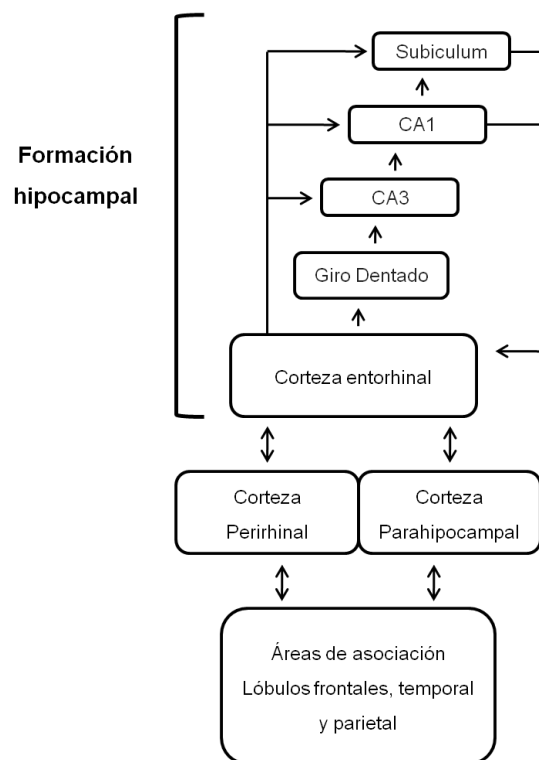


Figura 2: Esquema de las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria. (Adaptado de Squire and Zola, 1996).

La formación hipocámpal se localiza en el lóbulo temporal e incluye el subiculum, el hipocampo y la corteza entorhinal (Squire and Zola, 1996).

El principal tipo celular del hipocampo es una neurona piramidal que se agrupa en capas bien definidas morfológicamente. Existen además neuronas no piramidales que se distribuyen por todos los estratos y que son interneuronas de los circuitos locales hipocámpicos.

El hipocampo se encuentra dividido en varias áreas, de entre ellas podemos citar la CA1 y CA3. La CA1 es el área de mayor tamaño en humanos. El área CA3 está formada por células piramidales que presentan un amplio árbol dendrítico, dirigiéndose hacia el giro dentado, centro del hipocampo. En estas dendritas se encuentran numerosas espinas dendríticas que reciben inervación de terminales excitadoras. Es importante recordar que una mayor presencia de espinas dendríticas es sinónimo de mayor número de sinapsis, es decir, de aprendizaje.

La información fluye hacia lo largo del hipocampo por medio de 3 vías principales. La vía perforante que circula desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado. La vía de las fibras musgosas que va de las células granulares del giro dentado a las células piramidales de la región CA3 del hipocampo. Y la vía colateral de Schaffer donde los axones de las células piramidales de la CA3 emiten ramificaciones colaterales, llamadas ramificaciones colaterales de Schaffer, que inervan a las células piramidales de CA1 (Figura 3).

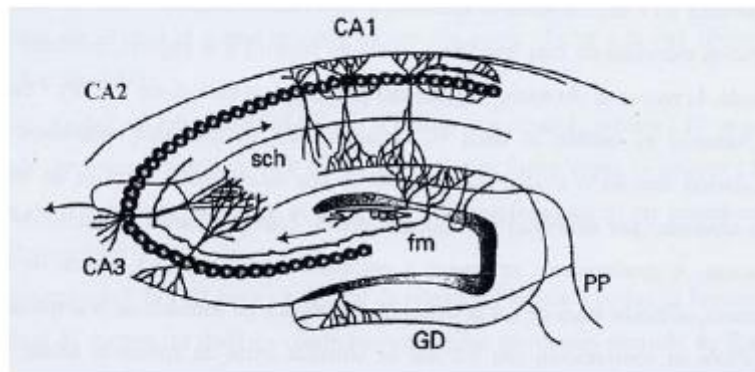


Figura 3: Diagrama básico del circuito hipocampal. PP: vía perforante; GD: giro dentado, fm: fibras musgosas, sch: fibras colaterales de Schaeffer

Al lado de la formación hipocámpica se encuentra el núcleo amigdalino, que tiene que ver con las respuestas motoras relacionadas con el instinto. Además tiene relación con las conductas y emociones; y con el sistema límbico.

Se ha demostrado que el hipocampo es una región fundamental para la orientación espacial, tanto en humanos como en animales (es más, contiene un

tipo de neuronas de lugar que responden ante cada localización específica), y además también participa en procesos de asociación (Broadbent, 2004).

4.2 Corteza frontal

En términos anatómicos, la corteza prefrontal es la región cerebral de integración por excelencia, gracias a la información que envía y recibe de todos los sistemas sensoriales y motores. La corteza prefrontal incluye casi una cuarta parte de toda la corteza cerebral y se localiza en las superficies lateral, medial e inferior del lóbulo frontal. Se hace referencia a ella como corteza de asociación frontal, y se subdivide funcionalmente en corteza prefrontal dorsolateral y corteza orbitofrontal (Stern and Prohaska, 1996). La corteza orbitofrontal se ha asociado con las funciones cognitivas empleadas en el manejo del conocimiento social. Sin embargo, la corteza prefrontal dorsolateral, se relaciona más con área asociativa (Vendrell et al., 1995). Pese a que desde el punto de vista teórico la corteza prefrontal dorsolateral y la corteza orbitofrontal se describen como sistemas funcionales independientes, no debemos olvidar que ambas regiones forman parte de un único sistema que, en condiciones normales, trabaja de forma coordinada (Tirapu-Ustarroz and Munoz-Cespedes, 2005).

Desde el punto de vista neuroanatómico, se han descrito diferentes circuitos funcionales dentro de la corteza prefrontal. Por un lado, el circuito dorsolateral se relacionado principalmente con actividades puramente cognitivas como la memoria de trabajo (Bechara et al., 2000; Courtney et al., 1998), la atención selectiva, la formación de conceptos o la flexibilidad cognitiva. Por otro lado, el circuito ventromedial se asocia con el procesamiento de señales emocionales que guían nuestra toma de decisiones hacia objetivos basados en el juicio social y ético.

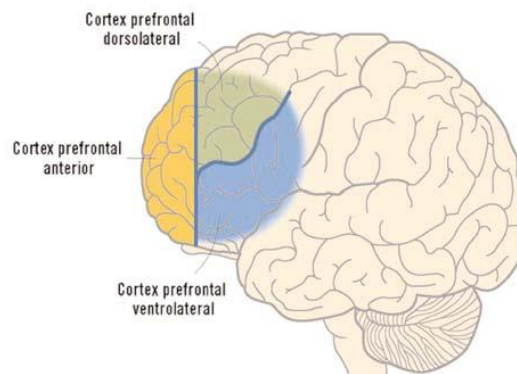


Figura 4: Esquema general de la corteza prefrontal (Adaptado de Tirapu-Ustarroz and Munoz-Cespedes, 2005)

En relación a la memoria, la corteza frontal tiene un papel fundamental en la organización, búsqueda, selección y verificación del recuerdo de la información almacenada (Shimamura, 2000), es decir, está más relacionada con el funcionamiento que con los contenidos de ésta, además dota de inteligencia y orienta hacia la emisión de conductas adaptativas a la información contenida en el hipocampo. Por otra parte, estudios de neuroimagen han indicado que la corteza cerebral también puede estar involucrada en la formación de la memoria (Buckner et al., 1999). De hecho, han sido descritas interacciones entre el área CA1 del hipocampo y una zona de la corteza frontal durante la codificación y la recuperación de memoria espacial (Churchwell et al., 2010). Esta idea es corroborada ya que además, se ha demostrado que el papel del hipocampo disminuye, cuando se requiere la expresión de la memoria remota aumentado el de la corteza prefrontal (Anagnostaras et al., 2001; Takehara et al., 2003), aunque una vez reactivada podría ser de nuevo dependiente de hipocampo (Debiec et al., 2002).

4.3 Memoria y aprendizaje y drogas

Tanto el hipocampo como la corteza frontal están implicadas en un número de funciones cognitivas muy importantes (Della-Maggiore et al., 2000; Seamans et al., 1998), pero también están relacionadas con el desarrollo de patologías como la adicción a drogas de abuso. Así el hipocampo está implicado en la iniciación y en el mantenimiento de la adicción a drogas (Eisch and Mandyam, 2004) y la corteza frontal está relacionada con la búsqueda de

drogas (Volkow et al., 2003). Además, ha sido ampliamente descrito que la función de la corteza frontal está dañada por el consumo continuado de drogas (Bolla et al., 2003; Ernst et al., 2002; Kosten et al., 2006).

Al igual que ocurre con otras drogas, se sabe que la adicción a cocaína se debe a neuroadaptaciones en los procesos de aprendizaje y memoria relacionadas con la recompensa (Everitt and Robbins, 2005; Nestler, 2002; Wolf et al., 2004). Se puede decir que la adicción representa una usurpación de mecanismos neurales de aprendizaje y memoria bajo circunstancias normales (Hyman, 2005). Es más, existen estudios que revelan similitudes entre las acciones de las drogas y los procesos fisiológicos de aprendizaje y memoria (Chao and Nestler, 2004; Hyman and Malenka, 2001; Kelley, 2004; Nestler, 2002). Este aprendizaje es más fuerte en el comportamiento de búsqueda de drogas, por ello en períodos de abstinencia, la recaída depende sobre todo de la recuperación de la memoria asociada a la droga aunque la droga no esté presente.

Un hecho importante es que la cocaína también intensifica la PLP, hecho demostrado por Ungless et al (Ungless et al., 2001). Y aunque los mecanismos por los cuales la cocaína pueden inducir este efecto no se conocen bien, podría deberse a que la DA, aumentada por la acción de la cocaína media la inhibición de depresión a largo plazo (DLP).

La cocaína modifica el comportamiento de búsqueda de drogas con el fin de facilitarlos, y éste se produce por medio del aprendizaje de estímulos condicionados a la droga (Kelley et al., 2007; Ramirez et al., 2009; Théberge et al., 2010). Más concretamente, la cocaína podría modificar la memoria establecida en el momento de la reconsolidación (Lee et al., 2005; Miller and Marshall, 2005). Sin embargo, todavía existen bastantes incógnitas sobre como la cocaína interacciona con los procesos de memoria y aprendizaje, y por ello resulta también interesante conocer el efecto de esta droga sobre otro tipo de memoria no tan íntimamente relacionado con la droga, como es la memoria espacial.

4.4 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB)

El elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB) es uno de los factores de transcripción que está unido como dímero al elemento de respuesta del AMPc (CRE), una secuencia específica del ADN. El sitio CRE se encuentra en el interior de las regiones reguladoras (promotoras o potenciadoras) de numerosos genes. Si un promotor contiene CRE, entonces el gen podría estar sujeto a la regulación mediado por CREB, dependiendo de múltiples factores específicos del tejido, incluyendo la conformación de la cromatina cercana. Tradicionalmente, se ha pensado que los dímeros de CREB estaban unidos a su sitio CRE en condiciones basales, pero en la actualidad se sabe que están inactivos. Según este punto de vista, eventos en la membrana neuronal, los cuales estimulan la cascada de señalización intracelular, causan la fosforilación de ambos miembros del dímero de CREB e inician su actividad transcripcional (Mayr and Montminy, 2001). CREB es activo cuando se fosforila en la serina 133 por la PKA dependiente de AMPc, y se transforma en fosfo-CREB (pCREB). CREB también es fosforilado en esta misma serina por otras quinasas como la calmodulina dependiente de Ca^{2+} IV (CaMIV) y ERK (Kasahara et al., 2001; Lu et al., 2006). Como se puede deducir existen numerosas rutas de señalización intracelular (Figura 5) involucradas en la transmisión de información desde el receptor de membrana que media su acción hasta el núcleo, donde interactúan con CREB para provocar procesos que culminan en la transcripción de genes. Los efectores de las rutas de señalización implican a la AC, Ca^{2+} y MAPK (roteína quinasa activada por mitogenes).

La proteína CREB se expresa en todas las células del cerebro, actuando como factor de transcripción. Este tipo de factores de transcripción, son cruciales para integrar estímulos que se reciben en la membrana celular por medio de receptores hacia modificaciones en la expresión de genes. Por esta razón la alteración de la expresión génica por esta proteína, puede afectar a la función de neuronas individuales y a circuitos neuronales (Carlezon et al., 1998).

Es sabido que CREB es un factor de transcripción muy versátil, dado que regula numerosos genes implicados en diferentes funciones en el SNC, entre los que destacan cFos (Sheng et al., 1990), dinorfina (Carlezon et al., 1998), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (McCarthy et al., 2012; Tao et al., 1998), GluR1 receptor de glutamato (Borges and Dingledine, 2001), y otros genes.

Como ya se ha citado anteriormente, CREB es una proteína decisiva para el almacenamiento de memoria (Bailey et al., 1996; Kandel, 2001; Mizuno et al., 2002). Aunque el aprendizaje y la memoria tienen un papel muy importante en la adicción, CREB también influye en otros procesos de esta enfermedad (Blendy and Maldonado, 1998). Por ejemplo, se sabe que tras el consumo de cocaína la activación de CREB aumenta en el NAc mediando tolerancia de los efectos reforzantes de esta droga (Carlezon et al., 1998; Mattson et al., 2005; McClung and Nestler, 2003; Nestler, 2001). Además, Self (1998) demostraron que un incremento de la fosforilación de CREB dentro del NAc reduce los efectos reforzantes de la cocaína, mientras que una inhibición tiene efectos opuestos (Self et al., 1998). El aumento de pCREB se podría inducir después de un consumo de cocaína (Marin et al., 2009), debido al aumento de DA producido por la cocaína en la hendidura sináptica, aumentando por lo tanto, la activación de los receptores D1 y como última consecuencia el aumento de pCREB. Además los receptores D1 juegan un papel importante en la PLP y la formación de memoria (El-Ghundi et al., 2007).

Referente a otras drogas, también se ha documentado un aumento de pCREB en NAc, pero en este caso CREB es necesaria para los efectos reforzantes de las mismas (Terwilliger et al., 1991; Walters et al., 2005). Sin embargo en el caso del alcohol pCREB no aumenta en el NAc (Pandey et al., 2004).

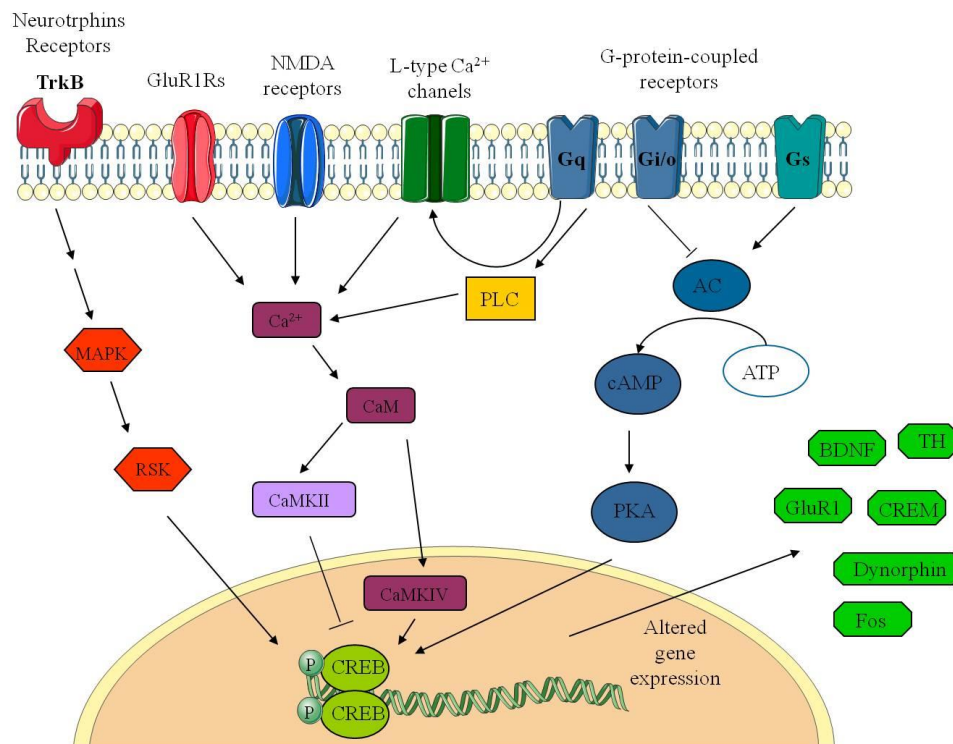


Figura 5: Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB. (Adaptado de Carlezon et al., 2005 (Carlezon et al., 2005).

4.5 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

BDNF es un miembro de la familia del grupo de cisteínas. Las proteínas pertenecientes a esta familia pertenecen a sustancias neurotróficas, entre ellas destaca: el factor de crecimiento neural (NGF), neurotrofina 3 (NT-3) y NT4/5 en mamíferos. BDNF es la neurotrofina más expresada en el SNC, está junto con NT-4, presente en hipocampo, cerebelo y corteza. Es un factor angiogénico, y relacionado con la respuesta vascular y hemodinámica del etanol. BDNF puede estar producido por astrocitos bajo condiciones patológicas (Juric et al., 2006; Zafra et al., 1992), por plaquetas (Karege et al., 2002), por linfocitos (Krause et al., 2008) y por el endotelio vascular.

Las neurotrofinas inician su señalización por la unión a receptores de baja (p75) o de alta afinidad (receptor tirosina quinasa B, TrkB). BDNF en concreto, se une específicamente a TrkB lo que provoca una dimerización del receptor, posteriormente una autofosforilación en un residuo de tirosina y la activación de varias cascadas diferentes, ya que se produce su unión a proteínas

adaptadoras, “Growth factor receptor-bound protein 2” (Grb2) y SOS. Estas proteínas interactúan con la proteína Ras, provocando la activación de MAPK (Poo, 2001; Reichardt, 2006). También se activan otras cascadas de señalización como la ruta que se inicia con la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la ruta de la fosfolipasa C γ (PLC) (Atwal et al., 2000).

La ruta de señalización más importante activada es la MAPK, que lleva a la activación de ERK, principal efector de BDNF. Además, una de las proteínas activadas por ERK es CREB, estableciéndose por tanto una relación estrecha entre BDNF y CREB. De hecho, como ya se ha citado anteriormente BDNF también está regulado por el factor de transcripción CREB (McCarthy et al., 2012; Tao et al., 1998).

Numerosas investigaciones sugieren que BDNF y sus rutas de señalización están implicadas en gran cantidad de funciones. Participan en la diferenciación y supervivencia del sistema dopaminérgico (Thoenen, 1995) y además también son importantes en la modulación de la plasticidad neuronal (Lee et al., 2004). De hecho, BDNF está implicada en el crecimiento de neuritas, y regulación de la morfología dendrítica (Kuczewski et al., 2009; Poo, 2001). Como ya hemos citado, tanto el sistema dopaminérgico como los procesos de aprendizaje y memoria se modifican por el consumo continuado de cocaína. De hecho se sabe que BDNF está implicada en los cambios neuroadaptativos del sistema dopaminérgico y glutamatérgico provocado por el consumo de drogas psicoestimulantes (Altar et al., 1992; Grimm et al., 2003; Pierce et al., 1999).

BDNF también participa en otras funciones en relación al consumo de cocaína, habiéndose documentado que después de la administración de cocaína y periodos de abstinencia, BDNF incrementa en diferentes áreas del cerebro (Graham et al., 2007; Grimm et al., 2003). En la corteza prefrontal se ha descrito que BDNF aumenta después del consumo de cocaína sin periodos de abstinencia (Fumagalli et al., 2007; Lu et al., 2010). El incremento de BDNF se puede considerar como una estrategia defensiva frente a los efectos nocivos de la cocaína (Fumagalli et al., 2009), o como una reacción compensatoria para disminuir la eficacia de refuerzo de la cocaína (Sadri-Vakili et al., 2010). En relación con esta idea, recientes estudios indican que la administración

exógena de BDNF en la corteza prefrontal suprime el restablecimiento del comportamiento de búsqueda de drogas (Berglind et al., 2007; Berglind et al., 2009; McGinty et al., 2010). Estos efectos pueden desarrollarse por efectores de BDNF como el neuropeptido Y y la dinorfina, ya que estas proteínas favorecen la atenuación de los efectos de las drogas adictivas (Croll et al., 1994).

BDNF también puede facilitar el desarrollo de la sensibilización a cocaína, ya que según Horger (1999) animales tratados con BDNF incrementan la actividad locomotora después de la administración de cocaína (Horger et al., 1999).

En resumen, esta neurotrofina participa de forma muy variada en la adicción a cocaína, y por ello, es una proteína clave a estudiar.

5. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB)

La familia del factor nuclear kappa B (NF- κ B) o familia Rel, se expresa en las células de mamíferos y está altamente conservada a través de las especies. En mamíferos, esta familia está formada por 5 miembros: p50 (producto de la proteína NF κ B1 o p105), p52 (producto de la proteína NF κ B2 o p100), p65 (también conocido como RelA), c-Rel y RelB. Los miembros de la familia Rel funcionan como dímeros, y las 5 subunidades pueden formar homodímeros o heterodímeros.

Todos los miembros de la familia tienen un dominio homólogo Rel, que contiene las regiones funcionales cruciales para este factor: región de unión al ADN, de dimerización, de localización nuclear y de interacción con las proteínas inhibitorias I κ B, que enmascaran los dominios de localización nuclear y de unión al ADN (Baeuerle and Henkel, 1994). Los dímeros de NF- κ B formados se localizan en forma latente en el citoplasma unida a la proteína inhibitoria I κ B (Malek et al., 2001).

Por otro lado, I κ B constituye otra familia evolutivamente conservada compuesta por I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B ζ , Bcl-3, y los precursores de p50 y p52, p105 y p100, respectivamente (Malek et al., 2001).

La activación de NF- κ B se produce por dos vías principalmente. La primera de ellas es la ruta canónica, se inicia ante la llegada de un estímulo a la célula y se produce la activación del complejo I κ B quinasa (IKK), compuesto por dos subunidades catalíticas, IKK1/ α y IKK2/ β , y una subunidad reguladora NEMO/IKK γ . Este complejo fosforila a las I κ Bs en dos serinas, provocando su poliubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de 26S. El dímero de NF- κ B queda libre pudiéndose traslocar al núcleo por medio de la interacción con transportadores núcleo-citoplasma (carioferinas). Ya en el núcleo, el factor de transcripción se une a κ B lugares con una secuencia consenso presentes en promotores y potenciadores de los genes dianas, para regular la transcripción de estos genes (Figura 6). El heterodímero que se activa principalmente por medio de esta ruta es el formado por las subunidades p65/p50. También es sabido que el complejo IKK puede fosforilar directamente a la subunidad p65 aumentando su capacidad de transactivación (Iwai and Tokunaga, 2009).

La ruta alternativa o no canónica comienza por la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteasoma de las proteínas precursoras p105 y p100. El procesamiento en el proteasoma de estas proteínas genera las subunidades maduras p50 y p52 respectivamente, las cuales pueden unirse a RelB y formar heterodímeros que se traslocan al núcleo y regulan la transcripción de una serie de genes. Esta ruta alternativa tiene lugar mayoritariamente en el sistema inmune (Bonizzi and Karin, 2004).

Entre los genes diana de NF- κ B se encuentran miembros de la familia I κ B indicando que NF- κ B limita su propia activación. Así el I κ B sintetizado entra en el núcleo y separa el NF- κ B de su sitio de unión al ADN (Zabel and Baeuerle, 1990; Zabel et al., 1993).

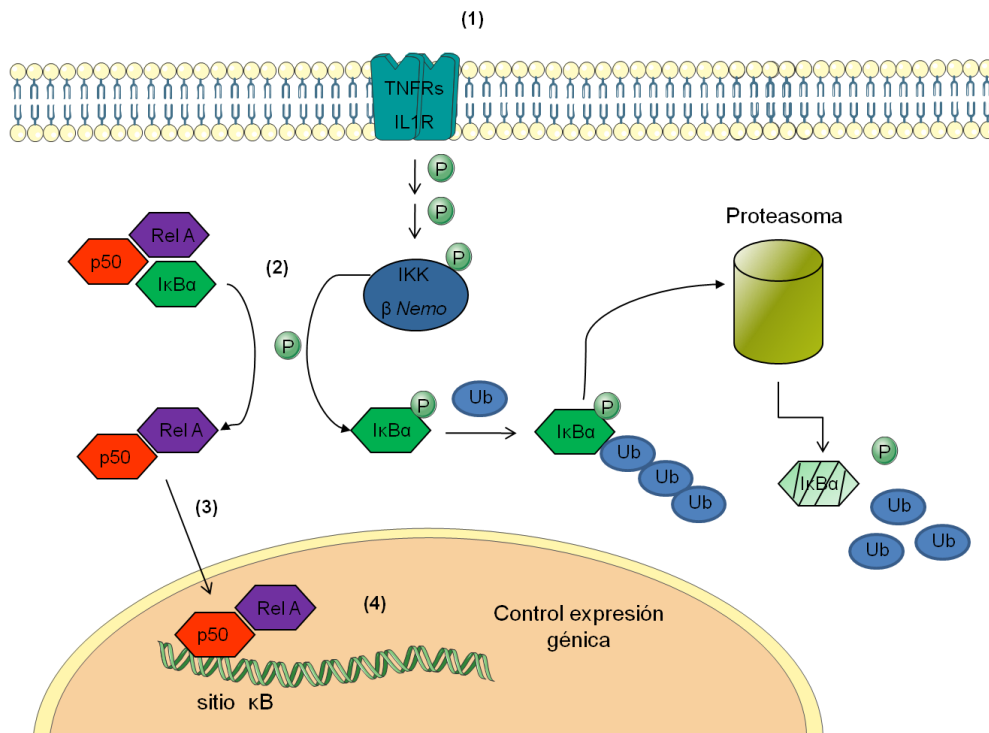


Figura 6: Ruta de señales de NF-κB. Diferentes estímulos pueden inducir la activación por la vía canónica de NF-κB por activación de IκB quinasa (1), la cual fosforila a IκB (2), y la marca para su ubiquitinación. El NF-κB libre se trasloca al núcleo (3) y activa la expresión de genes (4). (Adaptado de Lorenzo et al., 2011).

5.1 Funciones

NF-κB es activado por estímulos de diversa naturaleza, destacan las citoquinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), quemoquinas, lipopolisacárido (LPS), virus como el VIH (Rattner et al., 1993), las especies reactivas de oxígeno también están involucradas en la activación de este factor de transcripción (Schmidt et al., 1995), entre otras. En la activación también influye el tipo de dímero NF-κB, de los estímulos que recibe y del tipo celular donde se encuentra.

El NF-κB es conocido como mediador central de la respuesta inmune humana. Así muchos patógenos inducen activación de NF-κB y la mayoría de los genes inducidos por este factor de transcripción participan en la respuesta inmune (Pahl, 1999).

Por otro lado, el NF- κ B también regula respuestas a estrés oxidativo (Schreck et al., 1992), se ha observado que la activación de NF- κ B induce una variedad de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Madrigal et al., 2001; Pahl, 1999).

El factor de transcripción NF- κ B también participa en el proceso de muerte celular programada, teniendo efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Barkett and Gilmore, 1999; Blondeau et al., 2001; Brambilla et al., 2005; Fridmacher et al., 2003; Middleton et al., 2000), de hecho se sabe que la promoción o la protección de la muerte celular programada depende del tipo y duración del estímulo, así como del tipo de célula (Clemens et al., 1997).

También se ha estudiado el papel de NF- κ B durante el desarrollo embrionario, incluyendo el sistema nervioso, observándose que también participa en el desarrollo de las primeras etapas de la vida. Por ejemplo, se ha observado un papel conservado en el establecimiento de la polaridad dorso-ventral de *Drosophila* (Hoch and Jackle, 1993).

5.2 NF- κ B en el sistema nervioso central

NF- κ B puede encontrarse en el SNC y periférico, donde también ejerce un papel importante (Nickols et al., 2003). Cómo en otros órganos NF- κ B se puede encontrar en todos los tipos de celulares del SNC incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos (O'Neill and Kaltschmidt, 1997). Otro dato interesante es que algunas subunidades de NF- κ B están involucradas en la neurogénesis (Denis-Donini et al., 2008).

Dentro del sistema nervioso la cascada de activación de la ruta canónica está muy conservada. La principal forma activa de NF- κ B en el sistema nervioso es el heterodímero p65/p50 (Guerrini et al., 1995; Kaltschmidt et al., 1993), siendo esta también el dímero más importante dentro de las sinapsis, ya que ratones deficientes de p65 carecen de NF- κ B en estas estructuras (Meffert et al., 2003).

Al igual que en otras localizaciones, el NF- κ B en el SNC se puede activar por estímulos característicos de la respuesta inmune. Estos estímulos incluyen citoquinas, aumento de estrés oxidativo o infecciones virales (Meffert and Baltimore, 2005). Sin embargo se sabe que el factor de transcripción NF- κ B también se puede activar por estímulos más específicos del sistema nervioso, como la proteína β -amiloide (Behl et al., 1994), la molécula de adhesión neuronal (N-CAM) (Krushel et al., 1999), la privación del sueño (Chen et al., 1999). Igualmente, se ha documentado que NF- κ B se puede activar por la propia transmisión sináptica y de hecho, se ha observado que el neurotransmisor excitatorio glutamato activa NF- κ B en neuronas granulares cerebelares (Guerrini et al., 1995; Meffert et al., 2003), también se activa por medio del ión Ca^{2+} , así como NF- κ B puede ser regulado por otros neurotransmisores como la DA (Luo et al., 1999; Takeuchi and Fukunaga, 2004).

De entre los genes que se sabe que regula NF- κ B en el SNC ya hemos nombrado anteriormente a los involucrados de alguna forma con el estrés oxidativo, pero además de estos encontramos otros con funciones muy diversas, como PKAc alfa (Kaltschmidt et al., 2006), N-CAM, el precursor β amiloide (APP) (Grilli et al., 1995), BDNF (Lipsky et al., 2001), y el receptor μ -opioide (Kraus et al., 2003) entre otros.

Como se observa NF- κ B se asocia con el funcionamiento normal del SNC, pero también está implicado en procesos patológicos, prueba de ello es la asociación de NF- κ B con enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson (Hunot et al., 1997), el Alzheimer (Guo et al., 1998) y la enfermedad de Huntington (Khoshnan et al., 2004).

Por todo ello, en los últimos años NF- κ B se está convirtiendo en una pieza clave para entender la gran complejidad del sistema nervioso.

5.2.1 Relación de NF- κ B con el aprendizaje y la memoria

NF- κ B está implicado en la función fisiológica del SNC, tanto a nivel celular y comportamental. Como hemos nombrado anteriormente, participa en la

regulación de la transmisión sináptica y por lo tanto en la plasticidad. De hecho, NF- κ B puede regular (negativamente o positivamente) la expresión de genes que gobiernan cambios en la plasticidad sináptica y en las funciones cognitivas (West et al., 2002).

5.2.2 NF- κ B y drogas de abuso

Los mecanismos celulares y moleculares inducidos por las drogas de abuso inducen neurotoxicidad. Esto puede implicar alteraciones en el estatus redox, inducción de respuestas inflamatorias y en última instancia provocar muerte celular. Dado que el NF- κ B está implicado en todos estos procesos, es interesante estudiar, la relación entre las drogas de abuso y la activación de NF- κ B. De hecho, ya existen algunos estudios que muestran que el etanol incrementa la actividad del NF- κ B en células astrogiales humanas (Davis and Syapina, 2004). Igualmente, se ha encontrado una relación entre NFKB1 (gen que codifica para la subunidad de NF- κ B p50) y la dependencia a alcohol (Edenberg et al., 2008). Otros estudios muestran que el NF- κ B está implicado en el desarrollo de dependencia a opiáceos y en la aparición del síndrome de abstinencia, por lo que podría ser usado como diana farmacológica para el tratamiento de la adicción a opiáceos (Rehni et al., 2008). En cuanto a la metanfenamina se ha observado que genera radicales libres (RL) en el estriado y que esto induce activación de NF- κ B (Asanuma and Cadet, 1998).

En el caso de la cocaína se ha demostrado que el NF- κ B se activa en el NAc tras su administración, pero no existen prácticamente estudios que expliquen los mecanismos por los cuales puede estar actuando este factor de transcripción (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009). Además también se ha observado que el NF- κ B puede participar en los efectos tóxicos de la cocaína, por ejemplo se ha descrito que regula algunos genes relacionados con la muerte celular inducidos por la cocaína (Lepsch et al., 2009; Novikova et al., 2005).

Por último, el NF- κ B también se relaciona con algunos neurotransmisores, como ya hemos nombrado anteriormente. De hecho, la actividad de NF- κ B se modula positivamente por los receptores D2 de DA y a su vez el NF- κ B también

regula la señalización a través del glutamato (neurotransmisor excitatorio) y a GABA (neurotransmisor inhibitorio) (Furukawa and Mattson, 1998; Takeuchi and Fukunaga, 2004). Esto significa que NF- κ B podría ser un modulador de la homeostasis entre la función neuronal inhibitoria y la excitatoria, balance que se sabe que resulta dañado en la adicción a cocaína.

6. ESTRÉS OXIDATIVO

Se sabe que las drogas inducen neurotoxicidad, y esto puede implicar alteraciones en el estatus redox, inducción de respuestas inflamatorias y en última instancia provocar muerte celular. Así, uno de los mecanismos de neurotoxicidad que se postula es el aumento de estrés oxidativo a nivel celular.

Dado que el cerebro es un tejido especialmente susceptible al ataque de agentes oxidantes, al presentar un elevado consumo de oxígeno y un gran contenido en sustratos fácilmente oxidables (Nordmann, 1994), no es de extrañar que se hayan descrito reacciones con RL en la fisiopatología de varios procesos que afectan al SNC, como la enfermedad de Parkinson (Adams et al., 1991; Danielson and Andersen, 2008), la enfermedad de Alzheimer (Adams et al., 1991; Cenini et al., 2008), la epilepsia postraumática (Mori et al., 1990), y la isquemia cerebral (Braugher and Hall, 1989), entre otros. Igualmente, hay que destacar que varios investigadores han relacionado los efectos neurotóxicos de las drogas de abuso con el estrés oxidativo (Almansa et al., 2009; Herrera et al., 2003; Johnsen-Soriano et al., 2007; Miranda et al., 2007; Sulzer and Zecca, 2000).

El estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies and de Groot, 1992). La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los RL.

Los RL son todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los RL tienden a reaccionar ávidamente con otras

moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena.

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los RL proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido y el radical hidroxilo) por este motivo muchos autores los llaman especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas dos denominaciones no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales, como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso. Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a los RL, las ROS o los oxidantes.

6.1 Generación de radicales libres

Los RL proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de RL podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas and Blattna, 1986).
2. Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig and Babior, 1979).
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard et al., 1994).
4. La deslocalización de metales de transición (Fe^{2+} y Cu^+) de sus sitios de depósito (Halliwell and Gutteridge, 1986).
5. La hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers et al., 1985).

6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman et al., 1990).

7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).

2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell and Gutteridge, 1986).

3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).

6.2 Papel fisiológico de los radicales libres

Se ha demostrado la función de los RL en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Al-Shabrawey et al., 2008; Hardy and Hunt, 2004; Satriano et al., 1993; Zimmerman et al., 2002). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, (Fillebeen and Pantopoulos, 2002; Minamiyama et al., 2007) o, contribuir a la regulación del proceso inflamatorio (Bourbon et al., 2004). Algunos RL también intervienen en los procesos de memoria y aprendizaje, ya que se ha descrito que son necesarios para la generación de una adecuada PLP (Klann, 1998). De hecho, cuando el receptor de glutamato, NMDA se activa, proceso que se produce durante la PLP, aumenta la cantidad de superóxido (Bindokas et al., 1996). Sin embargo, otros autores indican que la inducción de estrés oxidativo puede causar daños en la memoria y el aprendizaje (Farooqui, 2008).

6.3 Papel patogénico de los radicales libres

Los RL pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, por medio de los cuales pueden producir en último

término apoptosis y muerte neuronal (Li et al., 2002; Paravicini and Touyz, 2008; Gupta et al., 2007; Svensk et al., 2004; Torchinsky and Toder, 2007). Pueden inducir alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el ADN (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas).

Los RL se relaciona con un número elevado de enfermedades, entre otros, con la hipertensión (Touyz, 2004), la disfunción cardiovascular (Ramachandran et al., 2003), la inflamación (Telfer and Brock, 2004), y enfermedades como la diabetes (Arnal et al., 2010; Miranda et al., 2007; Miranda et al., 2004; Muriach et al., 2006), el SIDA (Jareño et al., 2002) etc.

6.4 Defensas antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell and Gutteridge, 1986). El término sustrato oxidable incluye casi toda macromolécula que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.

La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes (vitaminas C y E, glutatión, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa, llamadas así por inactivar directamente especies reactivas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies, 1991).

6.4.1 El sistema glutatión

Se denomina sistema glutatión, al conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister and Anderson, 1983). El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister and Anderson, 1983). Es el tiol no proteico más abundante en prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar por su función de protección frente a la toxicidad del oxígeno. Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower and Kosowe, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El GSSG es regenerado de nuevo a su forma reducida por medio de la glutatión reductasa NADPH dependiente, que es constitutivamente activa, por ello el GSH es la forma más abundante en la célula preparada para contrarrestar el estrés oxidativo (Ballatori et al., 2009).

El glutatión está relacionado con la actividad de diferentes enzimas, destacan:

-Actividad peroxidasa representada por tres enzimas:

1. Glutatión peroxidasa (GPx): es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua por oxidación del GSH. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de GPx. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima (Van Vleet et al., 1981).

2. Glutación transferasa con acción peroxidasa: Algunos isoenzimas de la glutación S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la GPx está disminuida mientras que la actividad glutación transferasa está aumentada (Scharmm et al., 1985).

3. Glutación peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos oxidados de membranas biológicas. Es un monómero y ha sido descubierto como una seleno enzima distinta de la clásica GPx basándose en su cDNA y secuencia aminoácida.

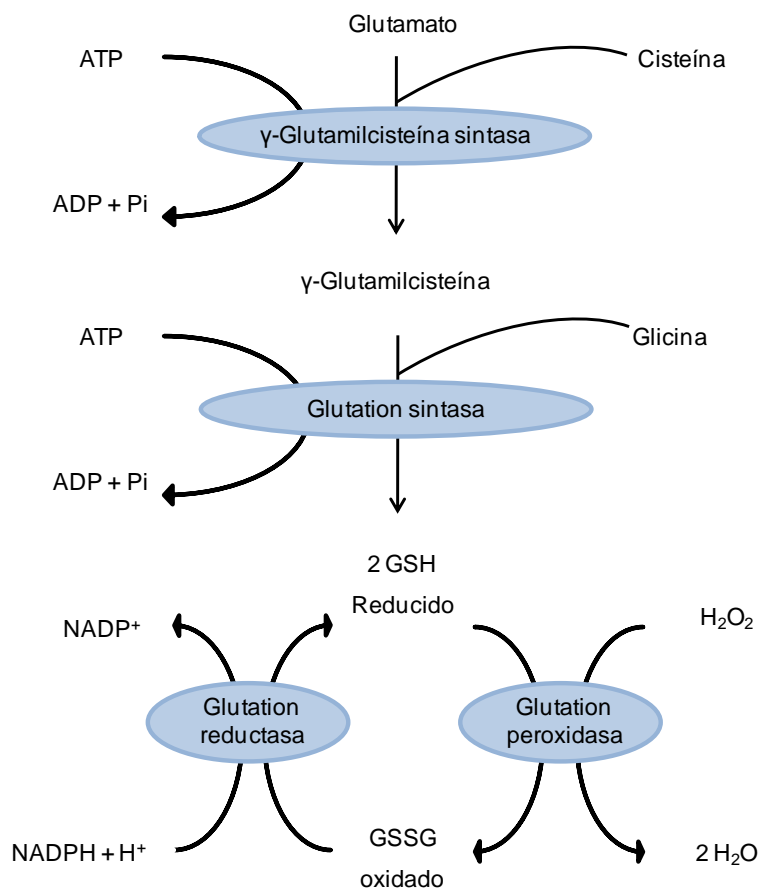


Figura 7: Esquema de la síntesis de glutación. (Adaptado de Massaad et al. 2011).

6.5 Sistema dopaminérgico y estrés oxidativo

Como consecuencia del consumo de cocaína se produce un aumento de DA libre en la hendidura sináptica. La actividad de este neurotransmisor se regula por dos mecanismos, en el primero de ellos la DA se reasimila en la neurona presináptica (70-80%), función que está bloqueada por la cocaína (Nestler, 2005), y el segundo es el metabolismo de la DA (Amara and Kuhar, 1993). La DA se metaboliza también por medio de dos mecanismos, el primero de ellos se produce intracelularmente por medio de una enzima mitocondrial, monoamina oxidasa (MAO), generándose H_2O_2 , y el segundo mecanismo es por medio de la autooxidación de DA generando anión superóxido y H_2O_2 (Hastings, 1995). Cuando se consume cocaína la DA se metaboliza principalmente por medio de la autooxidación generando gran cantidad de RL, pudiéndose inducir estrés oxidativo y muerte celular en las neuronas dopaminérgicas y neuronas adyacentes (Jones et al., 2000).

Debido a estos antecedentes, se puede pensar que el consumo de cocaína puede llevar consigo un aumento de estrés oxidativo y ser uno de los mecanismos por los cuales daña el SNC. De hecho, ha sido demostrado un cambio en las defensas antioxidantes (Dietrich et al., 2005; Macêdo et al., 2005; Muriach et al., 2010; Peraile et al., 2013; Uys et al., 2011; Pomierny-Chamiolo et al., 2013) y en RL (Bashkatova et al., 2006; Numa et al., 2011).

6.6 Muerte celular por apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular morfológicamente distinta que juega un papel central en la embriogénesis y en la homeostasis de los tejidos. Los cambios ultraestructurales que caracterizan a la apoptosis fueron descritos por primera vez por Kerr (1972), como condensación de la cromatina del núcleo, segmentación del núcleo y formación de burbujas en la membrana para finalmente dar lugar a la desintegración celular y a la formación de los cuerpos apoptóticos los cuales a su vez serán fagocitados por los macrófagos, sin pérdida alguna del contenido celular al exterior. La apoptosis provee al organismo de un método seguro para mantener la integridad de los tejidos,

permitiéndole eliminar las células dañadas o anormales sin comprometer a las células vecinas (Kerr et al., 1972).

La apoptosis puede subdividirse en tres etapas de señalización molecular diferentes: iniciación, activación de sistemas efectoros y de activación del sistema regulador.

La iniciación se vincula principalmente a la activación de la familia de proteínas relacionadas con la Bcl-2 reguladora de la apoptosis. Bcl-2 pertenece a una familia de productos genómicos que pueden actuar como proteínas inhibitoras de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1, Mcl-1 y A1) o con proteínas inductoras de apoptosis (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik y Hrk). Se unen a estas los factores de transcripción, tales como el NF- κ B, p53, c-Jun y c-Fos.

La etapa de activación del sistema de degradación de la apoptosis se caracteriza por la activación de una familia de proteasas, las caspasas, encargadas del desmantelamiento y ejecución celular. Las caspasas cortan gran variedad de polipéptidos intracelulares que incluyen elementos estructurales del citoplasma y del núcleo, componentes de la maquinaria de reparación del ADN y un gran número de proteínas cinasas. La detección de activación de las caspasas es otro de los criterios para implicar la apoptosis como mecanismos de muerte neuronal en tejido cerebral.

La muerte por apoptosis puede ocurrir como consecuencia de exposición a agentes físicos, a agentes tóxicos, por infección viral y otros mecanismos inmunológicos (Hockenbery et al., 1993; Maiese et al., 2007). Esta gran heterogeneidad de los promotores de la apoptosis sugiere que son muchos mecanismos que conducen a las células a la apoptosis.

6.6.1 Efectores de la apoptosis. Caspasas

En el mecanismo molecular que conduce a la apoptosis intervienen numerosos agentes, de los cuales uno de ellos es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la

formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN.

Como presentamos en la Figura 8, la activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en las que participan varios complejos moleculares (Santiago et al., 2006).

a) Vía extrínseca de apoptosis:

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el TNF.

b) Vía intrínseca de apoptosis o mitocondrial

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c.

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.

Una vez activado el apoptosoma, éste cliva a la procaspasa 3, activando la caspasa 3. Por otro lado a la salida de citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO la cual es inhibidor de los inhibidores de caspasas (IAPS) sale de la misma. Así se tiene una vía en la que la caspasa efectora está libre de actuar (dado que sus inhibidores fueron evitados por SMAC/DIABLO) y la apoptosis continúa de forma natural.

Apoptotic Signaling Pathways

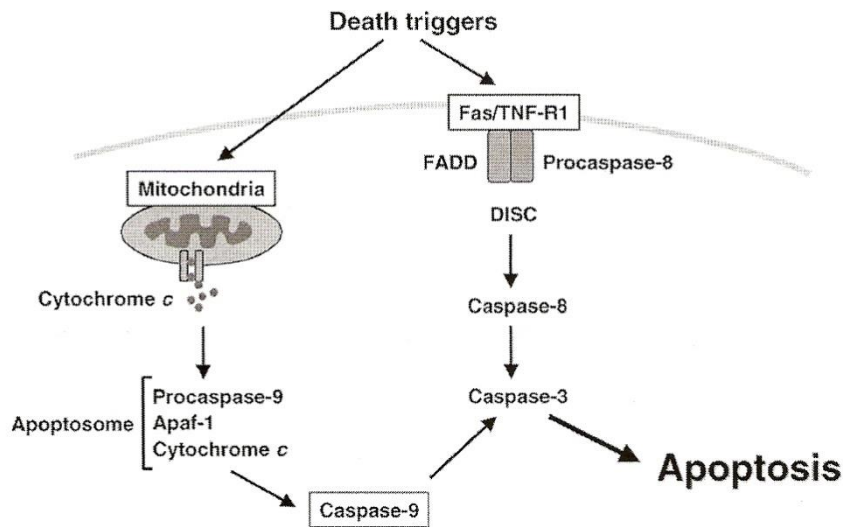


Figura 8: Esquema mostrando las dos principales vías que dan lugar a la apoptosis: la vía extrínseca a través de las proteínas TNF y FAS; y la vía intrínseca a través de la mitocondria y la liberación de citocromo-c.

Las caspasas están reguladas a nivel postraducciona, asegurando así que puedan ser activadas rápidamente. En un primer momento son sintetizadas como zimógenos inactivos (pro-caspasas) con su estructura clásica consistente en un prodominio, una subunidad pequeña y una subunidad grande. Estas moléculas responden a estímulos, ocasionando el agrupamiento de las caspasas iniciadoras, lo que les permite autoactivarse y así proceder a activar a las caspasas efectoras. Existen tres mecanismos generales de activación de caspasas (Zou et al., 1997):

1. Activación por otra caspasa: también conocida como cascada de caspasas. Es un método útil para amplificar e integrar las señales proapoptóticas, pero no pueden explicar cómo se activó la primera caspasa.
2. Activación inducida por proximidad: la caspasa-8 es la caspasa iniciadora clave en la vía de los receptores de muerte.
3. Asociación con una subunidad reguladora: el mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa-9. Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa-9 tiene un efecto mínimo en su activación. El requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con un cofactor de proteínas, Apaf-1. También es necesario el citocromo c liberado por la mitocondria. La activación de la

caspasa-9 es debida a un cambio conformacional, no a exclusivamente a la proteolisis.

La activación de la caspasa-3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre presente en otros marcadores en los que su presencia o ausencia no es determinante en el proceso de muerte celular programada (Moreno et al., 2000).

Por todo lo expuesto podemos concluir que la presencia de caspasa activadas, en último término de caspasa-3, sería un marcador fiable de apoptosis celular como se ha expuesto en diferentes trabajos. Ceccatelli et al, describieron como en secciones del SCN de ratones neonatales las neuronas morían por apoptosis vía activación de las caspasas y el proceso era inhibido por Bcl-2 (Ceccatelli et al., 2004).

6.6.2 Estrés oxidativo y apoptosis

Hoy en día existen numerosos estudios que relacionan la presencia de estrés oxidativo como mecanismo desencadenante de apoptosis vía mitocondrial. Annunziato (2003) en estudios con cultivos neuronales, afirmaban la implicación del estrés oxidativo como desencadenante de la cascada de caspasas, activando la caspasa-3 y dando lugar a una muerte por apoptosis independiente de concentraciones de Ca^{+2} (Annunziato et al., 2003). Donovan (2001), demostraron la presencia de RL como necesarios para contribuir a la muerte por apoptosis de fotorreceptores en cultivo, considerando a la caspasa-3 como el principal desencadenante de la apoptosis (Donovan et al., 2001) e inhibiéndose esta apoptosis por la administración de un antioxidante como el CR-6 (Sanvicens et al., 2004).

La relación entre caspasas y estrés oxidativo se evidencia por la localización de estas proteínas activadas en lugares de generación de RL como son la mitocondria y el retículo endoplásmico (Allsopp et al., 1993).

6.6.3 Apoptosis y drogas de abuso

La inducción de la muerte neuronal por medio de la apoptosis por algunas drogas de abuso ha sido ampliamente documentada. La muerte celular programada puede ocurrir por rutas diversas y la indentificación de estas rutas inducidas por las drogas de abuso puede ayudar a construir estrategias para la prevención de ese daño neuronal.

Así, por ejemplo, se ha documentado que tras el consumo crónico de alcohol se eleva el número de neuronas hipocampales que mueren por apoptosis (Herrera et al., 2003). Además, el alcohol también afecta a las neuronas durante el desarrollo cerebral (Ullah et al., 2011), el consumo de anfetaminas también provoca muerte neuronal (Krasnova et al., 2005; Warren et al., 2007), así como el consumo de opiáceos (Tramullas et al., 2008).

6.7 Óxido nítrico y estrés nitrosativo

El óxido nítrico es una molécula caracterizada por su alta liposolubilidad y por tener una vida media corta. Tiene funciones señalizadoras en el SNC y periférico. Está implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos en el cerebro, como la neurotransmisión (Garthwaite et al., 1988), la modulación el tono vascular (Palmer et al., 1987), del sistema inmune (Knowles et al., 1989) y del cardiovascular (Barañano et al., 2001). También participa en procesos de neurogénesis, diferenciación neuronal, y desarrollo (Contestabile and Ciani, 2004; Estrada and Murillo-Carretero, 2005; Mize and Lo, 2000), memoria, aprendizaje y otros comportamientos (Garthwaite, 2008; Golombek et al., 2004; Nelson et al., 2006; Susswein et al., 2004) y en procesos de neuropatología y/o neuroprotección (Calabrese et al., 2007; Contestabile et al., 2003; Dawson and Dawson, 1998; Keynes and Garthwaite, 2004). También se ha visto que el consumo de drogas puede afectar a algún aspecto del óxido nítrico (Bonthius et al., 2008; Loftis and Janowsky, 2000; Przewlocka et al., 1994).

En general a bajos niveles, el óxido nítrico puede mediar efectos protectores, mientras que su sobreproducción puede inducir daños en el tejido (Garthwaite, 2008). Estos daños se pueden producir porque existen también las

especies reactivas de nitrógeno que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo es por sí mismo un radical, pero además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de ROS como el peroxinitrito (ONOO^\cdot), trióxido dinitrógeno (N_2O_3), dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), o nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Otra característica del óxido nítrico es su alta capacidad para reaccionar con el anión superóxido y generar un peroxinitrito muy reactivo (Radi et al., 1991). Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico (Hausladen and Stamler, 1999). Esta situación puede ocurrir in vivo en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante activación de receptores NMDA (Heinzel et al., 1992).

El óxido nítrico es sintetizado a partir de la L-arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) en presencia de oxígeno y NADPH, la cual también genera L-citrulina y NADP^\cdot (Knowles and Moncada, 1994) (Figura 9).



Figura 9: Esquema de la reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa

La NOS es activa como un homodímero y tiene dos dominios, uno reductasa y otro oxigenasa. El dominio oxigenasa contiene tres cofactores unidos (BH_4 , Heme y Zinc) y funciona como el sitio activo de la enzima. El dominio reductasa posee también tres cofactores (NADPH, flavina adenina dinucleótido FAD y flavina mononucleótico FMN) y funciona principalmente como un transductor de electrones. La enzima para ejercer su actividad adecuadamente necesita dos Calmodulinas (CaM), que ejercen de nexo de unión entre los dos dominios (Massaad and Klann, 2011).

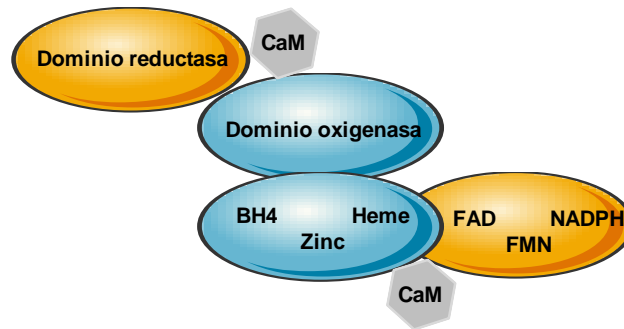


Figura 10: Esquema de la enzima óxido nítrico sintasa

Una característica interesante de la NOS, es que en ausencia o en bajas cantidades de L-arginina produce ROS en vez de óxido nítrico (Heinzel et al., 1992). Por lo tanto puede contribuir al aumento de RL.

Existen dos formas constitutivas de NOS, la endotelial (eNOS) que se encuentra en las células endoteliales y la neuronal (nNOS). Existe una tercera isoenzima denominada inducible (iNOS), que raramente se presenta en condiciones fisiológicas, pero puede ser expresada en numerosos tipos celulares (microglía, macrófagos) en respuesta a determinados estímulos (Garthwaite, 2008).

De las tres isoenzimas, la nNOS es la principal forma expresada en el cerebro (Liu et al., 2002), donde el óxido nítrico es sintetizado por neuronas específicas que expresan dicha isoenzima (Bredt et al., 1990; Rodrigo et al., 1994).

HIPÓTESIS

La cocaína es una droga psicoestimulante que produce adicción. Tiene numerosos efectos sobre el SNC, y se puede decir que induce una usurpación de mecanismos neurales de aprendizaje y memoria bajo circunstancias normales que pueden dar lugar a un deterioro en la cognición, aprendizaje y memoria. Sin embargo, aún no se conocen bien los mecanismos moleculares por los cuales causa esos daños, y urge la necesidad de encontrar un tratamiento que ayude a paliar los efectos negativos asociados a cocaína, por lo tanto se plantea que:

La cocaína administrada de forma continuada induce cambios a nivel molecular y funcional sobre el SNC. El topiramato es capaz de prevenir estas alteraciones.

OBJETIVOS

1. Estudiar si existen alteraciones funcionales, en concreto en el aprendizaje, y en la recuperación de la memoria de experiencias adquiridas previamente al consumo de cocaína.
2. Comprobar los cambios en la actividad de NF- κ B inducidos por la cocaína en el cerebro de rata.
3. Caracterizar los cambios inducidos por la cocaína en el cerebro de rata, estudiando la posible implicación del estrés oxidativo, apoptosis, y actividad de la enzima nNOS.
4. Estudiar la expresión de CREB, y proteínas relacionadas, así como su relación con diferentes rutas de señalización y la cocaína.
5. Comprobar el efecto de un tratamiento preventivo con topiramato, sobre las posibles modificaciones observadas en el estudio tras 20 días de administración de cocaína.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

1.1 Condiciones de estabulación

Para este trabajo se utilizaron ratas macho de raza Wistar que procedían de una camada original de Charles Rivers (España). Los animales utilizados tenían un peso al inicio del experimento de unos 300 g aproximadamente. En todos los casos se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

La estabulación fue realizada en las instalaciones que la Universidad CEU Cardenal Herrera tiene acondicionadas para ello. Durante la estabulación, los animales se mantuvieron en jaulas bajo condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), y ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 y de 20:00 a 08:00. Durante su estabulación y los experimentos los animales tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Letica (España).

1.2 Manejo de los animales

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo la normativa española, Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los ensayos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU Cardenal Herrera y el número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico (Doletal® solución inyectable, Madrid, España).

2. MODELO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se realizaron dos experimentos con un planteamiento similar. Teniendo como base la administración de cocaína y el estudio del comportamiento influenciado por la administración del psicoestimulante.

En el primero de los experimentos, las ratas, después de la semana de aclimatación, fueron separadas en 4 grupos y se les administraba cocaína y/o topiramato durante 20 días. Un grupo fue el control al cual se le administraba suero salino (0.9%). El grupo control y topiramato recibió suero salino y topiramato. Al grupo cocaína se le administró cocaína durante todo el tiempo que duró el experimento y por último el grupo cocaína y topiramato se le administró conjuntamente la droga y fármaco topiramato.

La cocaína (Sigma-Aldrich, USA) se administraba por vía intraperitoneal a los individuos del grupo correspondiente, con una dosis diaria de 15 mg/kg. Como vehículo fue usado el suero salino (0.9%), siendo comprobado que este vehículo no tiene efecto sobre los parámetros a estudiar.

El topiramato (Topamax[®], Jassen-Cilag, S.A., España) se administraba por vía oral mediante sonda gástrica para ratas, a una dosis diaria de 10 mg/kg. Se utilizó como vehículo suero salino (0.9%).

Las dosis tanto de la cocaína como la de topiramato se seleccionaron en base a estudios previos (Farook et al., 2007; Ishikawa et al., 2009; Rigoulot et al., 2003; Schroeder et al., 2009).

El segundo de los experimentos tuvo una duración de 36 días. Las ratas se dividieron en dos grupos, uno control y otro cocaína. La cocaína se administró por vía intraperitoneal con la misma dosis que en el anterior experimento, 15 mg/kg. El grupo control en su defecto recibió suero salino (0.9%) ajustado a la dosis correspondiente.

3. LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

La memoria y el aprendizaje espacial se han estudiado siguiendo una variante del laberinto de agua de Morris (Morris et al., 1982) realizada en nuestro laboratorio (Muriach et al., 2010).

Brevemente, el comportamiento se puede separar en dos bloques. En primer lugar, antes de la administración de las drogas, las ratas son entrenadas en la tarea del laberinto de agua para posteriormente, el último día de administración de las drogas evaluar el efecto de las mismas en la memoria y el aprendizaje.

Las ratas son entrenadas para encontrar una plataforma escondida de 10 cm de diámetro 4 cm por debajo del agua. La tarea se realiza en una piscina redonda de unos 2 m de diámetro, dividida en cuatro cuadrantes, el cuadrante donde se coloca la plataforma se denomina cuadrante diana. Esta tarea se basa en la capacidad de las ratas de aprender donde se encuentra la plataforma observando pistas visuales situadas alrededor de la piscina. Por lo tanto, las ratas aprenden donde está la plataforma invisible y se suben a ella. El parámetro que se mide es la latencia, el tiempo en segundos que la rata tarda en subirse a la plataforma hasta un máximo de 90 segundos. Además también se registra el número de veces que la rata entra en el cuadrante diana.

La tarea se realiza en una habitación específica para ello. En todo momento la temperatura del agua está controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y además las condiciones de luz son las mismas durante todo el tiempo que en el que se desarrolla el laberinto.

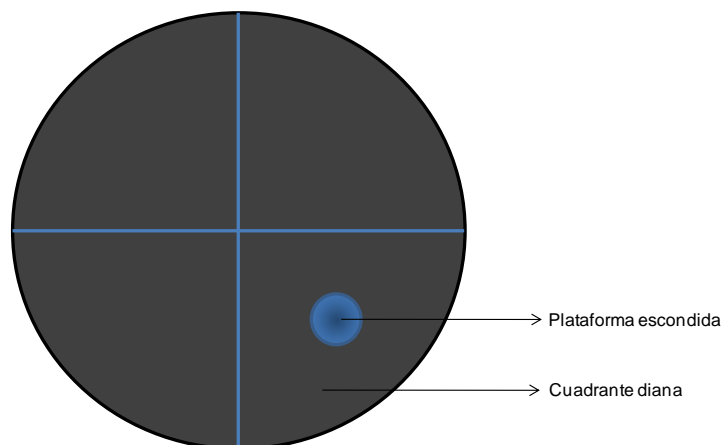


Figura 11: Esquema de la piscina del laberinto de agua de Morris

Antes del inicio de la administración de las drogas, se inicia el entrenamiento. Durante 3 días consecutivos las ratas realizan 3 pases cada día de la tarea, resultando 9 pases en total. Cada pase comienza poniendo a la rata en el agua de forma aleatoria, esta debe encontrar la plataforma escondida. Si la rata no encuentra la plataforma en ese tiempo, el experimentador la guía hasta la misma, y se deja allí durante 15 segundos. El primer pase es diferente al resto, ya que el animal es colocado inicialmente en la plataforma durante 15 segundos, de modo que pueda aprender donde se localiza la plataforma tomando referencias visuales.

Antes de iniciar cada pase, las ratas son depositadas en una jaula de estabulación en ausencia de agua y comida durante 45 min en la habitación donde se estudia el comportamiento. Durante todo el tiempo que dura este estudio, cada rata tiene asignada la misma jaula. Al final de cada pase también son depositadas en esta jaula durante 1 hora, y transcurrido este tiempo son devueltas a su jaula original.

Después de la fase de entrenamiento las ratas son asignadas a los grupos correspondientes de forma aleatoria y se inicia la administración de las diferentes drogas. Las ratas que no son capaces de aprender la tarea son eliminadas de los estudios de comportamiento.

El último día de administración de las drogas se realiza la segunda parte del estudio del comportamiento, que consiste en identificar como afectan las drogas al aprendizaje y memoria espacial. Para ello, se realizan 3 nuevos

pases del laberinto de agua durante un solo día (pases 10-12) de la misma forma que durante el entrenamiento. La plataforma está colocada en la misma posición que en la fase de entrenamiento. Además de eso, se ejecuta el test de transferencia, que consiste en realizar otro pase más, pero cambiando la plataforma de cuadrante.

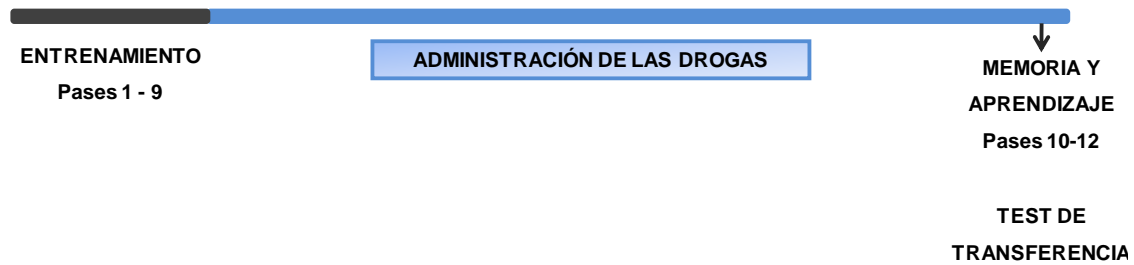


Figura 12: Esquema general de la tarea del laberinto de agua de Morris

4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1 Orina

Las muestras de orina se obtuvieron por punción en la vejiga en el momento del sacrificio. Esta se recogió para asegurarnos de la presencia de cocaína en los animales pertenecientes al grupo administrado con la droga.

4.2 Tejido nervioso

Transcurrido los experimentos, las ratas fueron sacrificadas como se ha indicado anteriormente, y fueron divididas en dos grupos. El primer grupo de ratas se destinó para el estudio de las defensas antioxidantes, realizar westerns blot y medir la actividad del NF-κB. En este caso el cerebro fue extraído rápidamente después del sacrificio, y el hipocampo y la corteza frontal fueron diseccionados. El tejido nervioso fue homogenizado con métodos diferentes según el análisis que se le quisiera realizar posteriormente. El segundo de los grupos fue destinado a histoquímica, en este caso las ratas tuvieron que ser perfundidas.

4.2.1 Estudio de las defensas antioxidantes

Para el análisis de los parámetros bioquímicos, las muestras (hipocampo y corteza frontal) se homogenizaron manualmente introduciéndolas en un homogenizador de vidrio, con 1ml de tampón fosfato potásico 0,1M, pH 7.0, a una temperatura de 4°C. Los homogenados se centrifugaron 2 minutos a 6.000 rpm y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización para la determinación de proteínas y actividad de la enzima GPx.

Para la determinación del glutatión, inmediatamente después de la centrifugación, 180µl del sobrenadante se acidificaron con 20µl de ácido perclórico (Panreac, España) al 20% y se conservaron a -20°C hasta la determinación de la concentración de este antioxidante endógeno.

4.2.2 Determinación de la actividad de NF-κB

Para la determinación de la actividad de NF-κB separamos la fracción nuclear de la fracción citoplasmática siguiendo el siguiente protocolo.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A pH 7.9
Hepes (Sigma, España) 10mM, KCl (Panreac, España) 5mM, EDTA (Panreac, España) 0.1mM, EGTA (Sigma, España) 0.1mM.
- Solución C pH 7.9
Hepes 20mM, NaCl (Panreac, España) 0.4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM).
- Solución A de trabajo: Solución A
Ditiotreitol 100mM (Fluka, España)
IGEPAL 0.05% (Sigma, España)
Complete 1x (Biotest, España)
NaF 10mM (Sigma, España)
Na₃VO₄ 200mM (Sigma, España)
- Solución C de trabajo: Solución C
Ditiotreitol 100mM (Fluka, España)

Complete 1x (Roche, España)

NaF 10mM (Sigma, España)

Na₃VO₄ 200mM (Sigma, España)

El tejido diseccionado, tanto el hipocampo como la corteza frontal, fue homogenizado manualmente con 500µl de la solución A de trabajo. Posteriormente fue dejado en 4°C durante 15 minutos, tras los cuales, las muestras fueron centrifugadas a 850 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue separado del pellet y almacenado, por ser este parte de la fracción citoplasmática. Al pellet se le añadieron 400µl de la solución A de trabajo, fue agitado mediante vortex e incubado 15 min a 4°C. Seguidamente se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos a 4°C. El sobrenadante fue recogido y almacenado ya que también es parte de la fracción citoplasmática. Al pellet restante se le añadieron 150µl de la solución C de trabajo, este se agitó usando el vortex y se volvió a incubar 15 min a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante recogido es la fracción nuclear. Tanto la fracción citoplasmática como la nuclear se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

Para comprobar que el proceso de fraccionamiento celular se realiza adecuadamente, se elabora un western blot, para detectar una proteína exclusiva de núcleo.

4.2.3 Análisis mediante wester blot

El tejido seleccionado para western blot fue homogeneizado con el tampón de lisis (1 % tritonX-100, 50mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) suplementado con 1mM de DTT, 10mM NaF, 1mM de Na₂VO₄ y 1x del inhibidor de proteasas Complete mini (Roche, España). Cuando finaliza la homogenización, el tejido fue incubado durante 30 minutos a 4°C, ya por último se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 rpm, quedándonos el sobrenadante, siendo almacenado a -20°C para su uso posterior.

4.2.4 Histoquímica

Las ratas seleccionadas para este fin se perfundieron con suero salino (0.9%), seguido de una solución de paraformaldehído (Panreac, España) al 4% en 0.1 M tampón fosfato, pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y postfijados en la misma solución de paraformaldehído durante 24 horas. Después estos se depositaron en una solución de tampón fosfato salino (PBS) al 30% de sacarosa (Sigma, España). Por último se incluyeron en cryobloc compound (DiaPath, España) y se conservaron a -80°C.

5. DETERMINACIÓN DE COCAÍNA EN ORINA

La determinación de cocaína en orina se realiza por medio de tiras de detección en orina (Gernon, España). Se basa en un método inmunocromatográfico. Biológicamente la cocaína se metaboliza rápidamente para generar benzoilecgonina, esta puede detectarse hasta 3 días después del consumo de cocaína en la orina.

6. ESTUDIO DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

6.1 Determinación de proteínas

El contenido de proteínas de las muestras que se usaron para la determinación de defensas antioxidantes, se realizó según el procedimiento descrito por Lowry (1951) (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio (Peterson, 1977) y que a continuación se detallan.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución 1: Na_2CO_3 4% (Sigma, España), NaOH 0.8% (Fluka, España).
- Solución 2: CuSO_4 1.25 mM (Fluka, España), $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ 1.42 mM (Fluka, España).

Las soluciones A y B se conservan a 4°C hasta su utilización.

- Solución 3: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma, España).

- Solución 4: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml (Sigma, España).

El procedimiento desarrollado es muy sencillo. Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución 4 (0,10, 25, 50, 75, 100µl) para realizar una recta patrón y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25µl) para identificar las proteínas de cada una de ellas. Se añade agua bidestilada hasta 200µl. Se mezclan las soluciones 1, 2a y 2b en una proporción 2:1:1, respectivamente y a cada tubo de ensayo se le añade 1ml de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100µl de la solución 3 a cada uno de los tubos. Se agita bien y se incuba durante 20 minutos.

La absorbancia de cada una de las soluciones se mide en un espectrofotómetro (JENWAY 6300), a una longitud de onda de 696nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por extrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queremos conocer.

6.2 Determinación del Glutati6n

La concentración de GSH en las distintas muestras se determina por el procedimiento descrito por Reed (1980) (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos, seguido de una derivatización crom6fora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno), dando lugar a derivados N-DPN. Estos derivados son r6pidamente separados por cromatograf6a l6quida de alta eficacia (HPLC), lo que permite la cuantificaci6n de niveles nanomolares de GSH, GSSG y amino6cidos relacionados.

Se ha trabajado con un equipo de HPLC de la marca Gilson que consta de los siguientes componentes:

- Bombas 322 PUMP
- Detector UV/VIS-156

- Autoinyector 234
- Desgaseador 864
- Software: Unipoint

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil Amino, de 250 x 4,6 mm (Análisis vínicos S.L., España). Las condiciones iniciales del flujo son de 1 ml/min, 80 % de la fase móvil A y 20 % de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales son mantenidas durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95 % de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos.

La fase móvil A se prepara con metanol a 80% y la fase B se prepara con acetato de sodio 5M en metanol al 80%. Posteriormente se filtran a través de un filtro-membrana (Scheider y Scuell) de 0,45µm de poro y 47mm de diámetro.

La solución madre de calibración está compuesta por GSH reducido 10mM (Sigma, España), se prepara diariamente y se mantiene a 4°C. La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100mM (Sigma, España) y m-cresol 0,2 mM (Acros). La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) (Sigma, España) 1,5 % v/v etanol puro también se prepara cada día y se conserva a 4°C protegida de la luz.

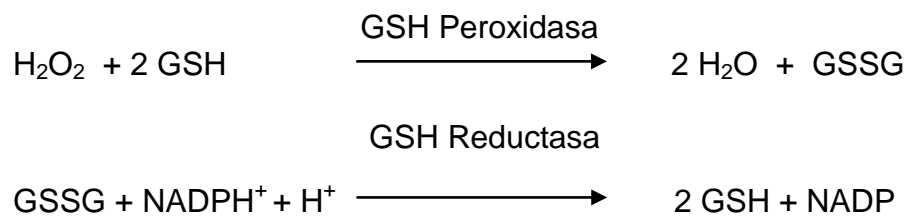
El procedimiento parte de 100µl de muestra sobre los que se añaden 20 µl de solución 1. Posteriormente cada mezcla se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO₃ 2,4 M (Sigma, España) en KOH 2M (Sigma, España). Incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno para formar los derivados N-DNP los cuales requieren 4 horas en oscuridad a 4°C para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC.

En cada medida se prepara una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 60; 80; 100µM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la

concentración de GSH en la muestra, que se calcula por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

6.3 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa

La actividad de GPx se determinó según el método propuesto por Lawrence (Lawrence et al., 1978) frente al peróxido de hidrógeno. Está basado en las siguientes reacciones:



La formación del glutatión oxidado (GSSG) está catalizada por la actividad GPx de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad GSH reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM (Sigma, España)
- Solución B. GSH reductasa 2.4 U/mL (Sigma, España)
- Solución C. GSH 10 mM
- Solución D. NADPH 1.5 mM (Roche, España) disuelto en NaHCO₃ al 0.1% (Sigma, España)
- Solución E. H₂O₂ 1.5 mM (Sigma, España)

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 550 µl de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 50 µl de muestra.

3. 100 μl de la solución de GSH reductasa (solución B).
4. 100 μl de la solución C.

Estas soluciones se preincuban durante 5 min a 37°C, tras lo cual se añaden 100 μl de la solución D. Posteriormente el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos es monitorizado en un espectrofotómetro (Hewlet & Packard modelo 8452A Diode Array) durante 3 min. Finalmente, se añaden 100 μl de la solución E, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido:

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

V_f = volumen final en ml

V_m = volumen de muestra en ml

ϵ = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

ΔA = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

7.1 Determinación de proteínas (Método Bradford)

Este método se usa para cuantificar las muestras destinadas a western blot y actividad de NF- κ B, está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

Este es un método espectrofotométrico, por lo tanto se relaciona la concentración de proteínas con la absorbancia. En primer lugar se realizó una recta patrón con una concentración de proteínas conocida de albúmina sérico bovina (0, 0.5, 1, 5, 10, 20). Se añadieron una cantidad determinada de esta proteína y un volumen hasta 1ml del kit de detección Bio-Rad “protein assay” 1x (BioRad, España). Para cuantificar las proteínas de las muestras se añadieron 2 μ l de muestra hasta 1ml del reactivo del kit y se incubaron durante 5 minutos. La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595nm en un espectrofotómetro.

7.2 Técnica de western blot

La metodología de western blot empleada está descrita en “Current Protocols in Protein Science” (Coligan, 2003). Este procedimiento consiste en la migración de proteínas del tejido fraccionado por medio de una electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE). Estas proteínas una vez que se han separado en el gel por su tamaño, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de las proteínas se pone de manifiesto por medio de anticuerpos específicos ligados a un sistema de detección y visualización.

Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 7.5-12.5% de poliacrilamida (BioRad, España), cargándose en el gel 40 μ g de proteína total. Antes de realizar la carga, a las muestras se añadió tampón de carga 1x (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β -mercapto-etanol) y posteriormente se hirvieron a 95°C durante 5 min. Para su

separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis es realizada a 200V durante 60 min. La transferencia se hizo a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, UK) durante 90 min a 100 V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad) y con un tampón compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina. Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador el SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard (Invitrogen).

Transcurrido ese tiempo, las membranas son teñidas en una solución de rojo Ponceau S (Sigma, España) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavaron con TBS ("Tris-Buffered Saline") y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en TBT, TBS + 0.1% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación se procedió a incubar las membranas con los anticuerpos primarios, durante 1 hora o durante toda la noche (según anticuerpos) (Tabla 1), y después se realizaron 3 lavados con TBT durante 30 min para eliminar los restos de anticuerpo. Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 1 hora con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 2) a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, las membranas se volvieron a lavar 3 veces con TBT durante 30 min.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL ("enhanced chemiluminescence") (Amersham, UK). Las membranas se cubrieron con film transparente y se expusieron a films X-OMAT (Kodak, España).

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo distinto, fueron tratadas con 200 mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron abundantemente con TBS.

Anticuerpo Primario WB	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
Procaspasa 3	Santa Cruz	sc-7148	1:1000	Policlonal de conejo
Caspasa 3	Cell Signaling	9664	1:1000	Monoclonal del conejo
CREB	Santa Cruz	sc-186	1:800	Policlonal de conejo
pCREB (ser133)	Millipore	06-519	1:1000	Policlonal de conejo
PKAc α	Cell Signaling	4782	1:1000	Policlonal de conejo
BDNF	Santa Cruz	sc-548	1:1000	Policlonal de conejo
GAD65	Sigma	G1166	1:1000	Monoclonal del ratón
β -Actina	Sigma	A3854	1:30000	Monoclonal del ratón

Tabla 1: Anticuerpos primarios usados para Western Blot.

Anticuerpo Secundario WB	Casa comercial	Referencia	Dilución
anti Rabbit IgG- HRP (Fc)	Santa Cruz	sc-3837	1:5000
anti-mouse	Thermoscientific	31437	1:5000

Tabla 2: Anticuerpo secundarios usados para Western Blot.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-KB

El factor de transcripción NF- κ B existe de forma latente en el citoplasma unido a la proteína inhibitoria I κ B (Baeuerle and Baltimore, 1988). Estímulos que inducen la activación de NF- κ B activan al complejo I κ B quinasa, el cual fosforila a I κ B. Esta se degrada y NF- κ B expone su sitio de unión al ADN y la secuencia de localización nuclear.

La activación de NF- κ B fue determinada en el extracto nuclear obtenido del fraccionamiento celular de hipocampo y de corteza frontal utilizando un kit de ELISA, TransAM NF- κ B, específico para este factor nuclear. El kit está compuesto por una placa de 96 pocillos, donde cada uno contiene unida la secuencia consenso que solo se expone cuando el NF- κ B ha sido activado. Esta secuencia en concreto es para la subunidad p65.

En primer lugar la muestra a estudiar se añadió en cada pocillo de la placa incubándose durante 1 hora. Después se añadió el anticuerpo primario, el cual reconoce la subunidad p65 de la proteína NF- κ B activada, también con un periodo de incubación de 1 hora en agitación. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario unido a la enzima peroxidasa de rábano a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. Esta enzima junto con la solución adecuada dará lugar a una reacción colorimétrica que se puede cuantificar por espectrofotometría. A continuación se añadió el sustrato de la reacción y posteriormente una solución que para la reacción. En último lugar la absorbancia de cada pocillo se mide por medio de un lector de placas ELISA a 450 nm y posteriormente a 655 nm (Espectrofotómetro Placas Elisa, Multiskan Ascent, Labsystem).

9. HISTOQUÍMICA DE LA NADPH-DIAFORASA

Para realizar las pruebas histoquímicas se obtienen secciones coronales de un grosor de 35 μ m de todo el cerebro con ayuda de un criostato (Microm). Las secciones se almacenaron en PBS 0,01M pH 7.2 con sacarosa al 30%, y se congelaron a -20°C, donde se conservaron hasta su posterior utilización.

La prueba histoquímica de NADPH-Diaforasa, se utiliza para detectar neuronas con la enzima nNOS, en tejido fijado con paraformaldehído (Dawson et al., 1991; Hope et al., 1991). La enzima nNOS, como ya se ha mencionado tiene un dominio reductasa y otro oxigenasa. Como resultado de la reacción se oxida un NADPH a NADP^+ y H^+ . En esta prueba histoquímica se usa la capacidad de este protón de reducir una sal, “nitro blue tetrazolium”, a un complejo insoluble y de color azul, conocido como la reacción NADPH-d, lo que nos permite identificar donde se localiza esta actividad en el tejido.

Para realizar la histoquímica se partieron de cortes de cerebro almacenados en PBS-sacarosa 30% a -20°C . En primer lugar estos cortes se lavaron con PBS 0.01M pH 7.2 durante 5 minutos y se repitió 3 veces. Posteriormente fueron incubados con tampón fosfato 0.1M pH 8, Tritón X-100 0.8% y NADPH (0.05mg/ml) durante 1 hora en agitación y a 37°C . Una vez transcurrido este tiempo el tejido se volvió a lavar con PBS, después los cortes fueron montados en un portaobjetos “superfrost plus” con medio de montaje Diomount (Diapath, España) quedando listos para su contaje. Las células NADPH-d positivas fueron contadas con el microscopio Olympus Bx40 y el software usado para ello fue el Software Fotografía NIS-Elements Br 2.30 (Media Cybernetics).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

10.1 Estadística descriptiva

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos.

La medida de dispersión de los datos utilizada fue la desviación estándar de la muestra o el error estándar.

10.2 Pruebas estadísticas

Los resultados presentados referentes a dos grupos, control y cocaína, fueron analizados con la Distribución t de "Student". La prueba t para dos muestras permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias. El nivel de significación que se ha utilizado es $p < 0.05$.

Además también existe la necesidad de comparar más de dos poblaciones, surgiendo el inconveniente del elevado número de comparaciones a realizar. Para obviar esto, utilizamos el análisis de la varianza, que contrasta simultáneamente todos los casos. El ANOVA de un factor sirve por tanto para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica que define los grupos que deseamos comparar se la llama independiente o factor, mientras que a la variable cuantitativa en la que deseamos comparar los grupos se la denomina dependiente.

La hipótesis que se pone a prueba es que las medias poblacionales son iguales, si esto es así, significa que los grupos no difieren en la variable dependiente, y en consecuencia la variable dependiente es independiente del factor.

La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias, consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido entre las medias que se comparan. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F.

La interpretación de este estadístico es la siguiente: si el nivel crítico asociado al estadístico es menor que 0,05 rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad.

En los casos en que se aplica este análisis y se descarta la hipótesis nula, hay que utilizar lo que se denomina un contraste post hoc a posteriori para averiguar qué medias en concreto difieren de qué otras.

En nuestro caso, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó mediante un contraste pot hoc DMS si hay homogenidad de varianzas o de T3 Dunnett si las varianzas no son homogéneas.

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS 15.0 para Windows.

RESULTADOS

I. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 20 DÍAS Y TRATAMIENTO CON TOPIRAMATO

1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

En la Figura 13 se muestra el esquema global del test del laberinto de agua de Morris. Se observa que los animales de los diferentes grupos antes del tratamiento (pases del 1 al 9) no muestran variaciones en el aprendizaje y que las ratas han aprendido la tarea espacial, ya que la latencia va disminuyendo después de cada pase.

El día 22 del experimento se realizan 3 pases más de este test. Lo más interesante ocurre en el pase 10 (primero después del tratamiento), la latencia acumulada del grupo cocaína es estadísticamente superior al resto de grupos volviendo a valores iniciales del entrenamiento (pases del 1 al 3). Este aumento puede ser indicativo del daño en la recuperación de la memoria como consecuencia de la administración de la cocaína. Además es interesante resaltar como el topiramato previene ese daño en la recuperación de la memoria.

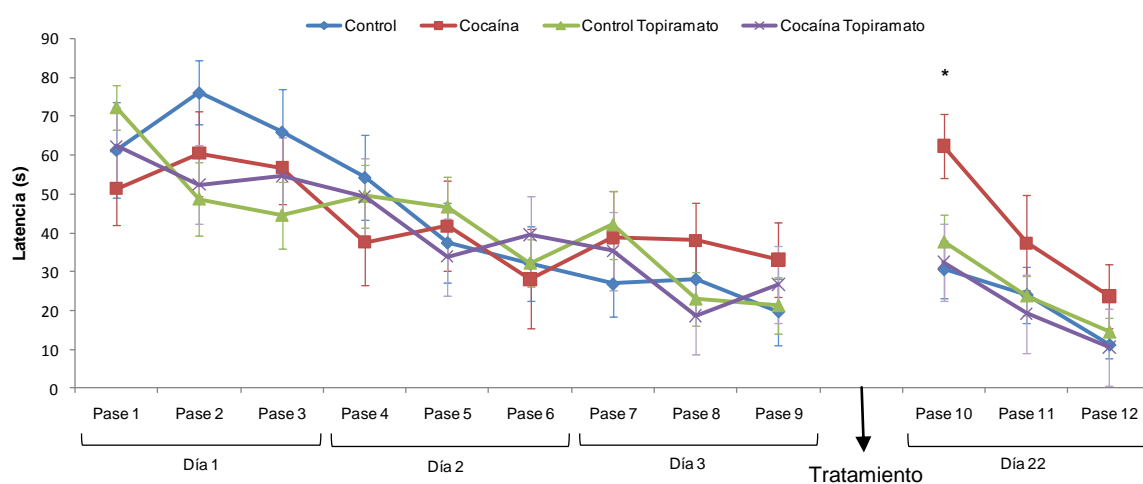


Figura 13: Test del laberinto de agua de Morris. Latencia acumulada (s). * $p < 0.05$ vs todos los grupos. $n = 8-16$

Igualmente, hay que destacar que cuando se compara dentro de cada grupo, la latencia acumulada entre el último pase antes del inicio del tratamiento (pase 9) y el primer pase después del tratamiento (pase 10), el único grupo donde existen diferencias significativas es en el grupo cocaína. La latencia acumulada es mayor en el pase 10 con respecto al pase 9, indicando que las ratas tras el tratamiento con cocaína no recuerdan el proceso de aprendizaje previo al tratamiento, ya que tardan más tiempo en encontrar la plataforma escondida (Figura 14). Cabe destacar que el topiramato previene este efecto adverso de la cocaína.

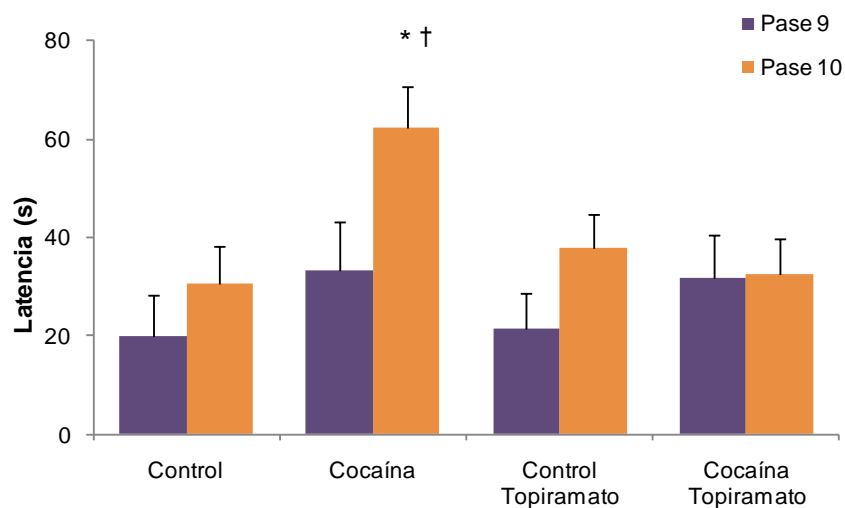


Figura 14: Comparación de latencias (s) entre el pase 9 (último pase antes del tratamiento) y pase 10 (primero después del tratamiento). * $p < 0.05$ vs todos los grupos, † $p < 0.05$ vs pase 9.

n=8-16

Cuando se realiza el test de transferencia (la plataforma se cambia de cuadrante) y se compara con los datos del pase 12 (último pase después del tratamiento), se observa que se produce un aumento estadísticamente significativo de la latencia en todos los grupos excepto en las ratas a las que se les ha administrado cocaína. Éstas requieren el mismo tiempo que en el pase 12 para encontrar la nueva ubicación de la plataforma escondida. El topiramato como en los casos anteriores evita el efecto causado por la cocaína, Figura 15.

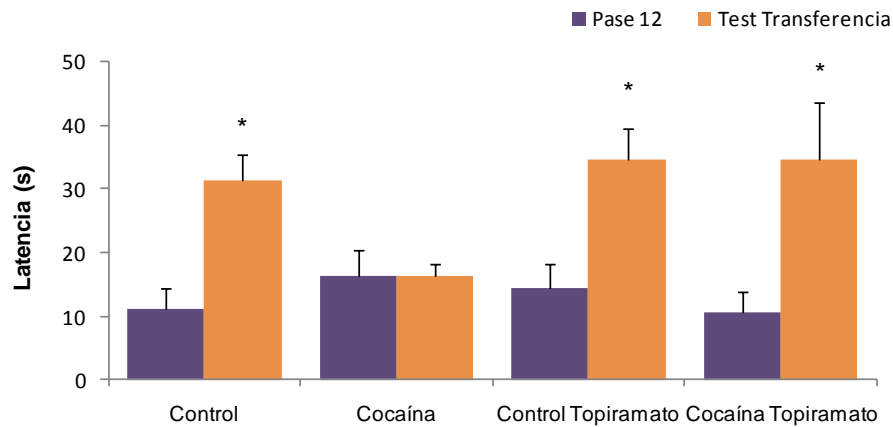


Figura 15: Comparación de latencia (s) entre el pase 12 (último pase después del tratamiento) y el test de transferencia (plataforma cambiada de posición). * $p < 0.05$ vs pase 12. $n = 8-16$

Se ha analizado también el número de veces que el animal ha entrado en el cuadrante diana donde se situaba la plataforma inicialmente, después de la administración de las diferentes drogas. Si este dato se compara con la latencia de cada pase se descubre que no hay diferencias entre ninguno de los grupos analizados (Figura 16), sugiriendo que la actividad locomotora no influye en la adquisición de esta tarea.

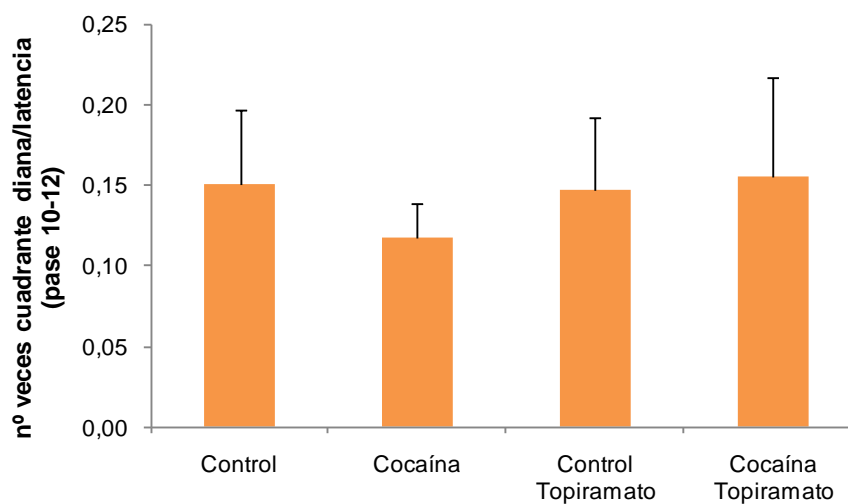


Figura 16: Representación del número de veces que el animal entre en el cuadrante diana entre la latencia acumulada (pases 10-12). $n = 8-16$

2. ACTIVIDAD DE NF-KB

En la corteza frontal se produce un descenso de la actividad de este factor de transcripción y el topiramato es capaz de prevenir la disminución de la actividad de NF-κB causada por la cocaína en esta área del cerebro (Figura 17). Sin embargo, en hipocampo no existen cambios en la actividad de NF-κB tras la administración de las distintas drogas (Figura 18).

	Actividad de NF-κB (unidades arbitrarias)
CONTROL	0.094 ± 0.007
COCAÍNA	0.070 ± 0.005 *
CONTROL TOPIRAMATO	0.113 ± 0.017
COCAÍNA TOPIRAMATO	0.111 ± 0.013

Tabla 3: Actividad de NF-κB en corteza frontal. *p<0.05 vs todos los grupos.

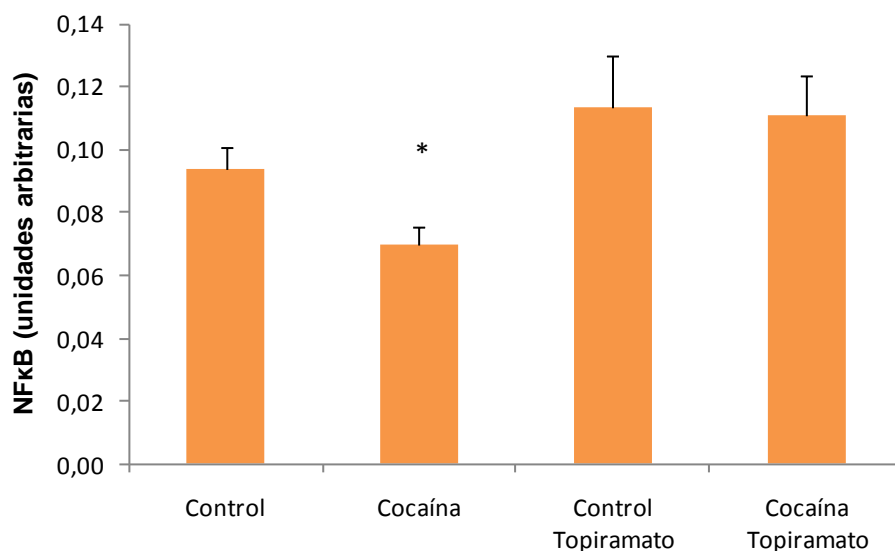


Figura 17: Representación de la actividad de NF-κB en corteza frontal. *p<0.05 vs todos los grupos. n=6

	Actividad de NF-κB (unidades arbitrarias)
CONTROL	0.0066 ± 0.0009
COCAÍNA	0.0073 ± 0.0008
CONTROL TOPIRAMATO	0.0069 ± 0.0012
COCAÍNA TOPIRAMATO	0.0069 ± 0.0005

Tabla 4: Actividad de NF-κB en hipocampo.

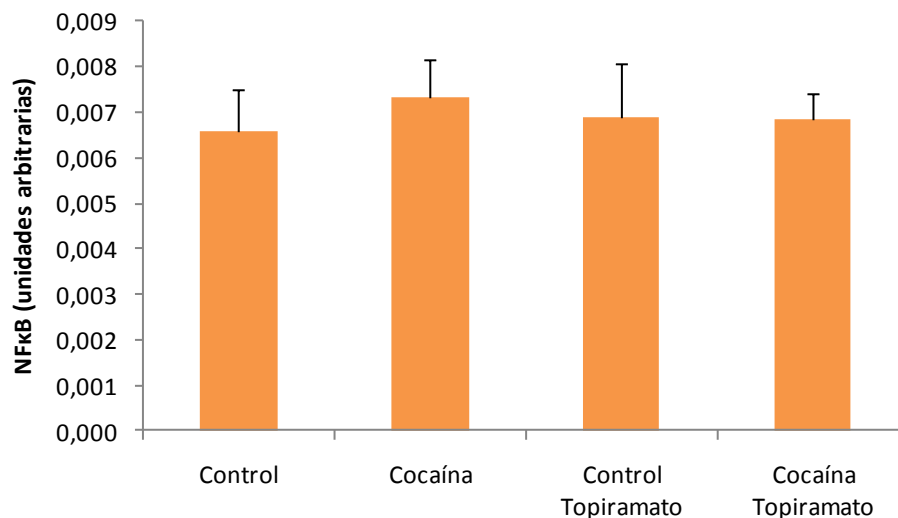


Figura 18: Representación de la actividad de NF-κB en hipocampo. n=6

Existe una correlación negativa estadísticamente significativa entre la actividad de NF-κB en la corteza frontal y la diferencia en la latencia entre el pase 10 (el primer pase después de tratamiento) y pase 9 (el último pase antes del tratamiento). Es decir, los individuos que tienen una variación de latencia mayor (aquellos que necesitan más tiempo para encontrar la plataforma escondida en relación al que necesitaron previamente al tratamiento), tienen disminuida la actividad de NF-κB en la corteza frontal después de la administración de cocaína.

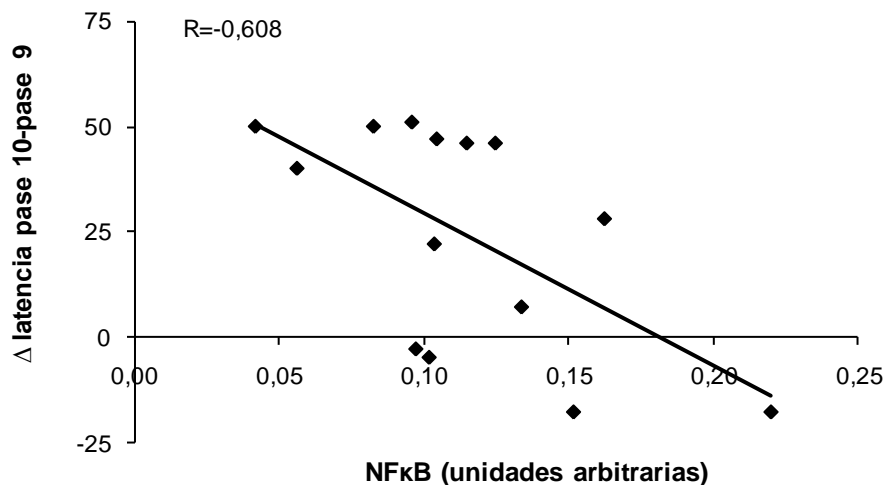


Figura 19: Correlación entre la actividad de NF- κ B en la corteza frontal y el incremento de la latencia entre los pases 9 y 10. $p=0.021$

3. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

En la corteza frontal no se observa ningún cambio en las defensas antioxidantes endógenas: ni la concentración de GSH ni la actividad de GPx varían en ninguno de los grupos estudiados (Figura 20 y Figura 21). Sin embargo en hipocampo se produce una reducción significativa de las defensas antioxidantes a consecuencia de la administración de cocaína (Figura 22 y Figura 23). Resaltar que de nuevo el topiramato previene este efecto de la cocaína en el hipocampo.

	GSH (nmol/mg proteína)
CONTROL	39.74 \pm 2.22
COCAÍNA	39.13 \pm 2.47
CONTROL TOPIRAMATO	39.74 \pm 1.93
COCAÍNA TOPIRAMATO	39.13 \pm 1.51

Tabla 5: Concentración de GSH en corteza frontal.

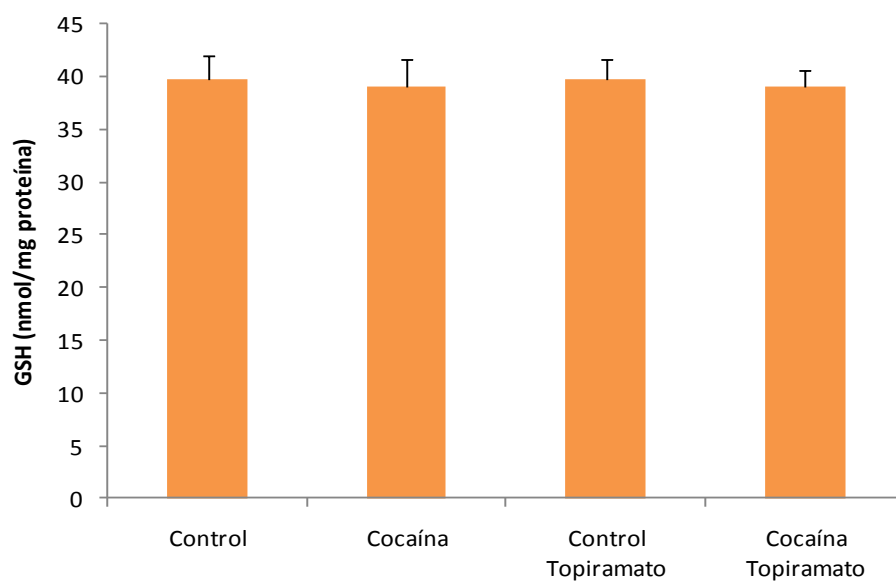


Figura 20: Representación de la concentración de GSH en corteza frontal. n=8

	GPx (nmol/mg prot. x min)
CONTROL	17.75 ± 0.16
COCAÍNA	19.78 ± 0.79
CONTROL TOPIRAMATO	16.55 ± 0.36
COCAÍNA TOPIRAMATO	18.09 ± 0.08

Tabla 6: Actividad de la enzima GPx en corteza frontal.

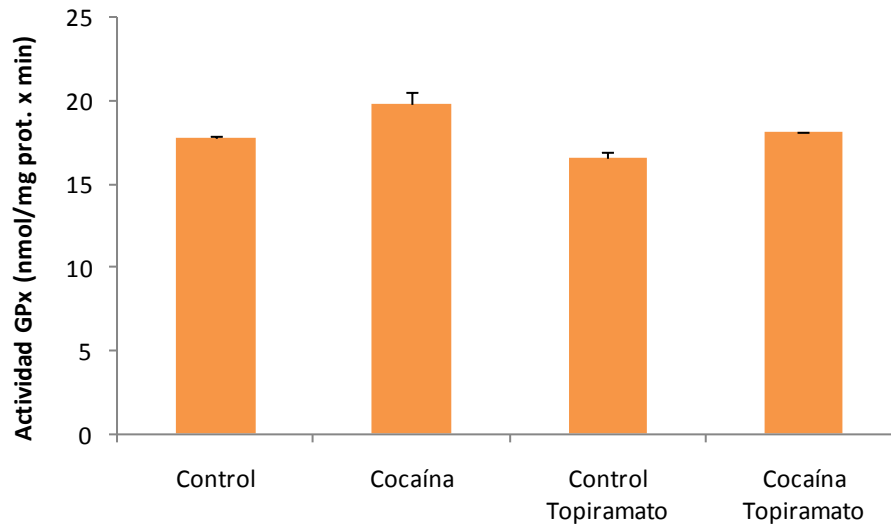


Figura 21: Representación de la actividad de GPx en corteza frontal. n=8

	GSH (nmol/mg proteína)
CONTROL	44.36 ± 8.61
COCAÍNA	34.93 ± 3.15 *
CONTROL TOPIRAMATO	43.45 ± 4.49
COCAÍNA TOPIRAMATO	41.31 ± 6.46

Tabla 7: Concentración de GSH en hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos.

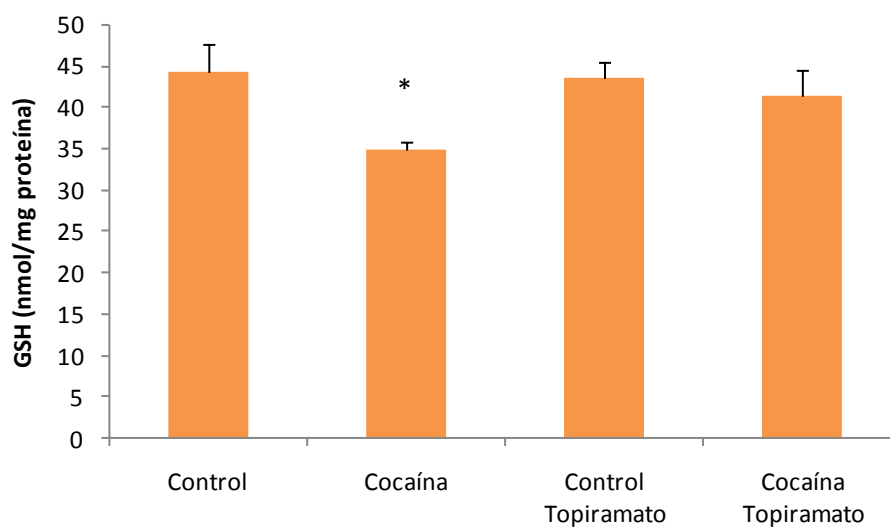


Figura 22: Representación de la concentración de GSH en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos. $n=8$

	GPx (nmol/mg prot. x min)
CONTROL	17.00 ± 0.97
COCAÍNA	13.36 ± 1.21 *
CONTROL TOPIRAMATO	19.96 ± 1.20
COCAÍNA TOPIRAMATO	20.18 ± 1.45

Tabla 8: Actividad de GPx en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos.

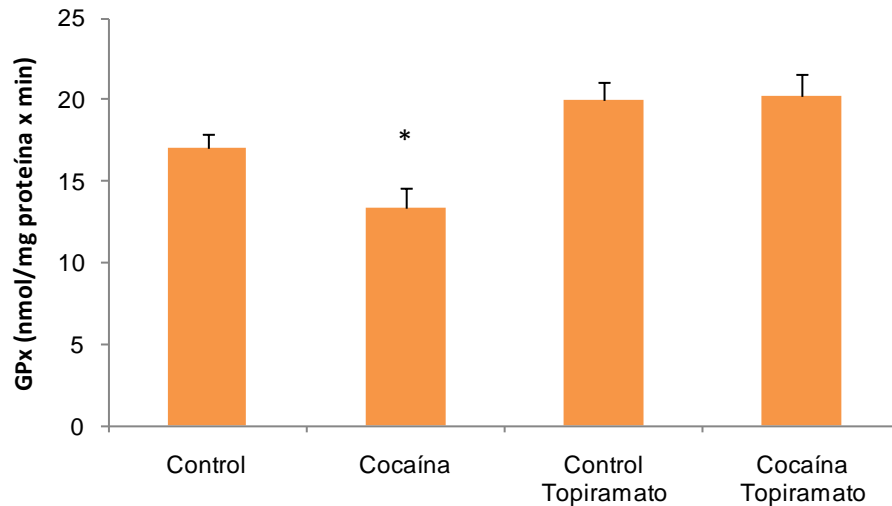


Figura 23: Representación de la actividad de GPx en hipocampo. * $p < 0.05$ vs todos los grupos. $n=8$

Existe, por otro lado, una correlación positiva estadísticamente significativa entre la actividad de la enzima GPx en hipocampo, (que está disminuida por la administración de cocaína), y el incremento de latencia entre el pase 12 (último después del tratamiento) y el test de transferencia (Figura 24). Es decir, existe una relación entre la disminución de la actividad GPx y la capacidad de aprendizaje de nuevas tareas.

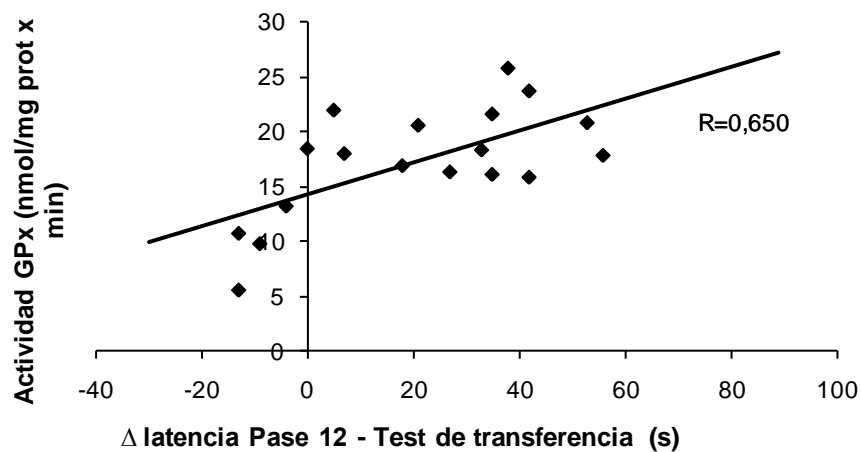


Figura 24: Correlación entre la actividad de GPx en hipocampo y diferencia entre el test de transferencia y el pase 12. $p=0.003$.

4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3

Mediante la técnica de western blot se cuantificó la expresión de la forma activa de la caspasa 3 así como la forma inactiva (procaspasa 3). Las medidas se realizaron tanto en hipocampo como en corteza frontal de animales controles y de animales tratados con cocaína, y se observa que no hay activación de caspasa 3 en dichas áreas (Figura 25). Además no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de procaspasa 3 en ambos grupos (Figura 26).

Para comprobar que la técnica se ha realizado adecuadamente se utiliza un control positivo, que tiene activada de forma constitutiva la proteína caspasa 3.

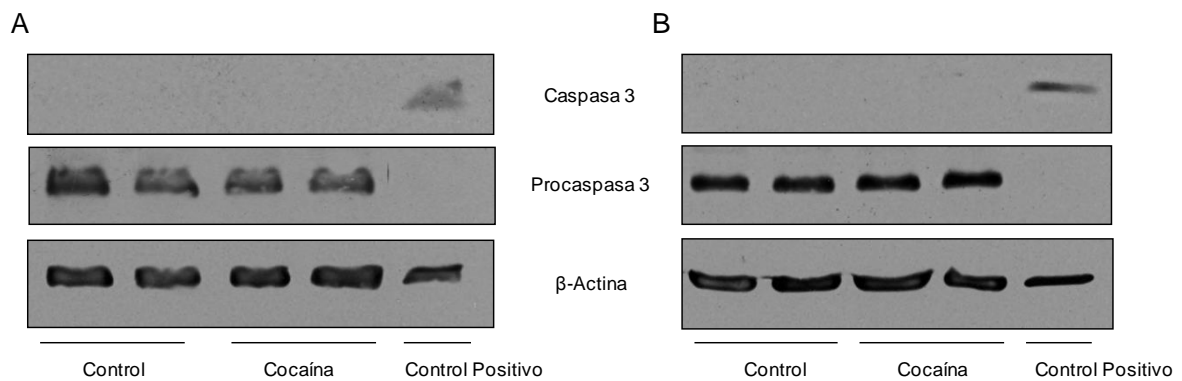


Figura 25: Western blot de Caspasa 3 (17/19 kDa), Procaspasa 3 (35 kDa) y β -Actina (42 kDa).

A. Corteza frontal. B. Hipocampo.

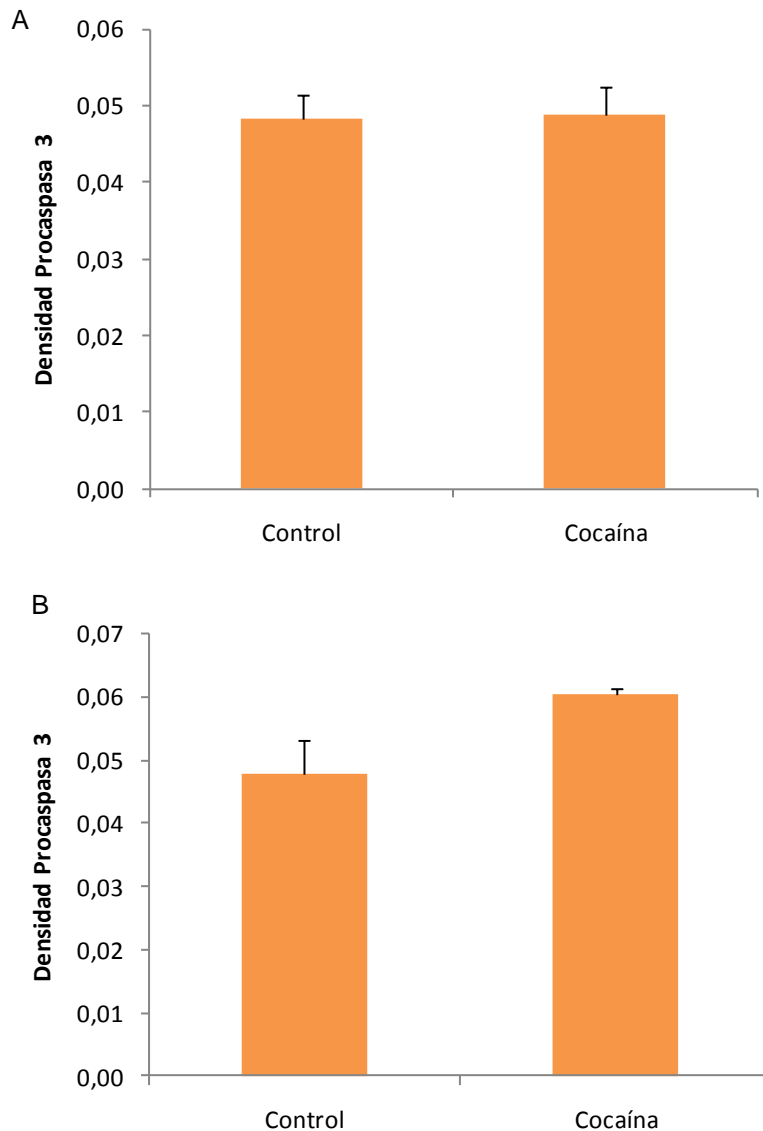


Figura 26: Expresión de procaspasa 3. A. Corteza frontal. B. Hipocampo. n=4

5. HISTOQUÍMICA DE NADPH-DIAFORASA

Se observa que la administración de la cocaína no afecta al número de células NADPH diaforasa positivas en las regiones estudiadas de la corteza frontal (Bregma 1,92 - 1,08 y Bregma 2.28 - 2.04) (Figura 27).

Por el contrario, la administración de esta droga produce un incremento significativo en el número de células NADPH diforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo en relación al resto de grupos (Figura 28). Esto nos indica que el topiramato es capaz, nuevamente, de evitar esta alteración inducida por la cocaína.

	Células NADPH Diaforasa (Células/mm ²)	
	Bregma 1.92-1.08	Bregma 2.28-2.04
CONTROL	10.28 ± 0.97	12.86 ± 2.09
COCAÍNA	10.84 ± 1.81	13.71 ± 0.49
CONTROL TOPIRAMATO	9.40 ± 1.67	8.46 ± 4.12
COCAÍNA TOPIRAMATO	10.74 ± 1.29	10.13 ± 1.23

Tabla 9: Número de células NADPH Diaforasa positivas en corteza frontal.

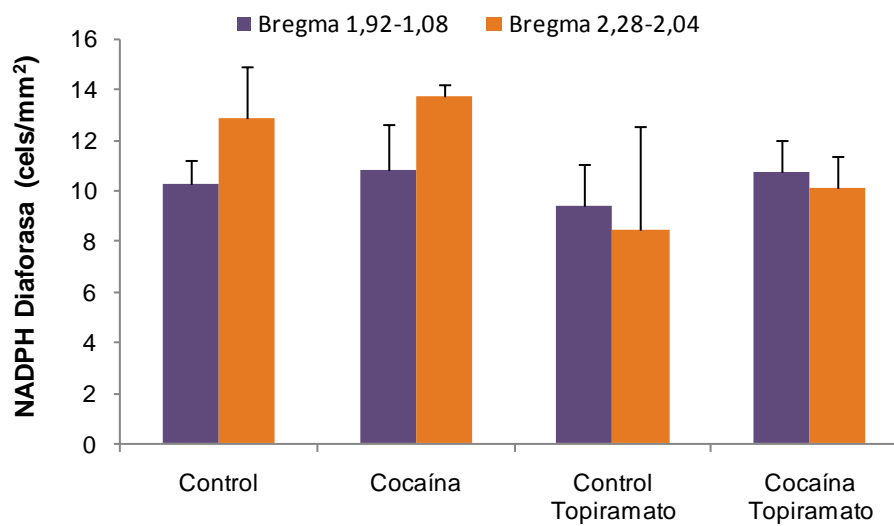


Figura 27: Representación comparativa del número de células NADPH Diaforasa positivas en corteza frontal. n=6.

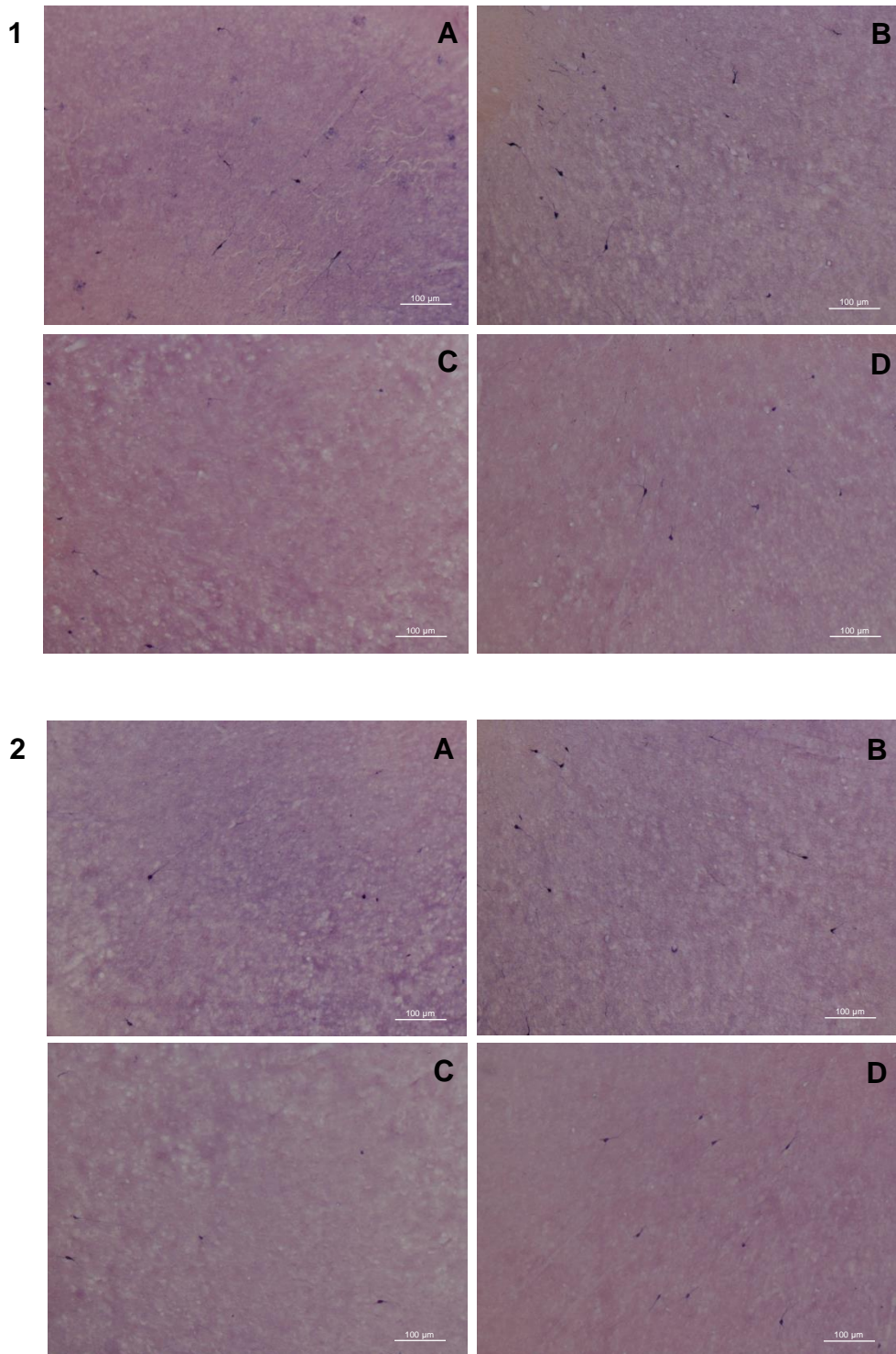


Imagen 1: Imagen comparativa del número de células NADPH-Diaforasa positivas en la corteza frontal, 1. Bregma 1.92-1.08. 2. Bregma 2.28-2.04. (A. Control, B. Cocaína, C. Control Topiramato, D. Cocaína Topiramato).

	Células NADPH-Diaforasa (Células/mm²)
CONTROL	131.59 ± 13.41
COCAÍNA	206.01 ± 18.05 *
CONTROL TOPIRAMATO	117.62 ± 22.52
COCAÍNA TOPIRAMATO	142.61 ± 13.44

Tabla 10: Número de células NADPH-Diaforasa positivas en hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos.

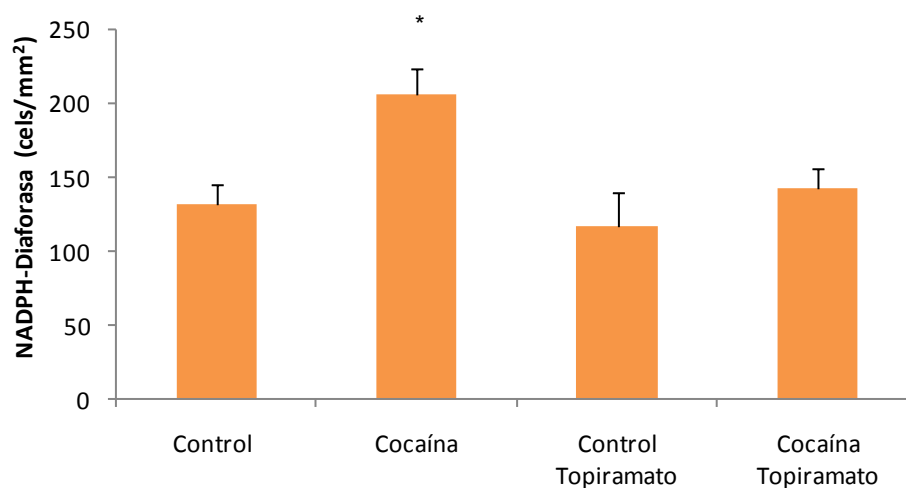


Figura 28: Representación del número de células NADPH Diaforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo. *p<0.05 vs todos los grupos. n=6.

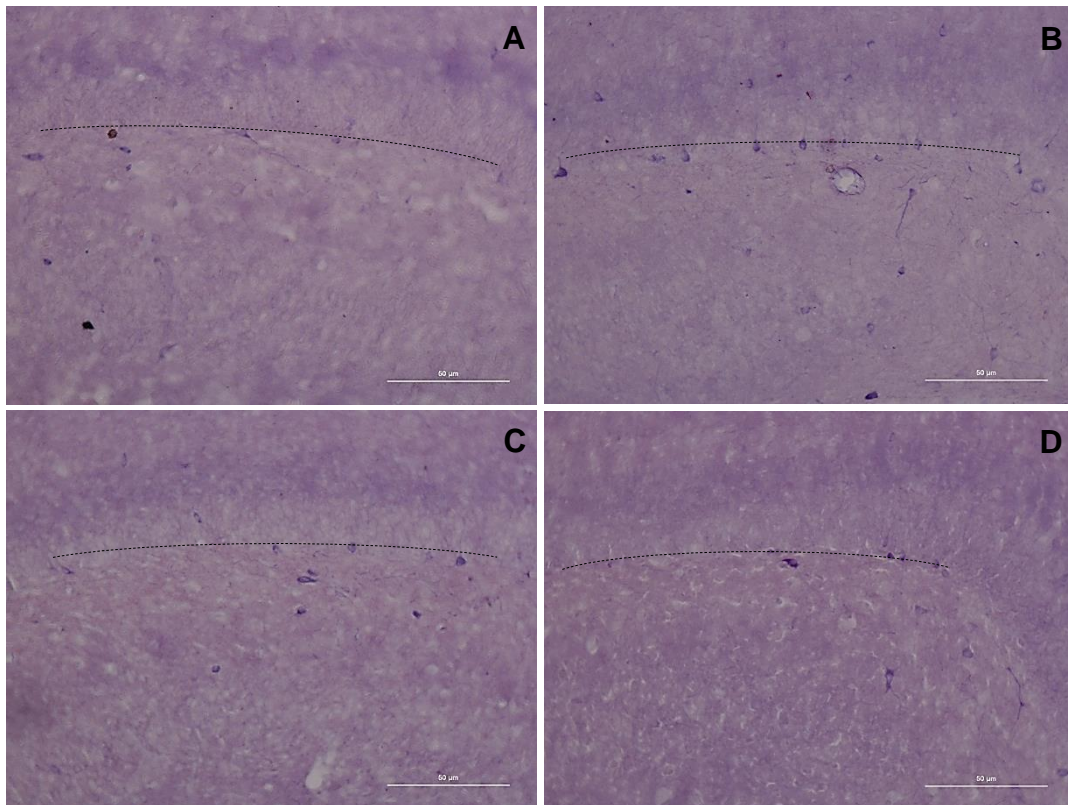


Imagen 2: Imagen comparativa del número de células NADPH-Diaforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo. (A. Control, B. Cocaína, C. Control Topiramato, D. Cocaína Topiramato).

Si se estudia la relación entre el número de células NADPH-Diaforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo y el incremento de latencia entre los pases 12 y test de transferencia, se establece una correlación negativa estadísticamente significativa (Figura 29). Es decir, que el aumento de células NADPH Diaforasa positivas en esta área está relacionado de alguna forma con la mejora en la ejecución de tareas después de la administración de cocaína.

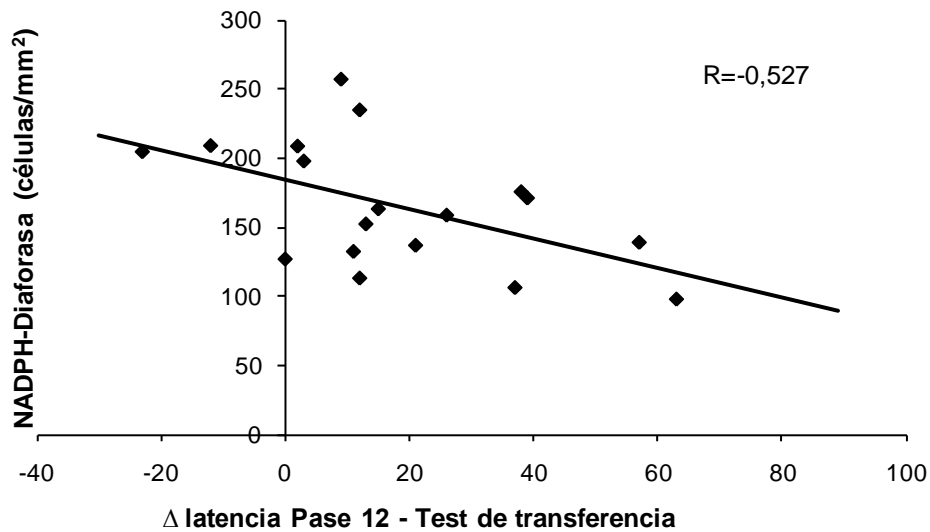


Figura 29: Correlación entre NADPH-diaforasa en hipocampo y diferencia entre el test de transferencia y el pase 12.

II. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 36 DÍAS

En el apartado anterior se muestra como el topiramato tiene la capacidad de prevenir algunos efectos nocivos de la cocaína y cómo actúa esta droga psicoestimulante a nivel molecular en el hipocampo y en la corteza frontal. En este apartado se profundiza en los mecanismos de acción de la cocaína, centrándonos sobre todo en cómo daña esta droga la recuperación de la memoria de experiencias adquiridas con anterioridad a la administración de cocaína.

1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

En la Figura 30 se muestra un esquema global del test del laberinto de agua. Antes de la administración de cocaína, los animales han aprendido la tarea espacial, el tiempo que utilizan para encontrar la plataforma escondida es menor si se compara el pase 1 con respecto al pase 9.

Después de 36 días de administración de cocaína, se realizan 3 nuevos pases del test. En el pase 10 (el primer pase después del tratamiento) a las ratas a las que se les ha administrado cocaína su la latencia aumenta significativamente si se compara al grupo control lo que indica que podrían tener dañada la recuperación de la memoria.

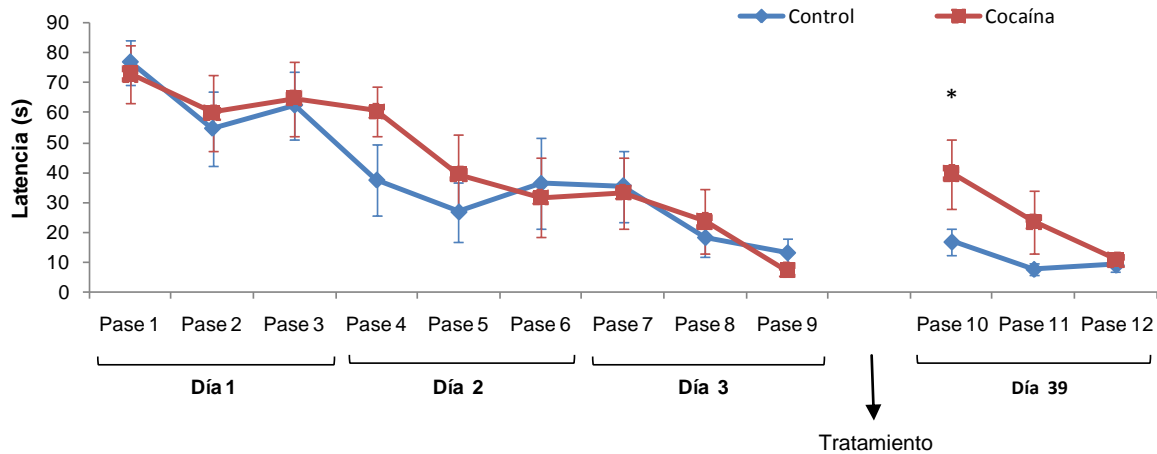


Figura 30: Test laberinto de agua de Morris. Latencia acumulada (s). * $p < 0.05$ vs grupo cocaína pase 9. $n = 8$.

Además, el daño en la recuperación de la memoria en las ratas tratadas con cocaína también se observa en la Figura 31, ya que si se compara la latencia de este grupo entre el pase 10 (primero después del tratamiento) y el pase 9 (último pase del entrenamiento) es estadísticamente superior. Las ratas tratadas con la droga tardan más tiempo en encontrar la plataforma escondida con respecto a las ratas controles.

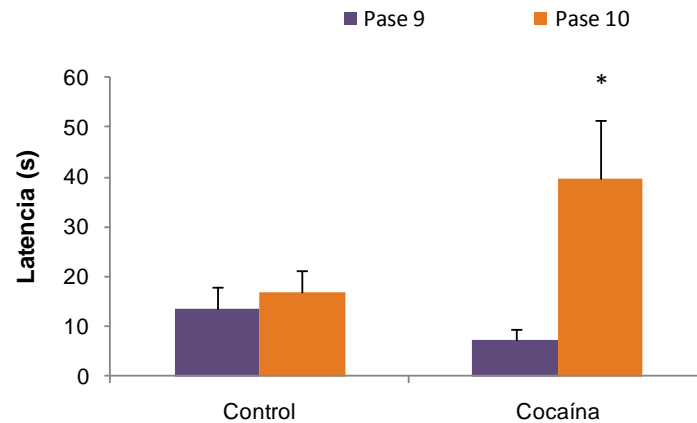


Figura 31: Comparación de la latencia (s) entre el pase 9 (último pase antes del tratamiento) y el pase 10 (primer después del tratamiento). * $p < 0.05$ vs pase 9. $n=8$

Después de analizar la memoria, se ha cambiado la plataforma del cuadrante diana y se ha colocado en uno diferente (test de transferencia), controlándose el tiempo en segundos que el animal tarda en encontrar la plataforma en el nuevo cuadrante. En la Figura 32 se muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos, aunque en el grupo cocaína parece que no varía la latencia entre los dos pases, aunque no es estadístico.

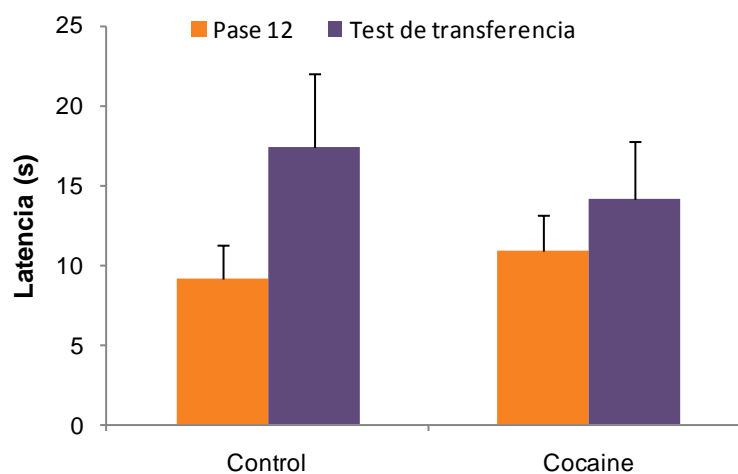


Figura 32: Comparación de la latencia entre el pase 12 (último pase después del tratamiento) y el test de transferencia (plataforma cambiada de posición). $n=8$.

La Figura 33 representa el número de veces que los animales entran en el cuadrante diana, en el que se sitúa la plataforma escondida. Se observa, que no existen diferencias significativas sugiriendo que la actividad locomotora no influye en esta tarea.

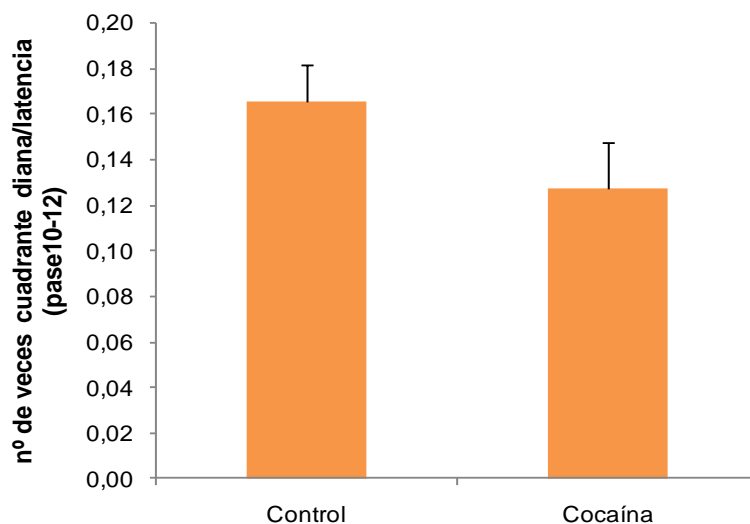


Figura 33: Representación del número de veces que el animal entre en el cuadrante diana entre la latencia acumulada (pases 10-12). n=8

2. ACTIVIDAD DE NF-KB

Se mide la actividad del factor de transcripción NF-κB en la corteza frontal y en el hipocampo. El resultado obtenido es una disminución significativa de la actividad de este factor de transcripción en ambas áreas del cerebro debido a la acción de la cocaína tal y cómo se muestra en la Tabla 11 y la Figura 34 y Figura 35.

	Actividad de NF-κB (unidades arbitrarias)	
	Corteza Frontal	Hipocampo
CONTROL	0.030 ± 0.002	0.018 ± 0.001
COCAÍNA	0.016 ± 0.001 *	0.012 ± 0.002 *

Tabla 11: Actividad de NF-κB en corteza frontal e hipocampo. *p<0.05 vs grupo cocaína.

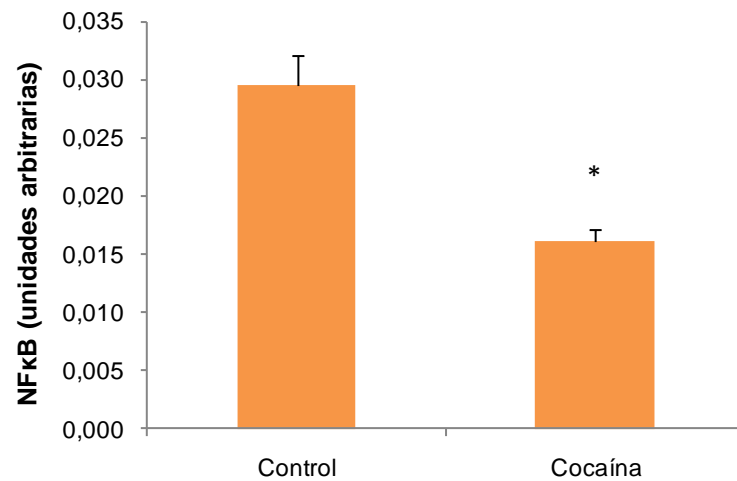


Figura 34: Representación de la actividad de NF-κB en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs grupo cocaína. $n = 6$

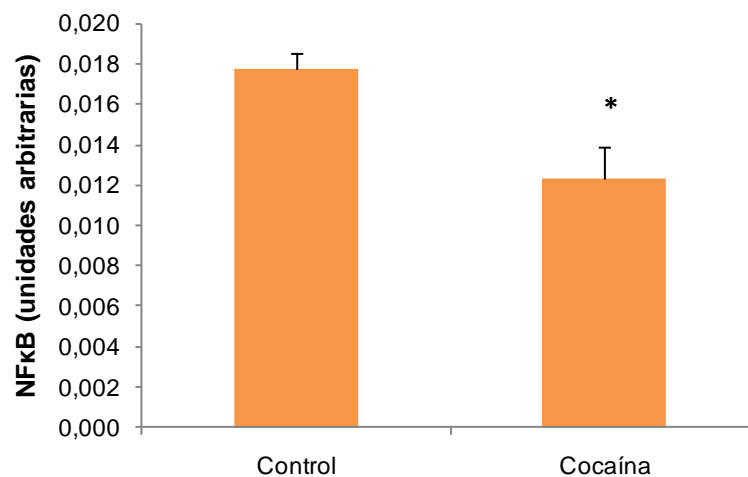


Figura 35: Representación de la actividad de NF-κB en hipocampo. * $p < 0.05$ vs grupo cocaína. $n = 7$.

Si se correlaciona la actividad de NF-κB en corteza frontal con el incremento de latencia entre el pase 9 (último pase del entrenamiento) y el pase 10 (primer pase después del tratamiento) se observa una correlación negativa estadísticamente significativa (Figura 36). Esta relación sugiere que la actividad de NF-κB en corteza frontal está involucrada en la recuperación de la memoria espacial.

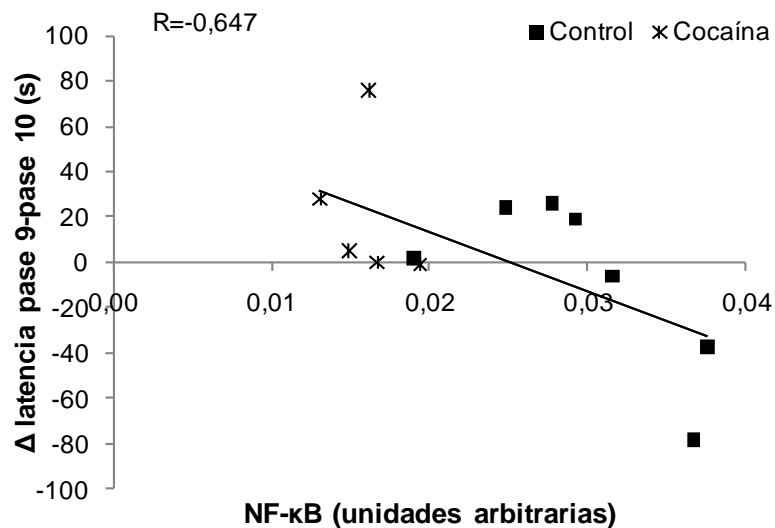


Figura 36: Correlación entre la actividad de NF-κB en la corteza frontal y el incremento de la latencia entre los pases 9 y 10. $p=0.023$.

3. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

Se han analizado dos antioxidantes endógenos (GSH y GPx) en hipocampo y corteza frontal, después de 36 días de administración de cocaína. En ambos casos, tal y como se demuestra en la Tabla 12 no existe variación de estos antioxidantes con respecto a los valores de los animales controles

	Corteza Frontal		Hipocampo	
	Control	Cocaína	Control	Cocaína
GSH (nmol/mg)	16.81 ± 1.71	16.01 ± 0.84	19.99 ± 3.14	21.33 ± 1.86
Actividad GPx (nmol/mg.min)	24.79 ± 2.54	20.50 ± 7.31	15.88 ± 3.02	16.87 ± 3.88

Tabla 12: Concentración de GSH y actividad de GPx en corteza frontal e hipocampo.

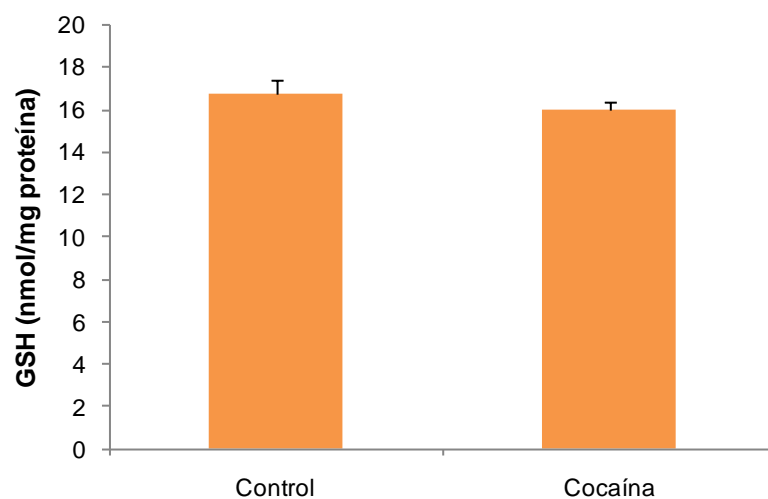


Figura 37: Representación de la concentración de GSH en corteza frontal. n=6.

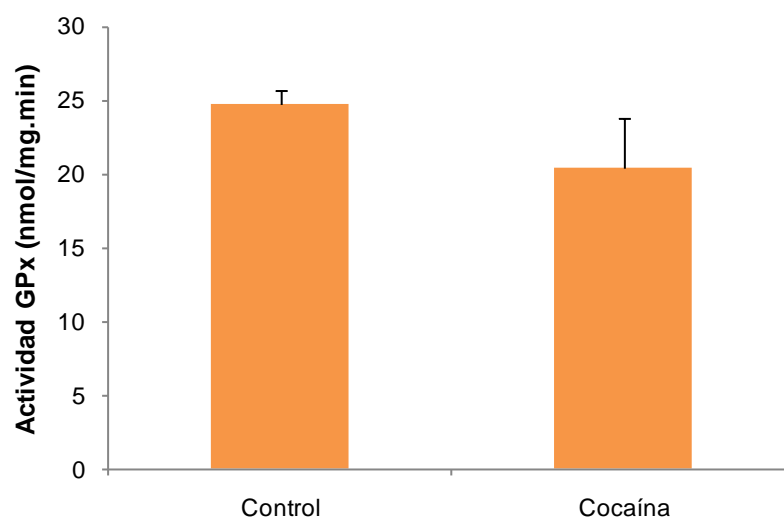


Figura 38: Representación de la actividad de GPx en corteza frontal. n=6.

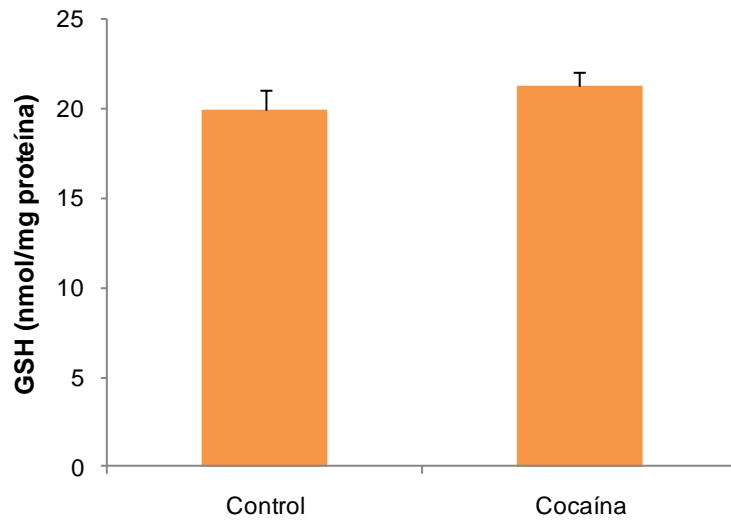


Figura 39: Representación de la concentración de GSH en hipocampo. n=6.

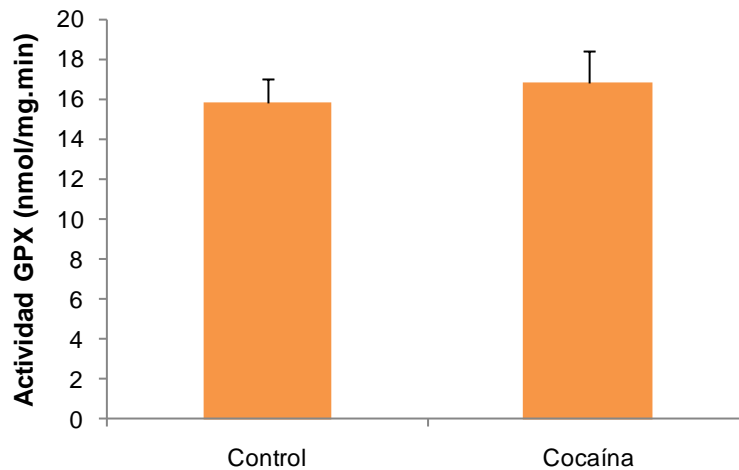


Figura 40: Representación de la actividad de GPx hipocampo. n=6.

4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3

Se ha estudiado la actividad de la proteína caspasa 3 en corteza frontal e hipocampo. Tal y como sucedía cuando la cocaína se administra durante 20 días no hay evidencias de la activación de esta proteína (Figura 41). Además tampoco hay cambio en la expresión de procaspasa 3 en ambas áreas (Figura 42 y Figura 43), proteína precursora de la caspasa 3.

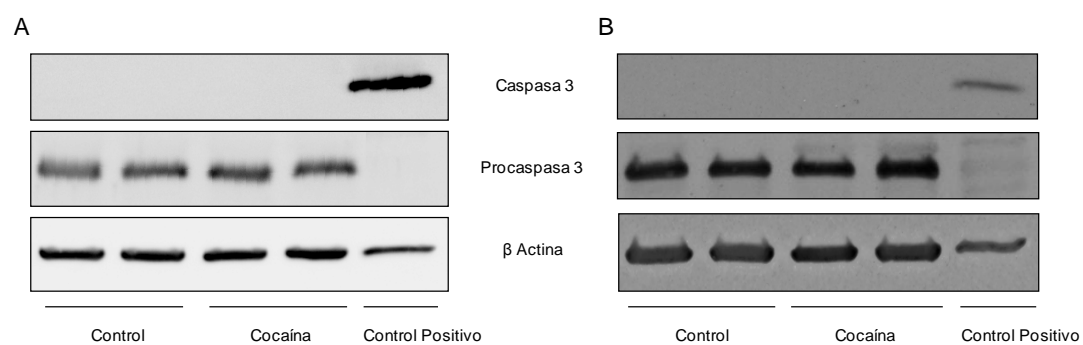


Figura 41: Western blot de Caspasa 3 (17/19 kDa), Procaspasa 3 (35 kDa) y β Actina (42 kDa).
A. Corteza frontal. B. Hipocampo.

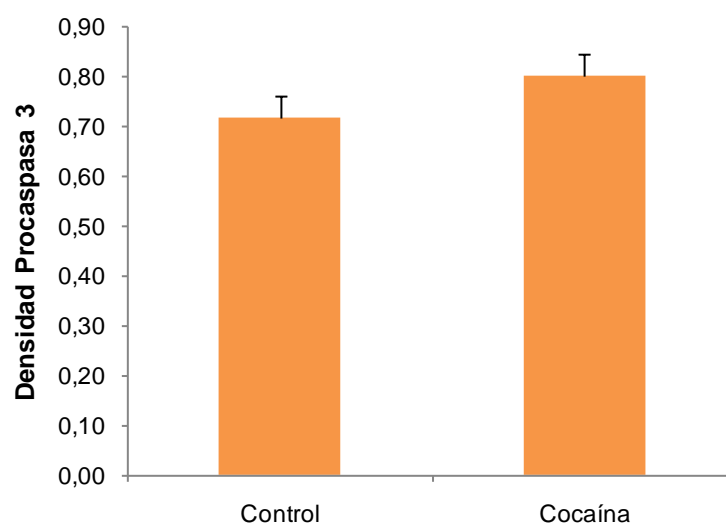


Figura 42: Representación de la cuantificación de procaspasa 3 en corteza frontal. n=4.

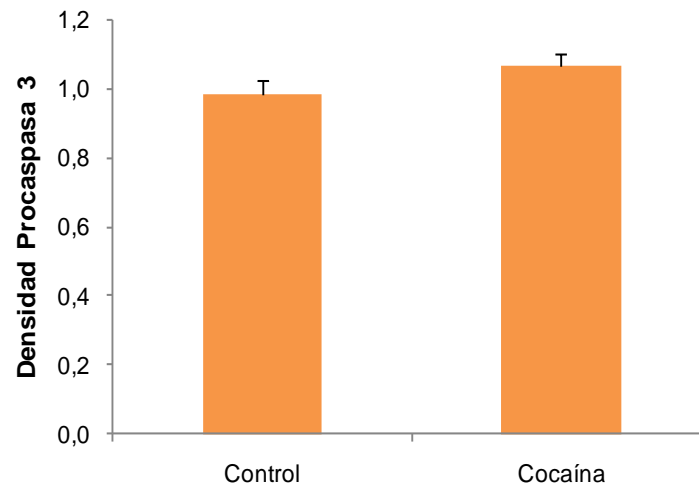


Figura 43: Representación de la cuantificación de procaspasa 3 en hipocampo. n=4.

5. ESTUDIO DE OTRAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

Se han estudiado los efectos de la cocaína desde un punto de vista molecular en la corteza frontal y en hipocampo, centrándonos en otras proteínas que también están involucradas en la memoria.

5.1 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB)

Una proteína que juega un papel muy importante en la formación de la memoria es CREB, como ya se ha mencionado anteriormente. En la Figura 44 se muestra que tras la administración de cocaína no hay cambios en ninguna de las dos formas de la proteína (CREB y pCREB) en la corteza frontal. Sin embargo, en hipocampo, después de la administración de cocaína hay una disminución de los niveles de pCREB mientras que su forma inactiva no se modifica (Figura 46).

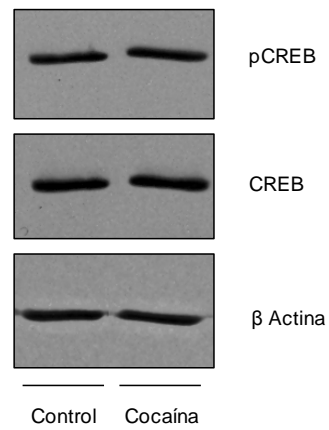


Figura 44: Representación del western blot de pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.

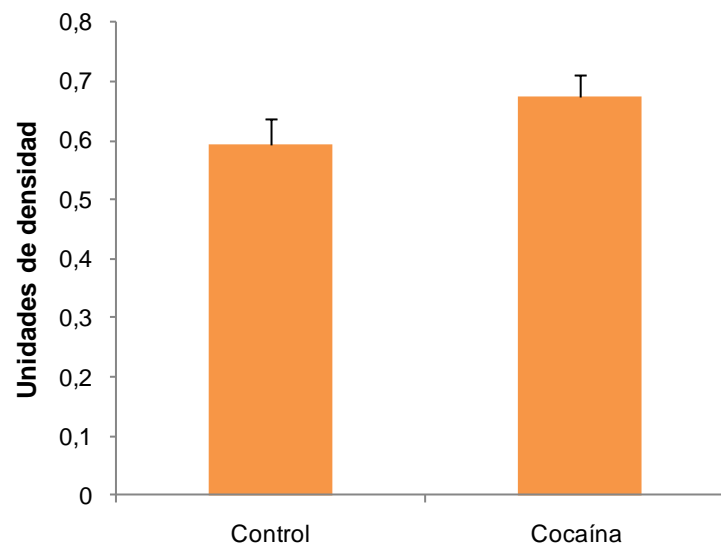


Figura 45: Representación de la densidad de pCREB entre CREB en corteza frontal. n=6.

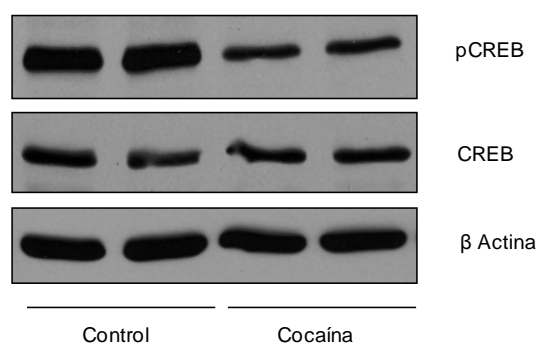


Figura 46. Representación del western blot de pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.

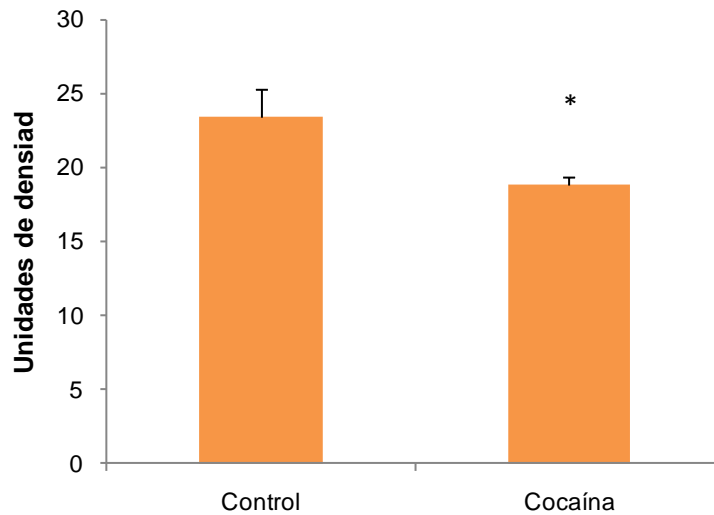


Figura 47: Representación de la cuantificación del western blot de pCREB entre CREB en hipocampo. * $p < 0.05$ vs control. $n = 6$.

La Figura 48 muestra una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de pCREB y la actividad de NF- κ B en hipocampo, estableciéndose una relación entre ambas proteínas.

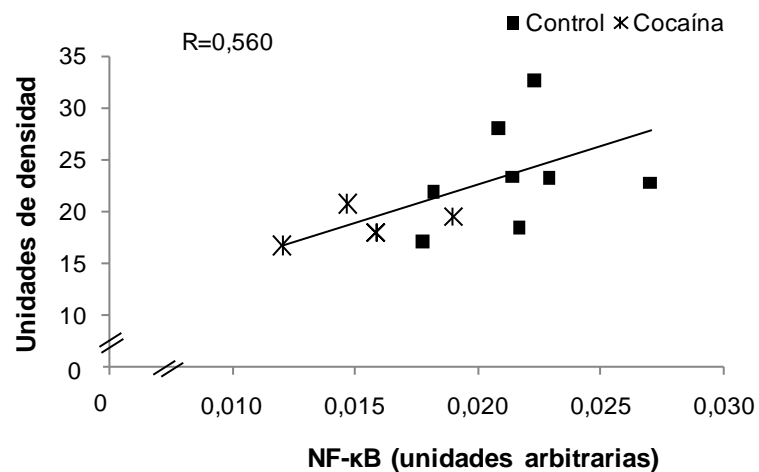


Figura 48: Representación de la correlación entre pCREB/CREB y la actividad de NF- κ B en hipocampo. $p = 0.046$.

5.2 Proteína quinasa A (PKA)

Se sabe que CREB es fosforilada por varias quinasas diferentes, entre ellas destaca la PKA, que fosforila a CREB en la serina 133. Se ha estudiado una subunidad que conforma esta proteína, PKA catalítica alpha (PKAc α), y se ha hallado que el nivel de esta proteína está disminuido en aquellos animales en los que la cocaína ha sido suministrada (Figura 49) en la corteza frontal.

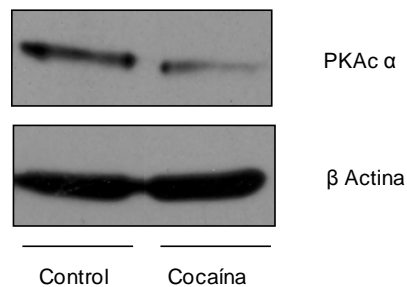


Figura 49: Representación del western blot de PKAc α (42 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.

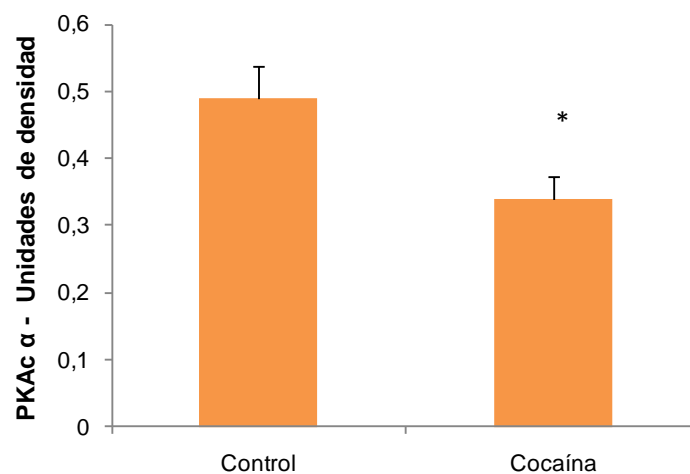


Figura 50: Representación de la cuantificación de PKAc α en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs grupo control. $n = 6$.

Cómo se demuestra en la Figura 51 existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre la subunidad alpha de la PKA y la actividad del factor de transcripción kappa B.

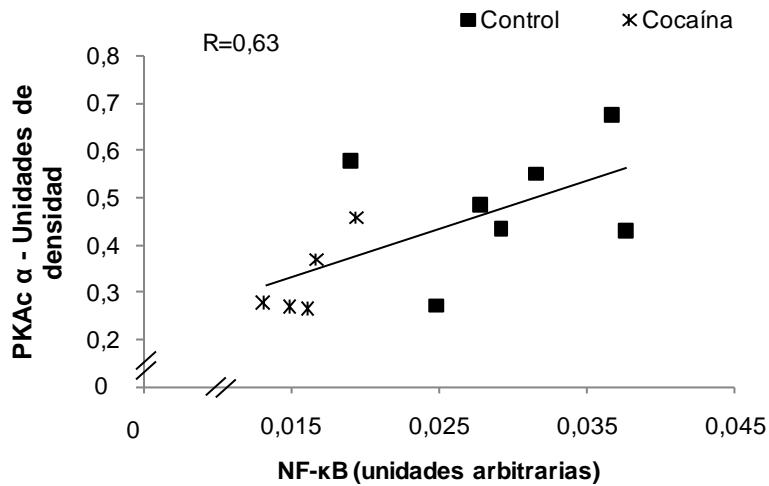


Figura 51: Representación de la correlación de PKAc α y actividad de NF- κ B en corteza frontal. $p=0.028$.

Los niveles de la PKAc α también se miden en hipocampo después de 36 días de consumo de cocaína. En la Figura 52 se observa que no existen diferencias en la expresión de esta proteína entre los animales controles y a los que se les ha administrado cocaína.

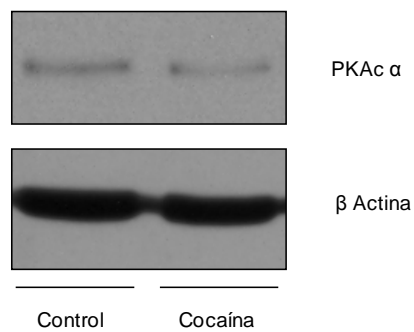


Figura 52: Representación del western blot de PKAc alpha (42 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.

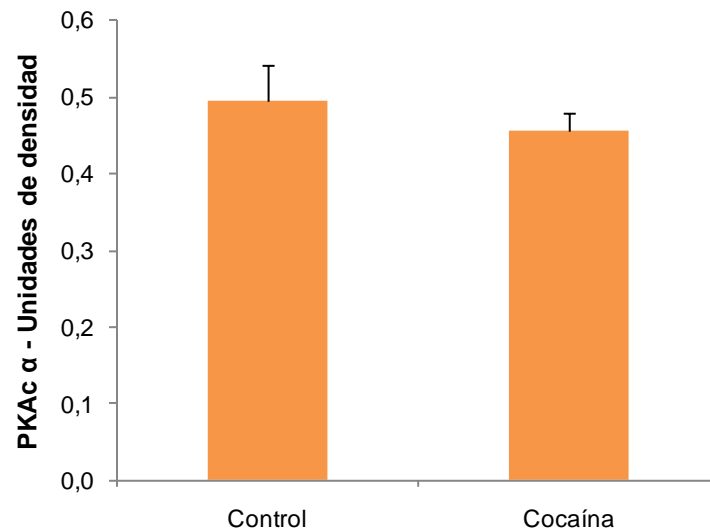


Figura 53: Representación de la cuantificación del western blot de PKAc alpha en hipocampo.
n=6.

5.3 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

En nuestro modelo experimental se observa una disminución de los niveles de BDNF después de 36 días de consumo de cocaína tal y como se muestra en la Figura 54, en la corteza frontal.

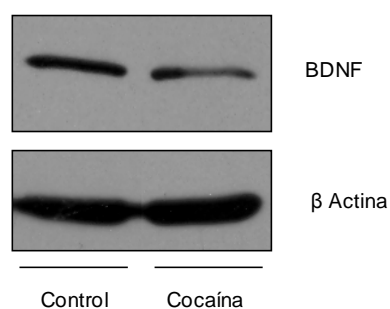


Figura 54: Representación del western blot de BDNF (20 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.

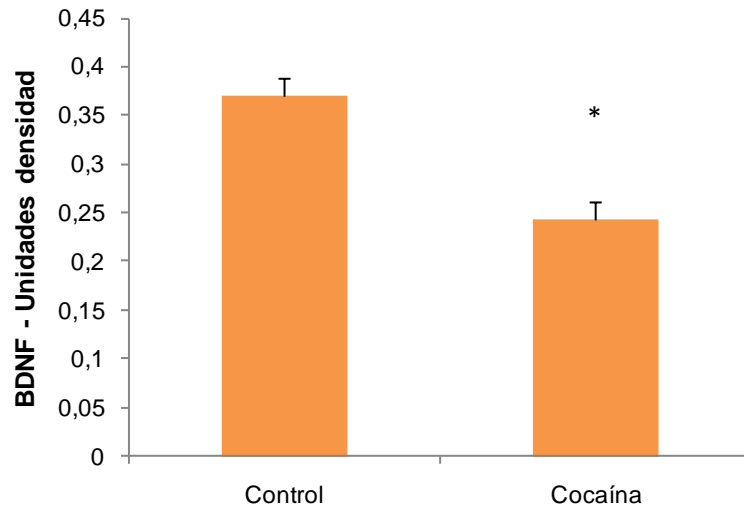


Figura 55: Representación de la cuantificación de BDNF en corteza frontal. * $p < 0.05$ vs grupo control. $n=6$

Por otro lado, cuando se relaciona la actividad de NF- κ B y los niveles de BDNF en la corteza frontal encontramos una correlación positiva que es estadísticamente significativa (Figura 56).

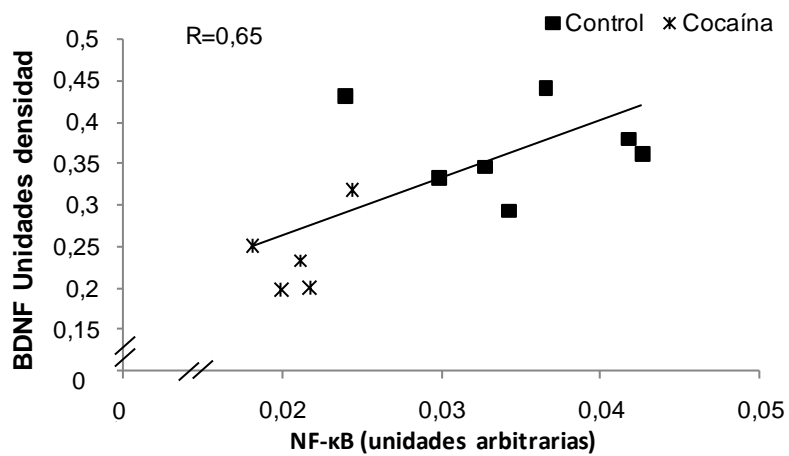


Figura 56: Representación de la correlación entre BDNF y la actividad de NF- κ B en corteza frontal. $p=0.022$.

En hipocampo después de un consumo prolongado de cocaína no hay cambios en los niveles de BDNF si se compara con el grupo no tratado, tal y como se observa en la Figura 57.

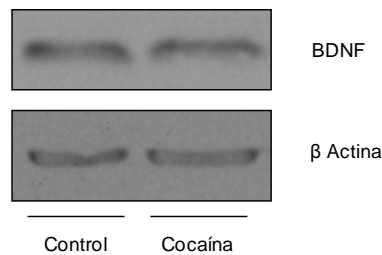


Figura 57: Representación del western blot de BDNF (20 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.

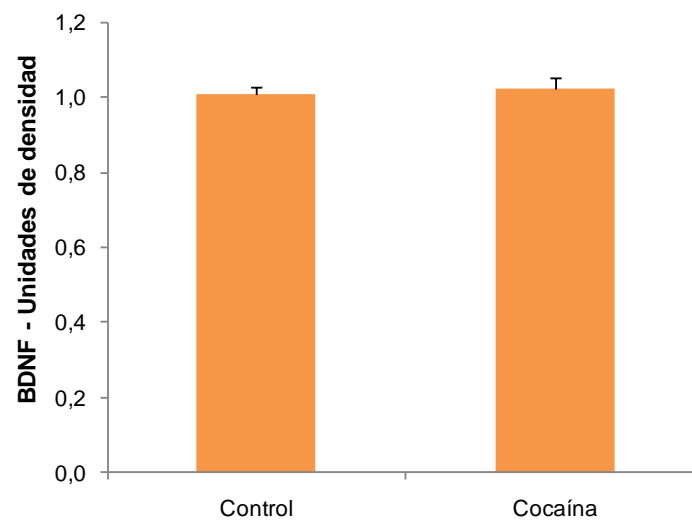


Figura 58: Representación de la cuantificación del western blot de BDNF en hipocampo. n=7.

5.4 Glutamato descarboxilasa (GAD65)

En la Figura 59 se muestran los niveles de la enzima GAD65. Tal y como se observa, la expresión de la proteína no se modifica después del tratamiento con cocaína, los niveles son iguales tanto en el grupo control como en el cocaína en la corteza frontal.

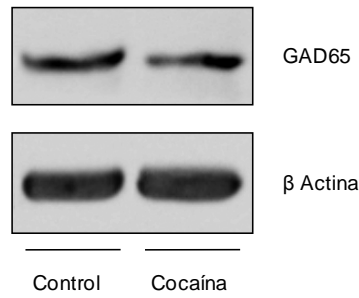


Figura 59: Representación del western blot de GAD65 (65 kDa) y β Actina (42 kDa) en corteza frontal.

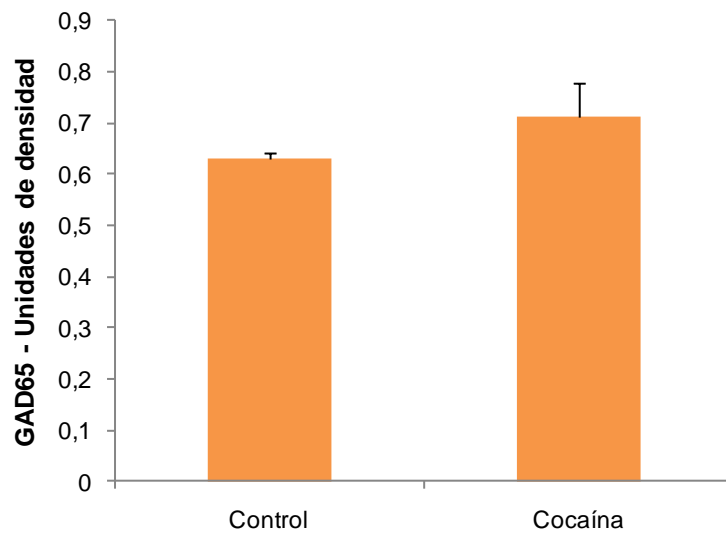


Figura 60: Representación de la cuantificación de GAD65 en corteza frontal. n=6.

En hipocampo también se ha estudiado la enzima GAD65, no observándose ningún cambio en los niveles de la proteína cuando se compara con los resultados del grupo control (Figura 61). Sin embargo, la actividad de NF-κB de hipocampo y los niveles GAD65 están correlacionados positivamente de forma significativa tal y como se muestra en la Figura 63.

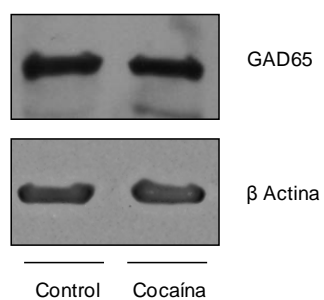


Figura 61: Representación del western blot de GAD65 (65 kDa) y β Actina (42 kDa) en hipocampo.

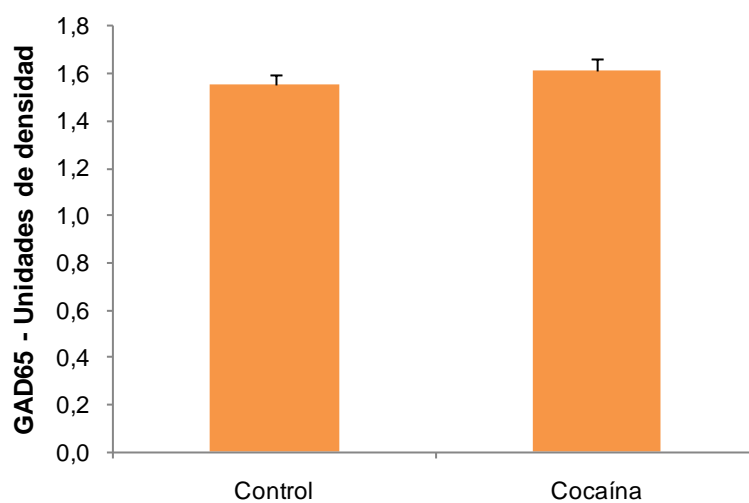


Figura 62: Representación de la cuantificación del western blot de GAD65 en hipocampo. n=6.

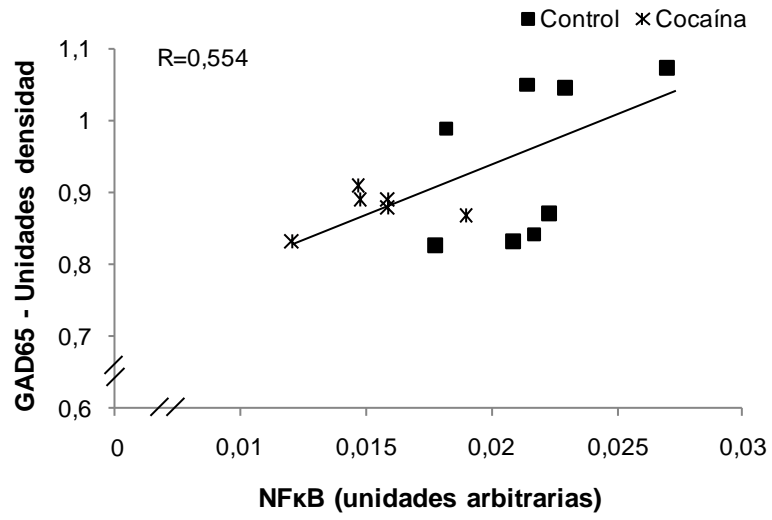


Figura 63: Representación de la correlación entre GAD65 y la actividad de NF-κB en hipocampo. $p=0.04$.

DISCUSIÓN

I. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 20 DÍAS Y TRATAMIENTO CON TOPIRAMATO

1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

Está ampliamente documentada la influencia del consumo de cocaína en el comportamiento. Se ha observado que la cocaína afecta a la memoria condicionada a la droga, de tal forma que se modifica el comportamiento, desarrollándose un comportamiento de búsqueda de drogas. Además es sabido que los circuitos involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje se ven afectados por el consumo de drogas (Chao and Nestler, 2004; Hyman et al., 2006; Kelley, 2004; Thomas and Malenka, 2003).

Con el fin de indagar en lo que sucede con la memoria espacial de experiencias aprendidas anteriormente al consumo de cocaína se ha diseñado una modificación del test del laberinto de agua de Morris. Para ello las ratas fueron entrenadas en la tarea explicada en el apartado de material y métodos. Antes de iniciar la administración de la droga, y 20 días después, el último día de administración de cocaína se volvieron a realizar tres nuevos pases. Se observó que las ratas tratadas con cocaína necesitaron más tiempo para realizar la tarea (aprendida previamente al tratamiento con cocaína) que el resto de grupos, tanto si se comparan los resultados del pase 10 (primero tras la administración de droga) entre los distintos grupos, como si se comparan con el pase 9 (último antes del tratamiento) (Figura 13 y Figura 14). Es importante resaltar que las ratas a las que se administra cocaína y se las trata con topiramato conjuntamente se comportan igual que las ratas controles, indicándonos que este fármaco antiepiléptico previene los efectos sobre la memoria causados por la cocaína. La modificación de la memoria condicionada al consumo de cocaína ha sido ampliamente estudiada y hay numerosos antecedentes que lo demuestran, sin embargo, no hay datos que demuestren el daño que provoca esta droga sobre la recuperación de la memoria. Ese trabajo demuestra por primera vez que la cocaína altera la recuperación de la memoria de experiencias previas adquiridas al consumo de cocaína. Además

se debe poner especial hincapié en que el topiramato previene este daño (Muriach et al., 2010).

Si nos centramos en el test de transferencia se observa, que las ratas tratadas con cocaína tardan menos tiempo en encontrar la plataforma en la nueva localización que el resto de grupos (Figura 15). Este resultado, que también se describe por primera vez en esta investigación (Muriach et al., 2010), tiene relación con la mejor adquisición de la tarea del laberinto de agua de Morris que se ha demostrado anteriormente, tras la administración de cocaína (delOlmo et al., 2007; delOlmo et al., 2006). El topiramato de nuevo consigue prevenir esta alteración observada en las ratas tratadas con cocaína.

El topiramato podría normalizar la memoria bien por su acción opuesta a la cocaína, o bien por sus características farmacológicas *per se* (antagonista de los receptores AMPA(GluR5)/kainato de glutamato (Kaminski et al., 2004)). El glutamato y sus receptores ejercen un papel clave en los procesos de memoria y aprendizaje, por lo tanto la acción continuada del topiramato sobre estos receptores pueden afectar a este comportamiento, cómo ha sido demostrado anteriormente (Muriach et al., 2010). Existe alguna controversia sobre cómo actúa el topiramato en la memoria, algunos estudios indican que la favorece (Nowakowska et al., 2009), en cambio en otros estudios se ha demostrado que induce un déficit en la memoria (Schmidt do Prado-Lima et al., 2011). La diferencia de los resultados se puede deber al tipo de memoria estudiada y también a la dosis de topiramato administrada (Martins de Lima et al., 2007). Si nos centramos en los resultados obtenidos, se puede descartar un efecto *per se* del topiramato sobre el tipo de memoria estudiada, ya que en el grupo control al que además se le administra topiramato, la memoria no está alterada (Figura 13). Heidegger (2010) corroboran este resultado, al demostrar que el topiramato no afecta a la PLP (Heidegger et al., 2010).

2. ACTIVIDAD DE NF-KB

Los resultados obtenidos en hipocampo, indican que a pesar de la disminución de las defensas antioxidantes tras la administración de cocaína (Figura 22 y Figura 23), la actividad de NF- κ B (conocida como sensor de situaciones de estrés oxidativo (Schmidt et al., 1995; Schreck et al., 1992)) no es superior a la de las controles (Figura 18).

Sin embargo, en la corteza frontal la actividad de NF- κ B no solo no aumenta, sino que desciende en animales tratados con cocaína con respecto a los controles (Figura 17). Además, el topiramato previene este descenso inducido por la cocaína. Este hecho es destacable y novedoso ya que no hay literatura publicada al respecto.

Si tenemos en cuenta que se ha postulado a NF- κ B como un regulador positivo del tono GABAérgico inhibitorio in vivo (O'Mahony et al., 2006), esta disminución de la actividad de NF- κ B en corteza frontal de ratas tratadas con cocaína, podría estar influenciando el descenso del tono inhibitorio GABAérgico que se sabe induce la cocaína (Gasior et al., 2004, Tseng and O'Donnell, 2004). El hecho de que entre los mecanismos de acción del topiramato se encuentre el incrementar las concentraciones GABA cerebrales en humanos (Kuzniecky et al., 1998; Petroff et al., 1999), nos permite establecer una posible relación entre NF- κ B y el topiramato. Por lo tanto la normalización de la memoria inducida por el topiramato (Figura 13) podría ser debida, en parte, a la recuperación de la actividad NF- κ B en corteza frontal, también inducida por el topiramato (Figura 17).

Es interesante destacar, que existen estudios que ponen de manifiesto un aumento de actividad del NF- κ B en el SNC en respuesta a diversos estímulos, como la respuesta inmune (Meffert and Baltimore, 2005). En cambio no existen investigaciones que pongan de manifiesto el descenso de su actividad. Por lo tanto, la disminución de la actividad de NF- κ B observada en nuestro modelo experimental podría estar relacionado con otras funciones que son propias del SNC, como puede ser la regulación tanto positiva o negativa de la expresión de genes que controlan cambios en la plasticidad sináptica y/o las funciones cognitivas (West et al., 2002). En relación a sus funciones en el SNC

se sabe que la falta de diferentes subunidades de NF- κ B, puede inducir daño en los procesos de aprendizaje y memoria (Kaltschmidt et al., 2006; Meffert et al., 2003; O'Mahony et al., 2006; Yang et al., 2011), como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, este factor de transcripción parece ser importante en el proceso de consolidación de la memoria (Freudenthal et al., 2005; Levenson et al., 2004; Merlo et al., 2002), al concluirse que la activación de NF- κ B es importante para la formación de memoria a largo plazo, sobre todo, aquella que depende de hipocampo, como sucede con la memoria espacial. Estas evidencias nos permiten relacionar la disminución de la actividad de NF- κ B en corteza frontal con el déficit de la memoria espacial tal y como se demuestra en la Figura 19. Además, el uso de la memoria en estas condiciones puede que sea más dependiente de la corteza frontal (Anagnostaras et al., 2001; Takehara et al., 2003) que del hipocampo. En este sentido, estudios previos revelan que el NF- κ B es activado en el núcleo sólo cuando la memoria debe ser recuperada (Merlo et al., 2005). Por lo tanto, el descenso de la actividad NF- κ B en la corteza frontal observada después de administrar cocaína podría estar contribuyendo a la alteración de la memoria que se ha demostrado.

3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La concentración de GSH y la actividad de GPx en hipocampo están disminuidas en ratas tratadas con cocaína con respecto a ratas controles (Figura 22 y Figura 23). Esta disminución en las defensas antioxidantes puede estar indicando un aumento de estrés oxidativo tras la administración de cocaína en esta área. Es importante destacar que, aunque otros autores han demostrado la existencia de estrés oxidativo en hipocampo de ratas tras una de exposición a cocaína intrauterina (Bashkatova et al., 2005; Bashkatova et al., 2006), existen poco estudios que lo demuestren en ratas adultas (Pomierny-Chamiolo 2013).

El principal efecto conocido de la cocaína en el SNC es la inhibición de la recaptación de DA (Nestler, 2005), que implica la acumulación de este neurotransmisor en la hendidura sináptica. Se sabe que la DA no secuestrada, puede incrementar el estrés oxidativo, debido a que durante el metabolismo de este neurotransmisor se generan RL, por medio de dos procesos, el primero de ellos se produce intracelularmente por medio de una enzima mitocondrial, monoamina oxidasa (MAO), generándose H_2O_2 , y el segundo mecanismo es por medio de la autooxidación de DA generando anión superóxido y de nuevo H_2O_2 (Hastings, 1995). Por lo tanto, es posible que la disminución de defensas antioxidantes en hipocampo se pueda deber, entre otros, a la acumulación y posterior oxidación de la DA, como ya ha sido postulado en el apartado de introducción.

Hemos demostrado que la cocaína ocasiona un déficit en la memoria (Figura 13) que, a la vista de los resultados de este estudio, podría ser debido a la depleción de GSH que esta droga ocasiona en hipocampo (Figura 22), dado que se han relacionado los bajos niveles de GSH con un daño en la plasticidad sináptica a largo y corto plazo (Almaguer-Melian et al., 2000). Además, Shukitt-Hale (1998) han demostrado que la depleción de GSH por medio de un inhibidor (butionina sulfoximida) induce un déficit en la memoria después de un aumento de estrés oxidativo inducido por la DA (Shukitt-Hale et al., 1998). De igual forma se ha demostrado en otros estudios, la necesidad de una función correcta de las defensas antioxidantes (GSH y GPx) para la formación de la memoria (Cruz-Aguado et al., 2001; Dean et al., 2009). Asimismo, es sabido que la formación de GSH se produce a partir de glutamato y que a su vez, el sistema glutamatérgico interviene de forma muy importante en la formación de memoria. Por lo tanto, la modificación del sistema GSH por la cocaína puede contribuir también a la modificación del comportamiento inducido por cocaína tal y como demuestran Uys (2011) (Uys et al., 2011) y esta investigación.

Entre los efectos de la cocaína también se encuentra la disminución del tono inhibitorio GABAérgico, por medio de la modulación de sus receptores (Frankowska et al., 2009; Gasior et al., 2004; Huang et al., 2007a; Liu et al., 2005). Una posible causa puede ser el aumento de las especies reactivas de oxígeno, puesto que es conocido que éstas pueden comprometer la inhibición

neuronal mediada por GABA (Sah et al., 2002). Más concretamente, una reducción de los niveles de GSH, (como la que hemos observado en nuestro estudio, Figura 22), puede llevar a una pérdida significativa de las concentraciones de GABA (Gramsbergen et al., 2002; Lyng and Seegal, 2008). Enlazando con esta idea, un estudio de Zheng (2007) (Zheng et al., 2007), demuestra que un agonista del receptor GABA(A), en parte, mejora la tarea espacial en ratas a las que se les ha inducido un estrés. En nuestro caso, se ha observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre la actividad de la enzima GPx en hipocampo (que está disminuida por la administración de cocaína), y la diferencia de latencia entre el pase 12 (último después del tratamiento) y el test de transferencia (plataforma cambiada de posición) (Figura 24) (en el grupo cocaína esta diferencia es mínima). Varios estudios han postulado una relación entre la enzima GPx y alteraciones en la memoria (Chiu et al., 2009; He et al., 2010). De la misma manera, en nuestro caso, la disminución de las defensas antioxidantes observada en el hipocampo (Figura 22 y Figura 23) en las ratas tratadas con cocaína puede contribuir a la potenciación de la tarea del test de transferencia en el laberinto de agua de Morris.

El topiramato es capaz de normalizar las defensas antioxidantes en el hipocampo (Figura 22 y Figura 23), y este es un dato destacable ya que no existen prácticamente datos en la literatura a este respecto (Kutluhan et al., 2009; Nazıroğlu et al., 2008). Estos posibles efectos antioxidantes pueden deberse a la inhibición de la anhidrasa carbónica (Dodgson et al., 2000), ya que Price (2012) han observado una reducción del estrés oxidativo inducido por la anhidrasa carbónica mitocondrial después de la administración de topiramato (Price et al., 2012). Sin embargo, no hay que olvidar que contrariamente a los resultados de este trabajo, se han observado un posible incremento de estrés oxidativo después de la adición del topiramato (Huang et al., 2007b; Pavone and Cardile, 2003), aunque se trata de estudios in vitro realizados en cultivos de astrocitos y de hepatocitos.

Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, el topiramato permite que las ratas tratadas con cocaína se comporten como las controles, en lo que a memoria espacial se refiere (Figura 13 y Figura 15). El hecho de

que el topiramato sea capaz de estimular las conexiones GABAérgicas podría justificar su efecto en las ratas tratadas con cocaína. Sin embargo, hay que tener también en cuenta que en nuestro estudio el topiramato normaliza los valores de GSH y GPx en hipocampo (Figura 22 y Figura 23), lo cual podría contribuir a mejorar el tono GABAérgico. Además, dada la correlación que presentamos entre la actividad GPx en hipocampo y la tarea del test de laberinto de agua de Morris (Figura 24), bien podría ser, que el efecto del topiramato sobre las ratas tratadas de cocaína estuviera ligado a esta posible propiedad antioxidante.

En cuanto a la corteza frontal no existen diferencias en la concentración de GSH (Figura 20) y en la actividad de GPx (Figura 21) entre los diferentes grupos estudiados. Este resultado está en consonancia con los estudios obtenidos por otros grupos, en los cuales no observan cambios en los marcadores de estrés oxidativo en la corteza frontal después de administrar 10 mg/kg de cocaína (Macêdo et al., 2005). No obstante, otros autores si observan un incremento de la actividad GPx en corteza frontal después de la administración de cocaína, sin embargo en este estudio la dosis de cocaína es más elevada (Dietrich et al., 2005).

4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3

La proteína caspasa 3 es una intermediaria en la ruta de la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Annunziato et al., 2003). Además, el NF- κ B también puede participar en los procesos apoptosis, como ya se ha indicado anteriormente, pudiendo tener efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Barkett and Gilmore, 1999). Por todo ello, se planteó el estudio de la activación de Caspasa 3 en nuestro modelo experimental.

Tal y como se muestra en la Figura 25, no existe activación de esta proteína en ninguna de las dos áreas estudiadas, corteza frontal e hipocampo respectivamente, confirmándose que el descenso de la actividad de NF- κ B en corteza frontal en ratas a las que se les ha administrado cocaína no está relacionado con los procesos apoptóticos, al menos por los inducidos por la vía

de las caspasas. Ni que el posible aumento de estrés oxidativo ocurrido en hipocampo desencadene apoptosis en esta área.

Estos datos están en consonancia con otros estudios como el de Dietrich (2005) (Dietrich et al., 2005) que en el estriado y corteza frontal de ratas no observan activación de caspasa 3 con una dosis de cocaína más elevada. Otros autores, sin embargo, si han descrito la activación de caspasa 3 tras administrar cocaína, pero hay que resaltar que se trata de estudios in vitro (Cunha-Oliveira et al., 2006; Dey et al., 2007; Novikova et al., 2005). Pero por lo general los resultados hallados en este trabajo corroboran el hecho de que los efectos tóxicos de la cocaína a dosis normales no provocan muerte celular programada (Dominguez-Escriba et al., 2006; Oliveira et al., 2003).

5. HISTOQUÍMICA DE NADPH-DIAFORASA

El número de células NADPH-diaforasa aumenta en la capa subgranular de giro dentado de hipocampo a causa de la administración de cocaína, indicando que el número de neuronas con la enzima nNOS aumenta por algún efecto de la cocaína (Figura 28). Es de sobra probada la relación entre la adicción a cocaína y la enzima NOS. Así se ha relacionado la NOS con los procesos de transmisión de DA (Balda et al., 2009; Volz and Schenk, 2004), comportamiento de sensibilización a la cocaína (Balda et al., 2008), la abstinencia inducida por la retirada de la droga (Rawls et al., 2006), el comportamiento de autoadministración de drogas (Collins and Kantak, 2002) o el aprendizaje condicionado de preferencia de lugar (“conditioning place preference”) (Itzhak and Anderson, 2007). Además, la ruta del óxido nítrico está implicada en el incremento progresivo de la excitabilidad en el SNC después de administración repetitiva de cocaína (Przewlocka et al., 1994).

Existe una interacción entre la DA, glutamato y el óxido nítrico en los circuitos mesolímbicos y corticostriales, corroborando la idea de que el óxido nítrico puede contribuir a los efectos de la cocaína en el SNC. Además se ha demostrado que la administración sistémica de cocaína incrementa significativamente el flujo de óxido nítrico en el estriado dorsal (Lee et al.,

2010). Por otro lado, otros autores también han demostrado una afectación de la enzima nNOS por la cocaína en hipocampo, pero en este caso un incremento en su actividad (Bhargava and Kumar, 1997), corroborando el dato obtenido en nuestra investigación (Figura 28).

Entre la enzima nNOS y el receptor de glutamato NMDA (necesario para la formación de memoria en hipocampo) existe una relación estructural (Christopherson et al., 1999). De hecho, la activación de los receptores de NMDA provoca un aumento del flujo de Ca^{2+} activando a las proteínas Calmodulinas, necesarias para el correcto funcionamiento de NOS tal y como se ha explicado en el apartado de introducción. Por lo tanto se podría establecer una relación entre la mejora en el aprendizaje inducido por la cocaína y el aumento de nNOS en hipocampo, tal y como hemos demostrado (Figura 29). De hecho, la cocaína también induce un aumento de la acción de los receptores NMDA por medio del aumento de la transmisión dopaminérgica (Zhang et al., 2009), contribuyendo también al aumento de la actividad de nNOS (Bhargava and Kumar, 1997).

Igualmente se sabe que el óxido nítrico es necesario para la generación de PLP (Schuman and Madison, 1991) y por lo tanto necesario para los procesos de memoria y aprendizaje. De hecho existen numerosos estudios que demuestran que la falta de óxido nítrico induce un déficit en la memoria espacial (Chapman et al., 1992; Estall et al., 1993). Otros estudios con ratones “knock out” de nNOS y a los que se realiza el test espacial del laberinto de agua de Morris, demuestran un empeoramiento en la ejecución de la tarea (Kirchner et al., 2004). También se sabe que la expresión de la NOS neuronal en el giro dentado de hipocampo y en la corteza frontal aumenta significativamente tras la realización de una tarea similar al laberinto de agua de Morris (Zhang et al., 1998).

El hecho de que se haya encontrado el aumento de las células NADPH diaforasa positivas en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo (Figura 28) es muy interesante, ya que este área en concreto está relacionada con la formación de nueva memoria. Esto es así porque un proceso fundamental ocurre en esta capa, la neurogénesis en adultos (Kempermann

and Gage, 2000; Lledo et al., 2006), y la formación de nuevas neuronas en el hipocampo está íntimamente relacionada con la formación de memoria espacial (Herrera et al., 2003; Snyder et al., 2005).

Por todos los antecedentes anteriormente expuestos, el incremento que observamos en el número de células NADPH-diaforasa en el giro dentado de animales tratados con cocaína puede estar relacionado con la mejora en la ejecución del test del laberinto de agua que se observa en estos animales. De hecho, la Figura 29 muestra una correlación positiva estadísticamente significativa entre el aumento de células NADPH-diaforasa en el giro dentado de hipocampo y la diferencia entre el pase 12 (último después del tratamiento) y el test de transferencia.

Por último, tal como ocurre con otros parámetros, se destaca el hecho de que el topiramato es capaz de mantener el número de células NADPH diaforasa positivas similar al de las controles en la capa subgranular del giro dentado de hipocampo de ratas tratadas con cocaína (Figura 28). Este efecto del topiramato puede contribuir también, por tanto, a la normalización en la ejecución del test del laberinto de agua de Morris en los animales tratados con cocaína.

II. ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA DURANTE 36 DÍAS

1. TEST DE LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

La administración de cocaína durante 36 días provoca un daño en la memoria, como se muestra en la

Figura 30, siendo la latencia del grupo cocaína significativamente mayor, con respecto al grupo control. Se confirma por lo tanto, que la cocaína daña la memoria de experiencias adquiridas previo al consumo de la misma, el daño en la memoria se mantiene con el aumento del consumo de cocaína.

Aunque el principal efecto de la cocaína cuando se administra de forma aguda es inhibir la recaptación de DA, y por lo tanto aumentar la DA libre en la hendidura presináptica (Nestler, 2005), el consumo crónico se relaciona con una hipoactividad de la DA: por un lado, se induce una menor liberación de DA (Martinez et al., 2007; Volkow et al., 1997) y por otro lado menor disponibilidad de los receptores D2 (Briand et al., 2008; Nader et al., 2006; Volkow et al., 1993). Se podría relacionar este descenso de la actividad de la DA inducida por la cocaína con el daño en la recuperación de la memoria, dado que, existe una relación entre los procesos de aprendizaje y memoria, y la DA (Rinaldi et al., 2007). Concretamente es sabido que la DA controla el mantenimiento de la memoria a largo plazo por medio de los receptores D1 en la región dorsal del hipocampo (Bethus et al., 2010).

La afectación de la memoria por la cocaína ha sido demostrada anteriormente por numerosos investigadores (Achat-Mendes et al., 2007; George et al., 2008; Iñiguez et al., 2011; Ramirez et al., 2009), como mecanismo que pudiera contribuir al desarrollo de la adicción a drogas. En este trabajo, lo que demostramos es la afectación de la recuperación de la memoria espacial de experiencias adquiridas con anterioridad al consumo de cocaína.

2. ACTIVIDAD DE NF-KB

Un descenso de la actividad de NF- κ B en hipocampo y corteza frontal se ha demostrado por el efecto de la cocaína (Figura 34 y Figura 35). Tal y como se ha postulado anteriormente, la neuroadaptación más importante de la cocaína administrada de forma crónica es el descenso de la disponibilidad de los receptores D2 (Volkow et al., 1993), y si tenemos en cuenta que estos receptores D2 regulan la actividad de NF- κ B (Takeuchi and Fukunaga, 2004; Yang et al., 2003), se puede establecer una relación entre el descenso de la actividad de NF- κ B y los efectos de la cocaína administrada a largo plazo.

En la Figura 36 demostramos una relación estadísticamente significativa entre la disminución de la actividad de NF- κ B en la corteza frontal y el déficit en la memoria espacial, tal y como se había hallado a los 20 días de

administración de la droga. Ya se ha nombrado anteriormente la importancia de NF- κ B en la formación de la memoria, pero también es importante en la recuperación de la memoria, tal y como demuestran Boccia (2005) (Boccia et al., 2005) y nuestros resultados.

Varios autores han demostrado la influencia de NF- κ B en la plasticidad sináptica (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009; Marini et al., 2004; Mattson and Meffert, 2006; Mémet, 2006) y por otro lado, es de sobra conocido que la cocaína también induce cambios en la plasticidad sináptica relacionados con modificaciones en la memoria y el aprendizaje (Chao and Nestler, 2004; Hyman et al., 2006; Jones and Bonci, 2005; Kelley, 2004; Nestler, 2002; Thomas et al., 2008; Thomas and Malenka, 2003). Debido a ello, es posible que los cambios en la plasticidad sináptica relacionados con la administración crónica de cocaína, especialmente en la recuperación de la memoria espacial, puedan ser mediados por NF- κ B, tal y como nosotros demostramos (Figura 36).

Se ha documentado que la prevención de la unión de NF- κ B a su secuencia consenso en el ADN reduce la magnitud de la PLP en hipocampo (Albensi and Mattson, 2000), y como es sabido, la PLP es la base de la formación de memoria en hipocampo (Bliss and Collingridge, 1993). Según estos antecedentes, se podría relacionar también el daño en la recuperación de la memoria (Figura 30 y Figura 31) con el descenso de la actividad de NF- κ B en el hipocampo (Figura 35) de las ratas a las que se les ha administrado cocaína.

3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La cocaína tras 36 días de administración, no disminuye las defensas antioxidantes endógenas, en ninguna de las áreas estudiadas, en corteza frontal e hipocampo (Tabla 12). Anteriormente habíamos demostrado una disminución de GSH y GPx en el hipocampo de ratas tratadas con cocaína (Muriach et al., 2010), esta aparente contradicción en nuestros resultados, parece resolverse si tenemos en cuenta que el aumento de estrés oxidativo inducido por la cocaína, se puede deber al aumento de la DA libre y su

posterior autoxidación (Hastings, 1995). Así, dado que ya se ha indicado que tras el consumo prologando de la cocaína se puede producir una depleción de la DA libre como mecanismo de adaptación (Martinez et al., 2007; Volkow et al., 1997), es lógico que disminuya también el proceso de autoxidación, y con él, la producción de especies reactivas de oxígeno.

4. ACTIVACIÓN DE CASPASA 3

La cocaína cuando se administra de forma crónica durante 36 días no induce activación de caspasa 3 en las áreas estudiadas, corteza frontal e hipocampo (Figura 41), y tampoco se producen cambios en la proteína precursora (Figura 42 y Figura 43), tal y como ocurría tras 20 días de administración. Por lo tanto, se puede concluir que la cocaína no induce apoptosis por medio de esa vía, en ninguna de las áreas estudiadas.

Este resultado se podría esperar, ya que, la administración de cocaína no provoca tampoco aumento de estrés oxidativo a este tiempo (Tabla 12), y esta caspasa es una intermediaria en la ruta de la apoptosis inducida por este tipo de estrés (Annunziato et al., 2003). De hecho numerosos autores no encontraron indicio de apoptosis inducido por la cocaína (Alvaro-Bartolome et al., 2011; Dietrich et al., 2005; Dominguez-Escriba et al., 2006; Oliveira et al., 2003). Sin embargo, otros describieron activación de caspasa 3 tras administrar cocaína, pero estos estudios se han realizado en cultivos celulares (Cunha-Oliveira et al., 2006).

5. ESTUDIO DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

La cocaína afecta ampliamente al SNC, el principal efecto de esta droga es el aumento de la DA en la hendidura sináptica. Varios autores demuestran la influencia de este neurotransmisor en los procesos de memoria y aprendizaje (Bethus et al., 2010; Li et al., 2003; Rinaldi et al., 2007; Rossato et al., 2009).

Sobre todo por la actuación de la DA en los receptores D1, ya que la activación de estos receptores están involucrados en la formación de la memoria por su asociación a proteínas Gs (Hartman and Civelli, 1996). La DA cuando actúa sobre estos receptores activa la PKA por medio del AMPc, esta quinasa fosforila al factor de transcripción CREB induciendo la activación de genes inmediatos como cFOS, y genes que intervienen en los procesos de memoria y aprendizaje (Bethus et al., 2010; Jay, 2003; Nestler and Aghajanian, 1997). En el hipocampo, área fundamental de la memoria, los receptores mayoritarios de DA son los de la familia D1 (Niznik and Van Tol, 1992). Por lo tanto, se puede decir, que el descenso demostrado de la fosforilación de CREB en el hipocampo después de la administración de cocaína (Figura 46 y Figura 47) puede ser inducido por el descenso de la función dopaminérgica también documentada (Martinez et al., 2007; Volkow et al., 1997), y responsable en parte del daño observado en la memoria (Figura 30). De hecho, se ha demostrado que una depleción de DA en la corteza prefrontal y en el hipocampo induce un daño en el aprendizaje y en la memoria (Gasbarri et al., 1996; Nelson et al., 2011). Además, la activación de CREB está demostrada en el hipocampo de ratas cuando desarrollan una tarea de memoria espacial, como sucede con en el test del laberinto de agua (Mizuno et al., 2002; Morris et al., 2006; Porte et al., 2008), por lo tanto el descenso de la fosforilación de CREB en hipocampo (Figura 46 y Figura 47) podría estar relacionado con el daño en la memoria.

Por otro lado, el factor de transcripción CREB ha sido estudiado en relación con las drogas (Pandey et al., 2004), en concreto a la cocaína se ha estudiado en el NAc, centro de la recompensa. Se sabe que la activación de CREB varía en el núcleo con diferentes consecuencias (Carlezon et al., 2005; Marin et al., 2009; McClung and Nestler, 2003; Riday et al., 2012). Concretamente, Malvaez (2011) han descubierto que la inactivación de CREB en NAc, podría estar relacionado con el daño en la memoria asociada a cocaína (Malvaez et al., 2011). En referente a las áreas estudiadas en este trabajo, el hipocampo y la corteza frontal existe muy poca información al respecto (Edwards et al., 2007).

Dado que CREB y NF- κ B están involucrados en la formación de memoria y en la plasticidad sináptica (Bourtchuladze et al., 1994; Kandel, 2001; Lopez de

Armentia et al., 2007; Meffert et al., 2003) es interesante estudiar si existe una conexión entre ambos factores de transcripción en este modelo de cocaína crónica. De hecho, Kaltschmidt (2006) sugirieron una nueva cascada transcripcional donde NF- κ B podría controlar la ruta de CREB por medio de la expresión de la PKA (una de las quinasas que fosforila a CREB), en concreto la PKA catalítica alfa (PKAc α) (Kaltschmidt et al., 2006). La conexión entre NF- κ B y CREB se demuestra en nuestro trabajo mediante la correlación positiva estadísticamente significativa puesta de manifiesto entre ambos factores en el hipocampo (Figura 48). Sin embargo, los niveles de la PKAc α no cambian en este área después de la administración de la cocaína (Figura 52 y Figura 53), sugiriendo que en hipocampo el NF- κ B podría estar regulando a CREB por otras rutas, ya que es conocido que otras quinasas fosforilan a CREB en el mismo aminoácido que la PKA (serina 133), como ERK (Mattson et al., 2005) y la CaMIV (Kasahara et al., 2001). Además, por otro lado, es bien conocido que CREB y NF- κ B tienen reguladores comunes, como la quinasa activada por mitogen y estrés 1 “mitogen and stress activated kinase 1” (MSK1) (Deak et al., 1998; Vermeulen et al., 2003). De hecho, esta proteína también se modifica por la acción de la cocaína (Bertran-Gonzalez et al., 2008), la modificación de CREB podría estar mediado por este mitogen.

Contrariamente a lo que se produce en el hipocampo, los niveles de pCREB no varían en la corteza frontal de las ratas tratadas con cocaína después de 36 días de administración (Figura 44 y Figura 45), pero tal y como se muestra en la Figura 49 y Figura 50, existe una reducción de los niveles de PKAc α en este área. De hecho también, se debe resaltar que estos niveles correlacionan de una forma positiva con la actividad de NF- κ B (Figura 51), confirmando la conexión entre NF- κ B y CREB via PKAc α propuesta por Kaltschmidt (2006) (Kaltschmidt et al., 2006). Dado que PKA por si sola está relacionada con los procesos de memoria (Grimes et al., 2012; Isiegas et al., 2006; Koh and Bernstein, 2003), el descenso observado en los niveles de PKA en la corteza frontal después de la administración de cocaína (Figura 49 y Figura 50) podría también contribuir al daño en la recuperación de la memoria (Figura 30), tarea que además es más dependiente de corteza frontal que del hipocampo (Takehara et al., 2003).

Por otro lado, tal y cómo se muestra en las Figura 54 y Figura 55, se ha observado un descenso de los niveles de BDNF en la corteza frontal en las ratas tratadas con cocaína. BDNF es una proteína regulada por CREB (Tao et al., 1998), también está implicada en la plasticidad sináptica, y en los procesos de memoria y aprendizaje (Callaghan and Kelly, 2012; Hemmerle et al., 2012; Leibrock et al., 1989; McCarthy et al., 2012; Mizuno et al., 2012). Por lo tanto, el descenso de BDNF podría también contribuir al daño en la recuperación de la memoria observada después de la administración de cocaína (Figura 30). De hecho, se sabe que cambios en la expresión de BDNF son importantes en la formación de la memoria asociada a la droga (Maze and Nestler, 2011). Al mismo tiempo, es importante destacar que, BDNF podría estar regulada también por NF- κ B (Marini et al., 2004), esta alternativa además, se ajusta con la correlación positiva estadísticamente significativa, demostrada en nuestra investigación, entre los niveles de BDNF y la actividad de NF- κ B en la corteza frontal (Figura 56).

Se ha propuesto a NF- κ B como modulador crítico en la homeostasis entre la función neuronal inhibitoria y excitatoria (O'Mahony et al., 2006). En concreto animales que no expresan NF- κ B, tienen incrementada la PLP, potenciando la actividad exploratoria, presentando mayor incidencia de crisis, y mejorando en la ejecución de varios tests de aprendizaje espacial (O'Mahony et al., 2006). Curiosamente estas son las características que se observan en ratas después de la administración de cocaína (deOlmo et al., 2006; Gasior et al., 2004; Huang et al., 2007a). No solo eso, sino que estas características coinciden con la habilidad de la cocaína (probablemente debido a su influencia negativa sobre la actividad GABAérgica), de potenciar las señales excitatorias (Freund and Buzsaki, 1996). Además, por si sola, la cocaína también provoca un descenso del tono inhibitorio GABAérgico, por medio de la modulación de sus receptores (Frankowska et al., 2009; Gasior et al., 2004; Huang et al., 2007a; Liu et al., 2005). En este sentido, es importante decir NF- κ B también se ha postulado como un regulador positivo para el establecimiento del tono GABAérgico inhibitorio in vivo (O'Mahony et al., 2006). Así, la síntesis de GABA está regulada por una enzima, la glutamato descarboxilasa en el cerebro de mamíferos (Soghomonian and Martin, 1998), cuya isoenzima 65, O'Mahony

(2006) han postulado que está regulada NF- κ B (O'Mahony et al., 2006). En nuestro estudio, aunque no se ha hallado un cambio en la GAD65 después de la administración de cocaína, si hemos observado que en hipocampo existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de GAD65 y la actividad de NF- κ B (Figura 63), dando soporte a la relación entre ambas proteínas.

En resumen, los datos aportados por esta tesis ponen de manifiesto el papel crucial de la actividad de NF- κ B y de CREB en el daño de la recuperación de la memoria espacial inducido por la administración de cocaína, así como un posible papel protector de del topiramato ante algunas consecuencias de la cocaína.

CONCLUSIONES

1. La cocaína administrada en ratas con una dosis de 15 mg/kg altera el aprendizaje, y la recuperación de la memoria de experiencias previas a la administración de la droga.
2. La actividad de NF- κ B en la corteza frontal está disminuida tras 20 y 36 días de administración de cocaína, y se relaciona con el déficit en la recuperación de la memoria.
3. La cocaína induce una disminución de las defensas antioxidantes (GSH y actividad de GPx), así como un aumento de la actividad de la enzima nNOS, tras 20 días de administración de la droga. Tanto la disminución de la actividad GPx, como el incremento de nNOS, correlacionan con la mejor adquisición de nuevas tareas en el laberinto de agua de Morris.
4. La administración de cocaína durante 36 días induce una disminución de la activación de CREB en hipocampo. Además, en la corteza frontal la expresión de PKAc α y BDNF también están disminuidas pudiendo relacionarse con la disminución de la actividad de NF- κ B en dicha área, así como con el empeoramiento de la recuperación de la memoria.
5. El topiramato es capaz de prevenir todas las alteraciones observadas tras 20 días de administración de cocaína.

PhD THESIS
(Extended summary in
English)

**“Effect of cocaine consumption on
rat brain. Topiramate treatment”**

Presented by: Rosa López Pedrajas

Supervised by: Prof. Dr. Francisco Javier Romero Gómez

Prof. Dr. María Muriach Saurí

INTRODUCTION

1. ADDICTION

Drug addiction is a chronic disease in which relapse often occurs (Leshner, 1997) and it is characterized by compulsive seeking and use of drugs despite of the negative consequences drugs induce in the addict's life and those around him. Drug addiction is considered as a disease among other things because drugs lead to changes in brain structure and function. It is known that the initial decision to take drugs is usually voluntary; however, over time changes in cognitive function caused by the continued drug use can affect self-control and the subject's ability to make appropriate decisions. In this sense, the decision to stop consuming drugs becomes a complex goal (NIDA, 2008), since, drugs affect directly or indirectly the brain's reward system, whose central area is the nucleus accumbens (NAc), and whose main neurotransmitter is dopamine (DA) (Bard, 1998; Koob and Nestler, 1997). DA acts on brain regions that regulate movement, emotion, cognition, motivation and pleasure feelings. The reward system stimulation reinforces our natural behaviors typically linked to survival (eating, drinking, etc.), but it can be overstimulated producing euphoric effects in response to drugs. This reaction initiates a pattern that induces people to repeat behaviors of drug abuse.

As a result of the former, the brain adapts itself to excessive DA, producing less neurotransmitter, and reducing the functionality of DA receptors in the reward circuit. Furthermore, it is also known that addicts show a lower response to biological stimuli, because drugs reduce prefrontal cortex activity. Therefore, DA impact on the reward circuit can be decreased, and the user's ability to enjoy with drugs and activities that previously caused him pleasure could be reduced. This DA decrease requires the addict individual to continue using drugs. However, at this point, the addict individual needs to consume a greater amount of drug in order to increase DA level to its previous normal level. This effect is known as tolerance (Hyman and Malenka, 2001, NIDA, 2008).

The continued drug abuse can affect other neurotransmitters such as glutamate, which influences the reward circuit and also the ability to learn (McFarland et al., 2004). Drug abuse alters the optimal glutamate concentration, and the brain attempts to compensate it, and this fact can impair cognitive function. Drugs of abuse facilitate non-conscious learning (conditioning), which induces in the drug user an uncontrollable desire to take drugs when he is in a context associated with drug use, even when it is not present. Neuroimaging studies of addicts show changes in brain areas critical to judgment, decision making, learning, memory and behavior control (Kaufman et al., 1998; Volkow et al., 1999; Volkow et al., 1997). All these changes induce the addict to consume drugs compulsively despite drug adverse consequences (NIDA, 2008). Therefore drugs become more important than other aspects of the life, and all activities are directed toward drug consumption when the addiction is established (Hyman et al., 2006).

The most important pathways involved in addiction are:

- Dopaminergic mesolimbic pathway: It has mainly dopaminergic neurons whose cell bodies are located in the ventral tegmental area (VTA) and project their axons to the NAc, to the prefrontal cortex regions and to the amygdala among others (Gardner and Ashby, 2000; Rockville, 1996). This pathway is involved in emotions, memory, learning, and behaviors and planning execution (Di Chiara et al., 1999).

- Mesocortical pathway: The function of this pathway is to control the decisions, primarily using reward values associated with incentives to choose the appropriate action (Pierce and Kumaresan, 2006).

2. COCAINE

According to The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) cocaine consumption is a global problem. It was estimated that annual cocaine consumption prevalence among 15 to 65 years was between 0,3% and 0,5% in 2009, i.e. cocaine was consumed between 14.2 and 20.5 million people in this

age group. The largest cocaine market is the United States, with an estimated consumption of 157 tons, 36% of global consumption. The second cocaine market is Europe, particularly Western and Central Europe with an estimated consumption of 123 tons of this drug (United Nations Office on Drugs and Crime, 2011).

Focusing on Spain, cocaine is the second illegal drug most used after cannabis, and it is estimated that 2.3% of the population between 15 and 64 have used cocaine in the last 12 months (Observatorio Español Sobre Drogas, 2012). It is also estimated that 3.6% of adolescents between 14 to 18 years have used cocaine in the last 12 months (Observatorio Español Sobre Drogas,, 2010), therefore the cocaine consumption is not stable and far from being eradicated in our society.

2.1 Cocaine mechanisms of action

The main cocaine effect is the specific inhibition of monoamine transporter of presynaptic neuron. Thereby, it prevents the reuptake of DA but also serotonin and norepinephrine (Cunha-Oliveira et al., 2008; Nestler, 2005; Ritz et al., 1987). As a result, the concentration of these neurotransmitters increases in the synaptic gap, facilitating its binding to receptors and increasing its intense physiological action, particularly in the VTA and the NAc.

It is known that there are 5 kinds of DA receptors (D1-D5). These receptors can be classified into two pharmacological families known as D1 and D2. All receptors are G protein-coupled. The D1 receptors family (D1 and D5 subtypes) are coupled to Gs proteins that activate adenylate cyclase and stimulate the cAMP formation. In contrast, the D2 family (D2, D3 and D4 subtypes) is coupled to Gi proteins whose action is to inhibit the adenylate cyclase (Hartman and Civelli, 1996; Sibley et al., 1993). The D1 family has also been shown to activate the protein phospholipase C (PLC) (Undie et al., 1994), while the family of D2 receptors increases potassium conductance (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994) and attenuates calcium entry through voltage-gated channels (Missale et al., 1998).

It is known that D2 receptor activation mediates the acute effects of cocaine and is responsible, at least in part, of euphoria feeling. Also it enhances the reinforcing effects of cocaine-induced (Welter et al., 2007). In contrast, the activation of adenylate cyclase enzyme by D1 receptors, induces activation of immediate genes, that are main mediators of neuroadaptation after cocaine use, for example the cAMP response element binding (CREB) and cFOs (Seger, 2010; Thomas et al., 2008).

Cocaine can also increase glutamatergic activity mediated by D1 receptors (Kalivas and Duffy, 1998). Particularly, an increase of extracellular glutamate has been observed after cocaine administration (Pierce et al., 1996). It is also known that cocaine causes a decrease of GABAergic inhibitory tone, through modulation of its receptors (Gasior et al., 2004; Liu et al., 2005; Huang et al., 2007; Frankowska et al., 2009).

Cocaine consumption also reduces cerebral blood flow and this cerebral blood flow reduction is related to the pleasurable cocaine effects (O'Brien, 2006). Moreover, Volkow et al. described that there is a direct relationship between the rate of DA transporter occupancy and its pleasurable effects in human (Volkow et al., 1999).

Drug induces changes in the CNS that may lead to addiction development when cocaine is consumed during a long time. The main one is the decrease of D2 receptors available in striatum (Volkow et al., 2004; Volkow et al., 1990), which occurs when the DA supraphysiological levels remain for a long period of time. This neuroadaptation keeps the brain homeostasis, but the decrease of these receptors increases the vulnerability to cocaine consumption (Moore et al., 1998; Seger, 2010). In addition, the glutamatergic and GABAergic systems are affected (Bell et al., 2000).

3. TOPIRAMATE

Topiramate (Topamax ®) is an antiepileptic drug derived from the monosaccharide D-fructose (Maryanoff et al., 1987).

Topiramate has multiple action mechanisms. 1) It enhances GABAergic inhibitory activity (Gordey et al., 2000; White et al., 2000). 2) It blocks AMPA (GluR5)/kainate glutamate receptors (Kaminski et al., 2004). 3) It inhibits the neuronal activity of Na⁺ and Ca²⁺ voltage-sensitive channels (Gibbs et al., 2000, White, 2005). 4) In addition, topiramate slightly inhibits the activity of carbonic anhydrase (Dodgson et al., 2000).

A side effect of these action mechanisms is the reduction of DA release in corticomesolimbic system, which is known to be involved in reward and reinforcement mechanisms (Nuijten et al., 2011; Shinn and Greenfield, 2010). Moreover, topiramate is used as a therapeutic agent for drug addiction, because it can reduce the withdrawal symptoms associated to several abuse drugs (Zullino et al., 2004). Craving is one of the most difficult symptoms to treat in the addiction (George et al., 2001), as topiramate increases GABA it may be useful in the treatment of craving in patients with substance dependence. In fact, several recent clinical trials have demonstrated the topiramate efficacy in the attenuation of alcohol craving and its consumption (Anderson and Oliver, 2003; Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2004; Rubio et al., 2004; Johnson, 2005; Kenna et al., 2007). It has also been shown that topiramate promotes nicotine (Kenna et al., 2007; Khazaal et al., 2006) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) abstinence (Akhondzadeh and Underworld, 2005). In regard to cocaine addiction several investigators have supported the use of topiramate for treating this addictions (Johnson, 2005; Kampman et al., 2004; Karila et al., 2008; Nuijten et al., 2011; Preti, 2007; Sofuoglu and Kosten, 2006; Uys and Lalumiere, 2008; Muriach et al., 2010; Johnson et al., 2013). Cocaine and topiramate have opposite effects on the GABA and glutamate neurotransmitters, so this drug has been selected as a potential treatment for cocaine addiction. Furthermore, AMPA receptor plays a critical role in the cocaine seeking behavior and relapse, thus, topiramate could reduce relapse and cocaine use by blocking AMPA receptors (Gass and Olive, 2008).

4. MEMORY AND LEARNING

As mentioned above, drugs have the ability to modify the pathways involved in learning and memory associated with reward (Everitt and Robbins, 2005), to change behavior and to develop drug-seeking behavior.

Learning is a neurobiological phenomenon by which we acquire information, and memory is the process by which new information is retained (Bailey et al., 1996). Learning and memory are the most important mechanisms through which behavior can be altered (Kandel and Schwartz, 1982). Not everything we learn is beneficial because learning can also cause changes in behavior that are not always positive, and in extreme conditions constitute mental disorders.

Memory can be classified according to time during which it is effective: short-term memory and long-term memory. In addition, memory can be divided according to the nature of what is remembered, in declarative memory and nondeclarative memory.

One issue that may arise is how to transform short-term memory, which lasts from minutes to hours, in a long-term memory that lasts for days, weeks or even a lifetime. The first requires only covalent modifications of preexisting proteins while the long-term memory, more stable, needs growth and new synapses formation that requires gene expression and new proteins formation (Bailey et al., 1996).

A stimulus that triggers a short-term memory causes increased cAMP via activation of the adenylate cyclase. In turn, this cAMP activates protein kinase A (PKA) which enhances transmitters release: potassium channels are closed and the action potential is extended, because it enhances the Ca^{2+} flow required for certain molecules exocytosis that is important for memory formation (Byrne and Kandel, 1996). A repeated or prolonged stimulation induces long term memory. In this case, the activated PKA catalytic subunit translocates to nucleus and phosphorylates CREB, triggering immediate genes response, giving rise to generation of new synaptic connections (Bailey et al., 1996; Martin et al., 1997).

Hippocampus is the main brain area where declarative memory is stored in mammals. It high frequency stimulation occurs and an increase in synaptic

efficacy is developed, it can last hours or days, this process is called long-term potentiation (LTP). Furthermore, the LTP also has an early phase that does not require protein synthesis and a late phase based on similar molecular mechanisms of long-term memory (PKA-CREB) (Bailey et al., 1996; Kandel, 2001). Experiments related with LTP concluded that it requires: a) activation of synapse, and b) post synapse membrane depolarization. It is known that LTP can be initiated by activation of NMDA receptor, a glutamate receptor (Morris et al., 1986; Watkins and Jane, 2006). The NMDA receptor is found mainly along the hippocampal formation and controls the opening of Ca^{2+} channels which usually are blocked by Mg^{2+} (Malenka et al., 1988). The Ca^{2+} elevation induces the activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II (CAMKII) and protein kinase C (PKC) (Malinow et al., 1989) and induces the activation of other kinases such as PKA and extracellular signal-regulating kinase (ERK). These kinases phosphorylate the AMPA receptor increasing the sensitivity to glutamate, which contributes to the LTP maintenance (Kauer et al., 1988).

Thus, memory reactivation represents an opportunity for adaptive modifications, it can lead to plastic changes in the intensity of memory or maintain the relevance of memory in guiding future behavior (Lee, 2009).

4.1 Hippocampus

Hippocampus is an area related to the cerebral cortex that it is located inside the temporal lobe and is curved along the lateral ventricle. It is also part of the limbic system, the emotional part of the brain.

Hippocampus plays a fundamental role in memory, it also plays a key role in storing new information before it is consolidated (Squire, 1992). The information reaches the hippocampus once it is processed, where it remains active for a time. During that time, hippocampus provides a bidirectional relationship with different cortex regions, such as visual or auditory cortex. These bidirectional connections are essential for the consolidation process.

The hippocampal formation is located in the temporal lobe and includes the subiculum (area where the memory lies), the entorhinal cortex and hippocampus (Squire and Zola, 1996).

4.2 Frontal cortex

Prefrontal cortex is the brain region of integration due to the information it receives and sends from the sensory and to the motor systems, respectively. The prefrontal cortex contains almost a quarter of all the cerebral cortex and is localized in the lateral surface, medial and inferior frontal lobe. The frontal cortex is divided functionally into dorsolateral prefrontal cortex and orbitofrontal cortex. The orbitofrontal cortex has been associated with cognitive functions employed in the management of social knowledge. The dorsolateral prefrontal cortex has also been described as an associative area (Vendrell et al., 1995).

From a neuroanatomical point of view, different functional circuits within the prefrontal cortex have been described. On the one hand, the dorsolateral circuit is mainly related to cognitive activities such as working memory (Bechara et al., 2000, Courtney et al., 1998), selective attention, concepts formation and cognitive flexibility. On the other hand, the ventromedial circuit has been associated with emotional cues processing.

Regarding memory, frontal cortex plays a key role in the organization, search, selection and verification of stored memory (Shimamura, 2000). In addition, brain imaging studies have indicated that the cortex may also be involved in memory formation (Buckner et al., 1999). In fact, interactions between hippocampal CA1 area and an area of the frontal cortex during spatial memory encoding and retrieval have been described (Churchwell et al., 2010). Furthermore, it has also been shown the decrease of hippocampus function and an increase in the prefrontal cortex function, when the remote memory is necessary (Anagnostaras et al., 2001; Takehara et al., 2003), although if the memory is reactivated again, it could be dependent on hippocampus (Debiec et al., 2002).

4.3 Memory, learning and drugs

Both hippocampus and frontal cortex are involved in a number of cognitive functions (Della-Maggiore et al., 2000; Seamans et al., 1998), but are also related to addiction development. Thus, hippocampus is involved in drug addiction initiation and maintenance (Eisch and Mandyam, 2004) and frontal cortex is related to drug search (Volkow et al., 2003).

Addiction could represent an usurpation of neural mechanisms of learning and memory (Hyman, 2005). Moreover, several studies reveal similarities between drug actions and physiological processes of learning and memory (Chao and Nestler, 2004; Hyman and Malenka, 2001; Kelley, 2004; Nestler, 2002). In this sense, Ungless et al. demonstrated that cocaine could enhance LTP (Ungless et al., 2001). Although the mechanisms by which cocaine can induce this effect are not well understood, it may be because DA mediates long-term depression (LTD) inhibition.

Cocaine alters drug seeking behavior in order to facilitate it, and this occurs through learning of drug conditioned stimuli (Kelley et al., 2007; Ramirez et al., 2009; Théberge et al., 2010). Cocaine may alter memory stabilization during reconsolidation time (Lee et al., 2005; Miller and Marshall, 2005). However, there are still many questions about how cocaine interacts with memory and learning processes and it is also interesting to know its effect on other memories not so closely related to the drug, such as spatial memory.

4.4 cAMP response element binding (CREB)

CREB is a versatile transcription factor, since it regulates many genes involved in different functions of the CNS, the most important are cFos (Sheng et al., 1990), dynorphin (Carlezon et al., 1998), BDNF (Tao et al., 1998), GluR1 glutamate receptor (Borges and Dingledine, 2001), etc. It is active when is phosphorylated at serine 133 by the cAMP dependent protein kinase A (PKA), and becomes phospho-CREB (pCREB). CREB is also phosphorylated in the same serine by other kinases such as calmodulin-dependent Ca^{2+} IV (CaMIV)

and ERK (Kasahara et al., 2001; Lu et al., 2006). Activated CREB induces transcription of its target genes. There are several intracellular signaling pathways involved in the information transmission from membrane receptor to the nucleus, where they interact with CREB to trigger processes that culminate in gene transcription.

CREB is a critical protein for memory storage (Bailey et al., 1996; Kandel, 2001; Mizuno et al., 2002). Although learning and memory have an important role in addiction, CREB also influences other processes of this disease. For example, it is known that there is CREB activation after cocaine use in the NAc, mediating the reinforcing effects of this drug (Carlezon et al., 1998; Mattson et al., 2005; McClung and Nestler, 2003; Nestler, 2001). Furthermore, Self et al. demonstrated that an increase of CREB phosphorylation reduces the reinforcing effects of cocaine in the NAc, while an inhibition has opposite effects (Self et al., 1998). The pCREB increase could be induced after cocaine use due to the DA increase in the synaptic cleft. Therefore, D1 activation and pCREB increase. D1 receptors also play an important role in LTP and memory formation (El-Ghundi et al., 2007).

4.5 Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF is the most expressed neurotrophin in the CNS; it is present in hippocampus, cerebellum and cortex. It is an angiogenic factor and is also related to the vascular and hemodynamic response to ethanol. BDNF may be produced by astrocytes, under pathological conditions (Juric et al., 2006, Zafra et al., 1992), platelets (Karege et al., 2002), lymphocytes (Krause et al., 2008) and by the vascular endothelium.

MAPK pathway is one of the most important signaling pathways activated by BDNF, leading to ERK activation, the main effector of BDNF. In addition, ERK also activates CREB, thus it is possible to establish a close relationship between BDNF and CREB. In fact, as mentioned above, BDNF is also regulated by the transcription factor CREB (Tao et al., 1998).

Several studies suggest that BDNF and its signaling pathways are involved in many functions. It is involved in dopaminergic system differentiation and survival (Thoenen, 1995) and also is important in the modulation of neuronal plasticity (Lee et al., 2004). In fact, BDNF is involved in neurite growth and dendritic morphology regulation (Kuczewski et al., 2009; Poo, 2001). Both dopaminergic system such as learning and memory processes are modified by the continued cocaine abuse. In fact, it is known that BDNF is involved in neuroadaptive changes in dopaminergic and glutamatergic system after psychostimulant drugs consumption (Altar et al., 1992; Grimm et al., 2003; Pierce et al., 1999).

BDNF is also involved in other functions in relationship to cocaine use, for example BDNF increases after cocaine administration and withdrawal periods in different brain areas (Graham et al., 2007; Grimm et al., 2003). The increase in BDNF may be considered as a defensive strategy against the harmful cocaine effects (Fumagalli et al., 2009), or as a compensatory reaction to reinforcing efficacy decrease after cocaine consumption (Sadri-Vakili et al. 2010).

In summary, this neurotrophin participates in many different ways in cocaine addiction, and therefore is a key protein to study.

5. NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NF-KB)

The NF- κ B family is expressed in mammalian cells and is highly conserved across species. In mammals, this family (also known as Rel family) consists of 5 members: p50 (protein product NF κ B1 or p105), p52 (protein product NF κ B2 or p100), p65 (also known as RelA), c-rel and RelB. Members of the Rel family function as dimers and the 5 subunits can form homodimers or heterodimers.

All family members have a Rel homologous domain, which contains functional regions, as the region of DNA binding, dimerization, nuclear localization and interaction with inhibitory I κ B proteins, which masks the domains of nuclear localization and DNA binding (Baeuerle and Henkel, 1994).

The NF- κ B dimers are in a latent form in the cytoplasm bound to the inhibitory protein I κ B (Malek et al., 2001).

Among the NF- κ B target genes are I κ B family members indicating that NF- κ B activation limits its own. It is known that I κ B enters to nucleus and NF- κ B DNA binding site is separated (Zabel and Baeuerle, 1990; Zabel et al., 1993).

NF- κ B is a central mediator of human immune response. Therefore, many pathogens induce NF- κ B activation (Pahl, 1999). Furthermore, NF- κ B also regulates oxidative stress responses (Schreck et al., 1992); NF- κ B activation induces a variety of genes involved in response to oxidative stress, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) (Madrigal et al., 2001; Pahl, 1999).

The transcription factor NF- κ B is also involved in the programmed cell death process, with both pro-apoptotic as anti-apoptotic effects (Barkett and Gilmore, 1999; Blondeau et al., 2001; Brambilla et al., 2005; Fridmacher et al., 2003; Middleton et al., 2000). In fact it is known that the programmed cell death promotion or protection depends on the type and duration of stimulus and cell type (Clemens et al., 1997).

5.1 NF- κ B in the central nervous system

NF- κ B can be found in all CNS cell types including neurons, astrocytes, microglia and oligodendrocytes (O'Neill and Kaltschmidt, 1997), and it is involved in physiological functions of the CNS, both at the cellular and behavioral level. Moreover, some NF- κ B subunits are involved in neurogenesis (Denis-Donini et al., 2008).

The main active form of NF- κ B in the nervous system is the p65/p50 heterodimer (Guerrini et al., 1995; Kaltschmidt et al., 1993), moreover this dimer is also important within the synapse, because mice with a lack of p65 are deficient in NF- κ B in these structures (Meffert et al., 2003). It has also been documented that NF- κ B can be activated by the own synaptic transmission and in fact it has been observed that excitatory neurotransmitter glutamate activates

NF-κB in cerebellar granule neurons (Guerrini et al., 1995; Meffert et al., 2003), through Ca²⁺ ion, and is also regulated by other neurotransmitters such as DA (Luo et al., 1999; Takeuchi and Fukunaga, 2004). As we have mentioned above, NF-κB is involved in synaptic transmission regulation and in the synaptic plasticity. In fact, NF-κB can regulate (negatively or positively) gene expression that govern changes in synaptic plasticity and cognitive function (West et al., 2002).

There are many genes regulated by NF-κB with different functions in the CNS: PKAc alpha (Kaltschmidt et al. 2006), N-CAM, the β amyloid precursor (APP) (Grilli et al., 1995), BDNF (Lipsky et al., 2001), and μ-opioid receptor (Kraus et al., 2003).

Regarding drug abuse, NF-κB is activated in the NAc after cocaine administration (Ang et al. 2001; Russo et al., 2009), but there are no studies explaining the mechanisms by which this may be active. In addition, NF-κB can participate in cocaine toxic effects, for example it has been demonstrated that it regulates some genes related to cell death induced by cocaine (Lepsch et al., 2009; Novikova et al., 2005).

Moreover, NF-κB activity is positively modulated by D2 receptors, and it also regulates signaling via glutamate (excitatory neurotransmitter) and GABA (inhibitory neurotransmitter) (Furukawa and Mattson, 1998; Takeuchi and Fukunaga, 2004). This means that NF-κB could be a modulator of neuronal function homeostasis between inhibitory and excitatory, moreover, it is known this balance is damaged in cocaine addiction.

6. OXIDATIVE STRESS

Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the former (Sies and de Groot, 1992). Aerobic life is characterized by a constant formation of prooxidants balanced by their disappearance due to antioxidants.

Moreover, oxidative stress have been involved in the pathophysiology of several brain diseases such as Parkinson's disease (Adams et al., 1991, Danielson and Andersen, 2008), Alzheimer's disease (Adams et al., 1991; Cenini et al., 2008), post-traumatic epilepsy (Mori et al., 1990), and cerebral ischemia (Braugher and Hall, 1989), among others. This can be explained because the brain is susceptible to be attacked by oxidant agents, since it has a high oxygen consumption and easily oxidizable substrates (Nordmann, 1994). Similarly, it is noteworthy that the neurotoxic drugs of abuse effects have been repeatedly linked to oxidative stress (Almansa et al., 2009, Herrera et al., 2003; Johnsen-Soriano et al., 2007; Miranda et al., 2007; Sulzer and Zecca, 2000; Muriach et al., 2010).

6.1 Physiological role of free radicals

Some free radical processes are involved in learning and memory, because it has been described that they are necessary for the LTP generation (Klann, 1998). In fact, when NMDA receptor is activated, a process that occurs during LTP, the amount of superoxide increases (Bindokas et al., 1996). However, other researchers suggest that the induction of oxidative stress can damage memory and learning (Farooqui, 2008).

6.2 Pathogenic role of free radicals

Free radicals can alter directly or indirectly alter several cellular and physiological mechanisms through which they may cause neuronal death (Li et al., 2002; Paravicini and Touyz, 2008; Gupta et al., 2007; Svensk et al., 2004; Torchinsky and Toder, 2007). Free radicals can induce alterations in vital macromolecules, including DNA (inducing mutations), membrane lipids (inducing lipid peroxidation) or proteins (altering enzyme activities).

6.3 Antioxidant defenses

Detoxification of reactive oxygen species is one of the requirements for aerobic life, moreover, an important antioxidant defense system, made up of collectors and buffers that are called non-enzymatic antioxidants (vitamin C and E, glutathione, etc.), direct antioxidant enzymes, (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, etc.), and enzymes with secondary antioxidant activity, has developed contributing to the maintenance of other antioxidant systems (glutathione S-transferase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, etc.) (Sies, 1991).

6.3.1 Glutathione system

Glutathione system is the result of by the combination of the glutathione status and all enzymes related with their metabolism, which are also responsible of maintaining the redox state under physiological conditions (Meister and Anderson, 1983). Glutathione is a tripeptide (constituted by glutamic acid, cysteine and glycine) with interesting biological properties because of two structural characteristics: the γ -glutamyl link which protects it from peptidases, and the presence of a free thiol group (-SH) that makes it a very reactive compound (Meister and Anderson, 1983).

Glutathione can be found in the free thiol form (GSH), in oxidized form (GSSG) and as mixed disulphides, the most important GS-S-protein. The GSSG is regenerated back to its reduced form by NADPH-dependent glutathione reductase, which is constitutively active, so the GSH is the most abundant thiol to counter act oxidative stress in the cell (Ballatori et al., 2009).

Glutathione is related to the activity of several enzymes, the most important is the peroxidase activity, represented by glutathione peroxidase (GPx). GPx is an enzyme that contains selenium, which can reduce hydrogen peroxide (H_2O_2) to water by GSH oxidation. The function of this enzyme is to protect cell membranes from oxidative damage. The liver for example, one of the main loci for detoxification and that is exposed to high levels of oxidants, possesses a high activity of glutathione peroxidase (Van Vleet et al., 1981).

6.4 Oxidative stress and the dopaminergic system

Free DA is increased in the synaptic cleft after cocaine consumption. The activity of this neurotransmitter is regulated by two mechanisms, the first of them is DA reassimilation in the presynaptic neuron (70-80%), a function that is blocked by cocaine (Nestler, 2005), and the second is the DA metabolism (Amara and Kuhar, 1993). DA is also metabolized by two mechanisms, the first one is produced intracellularly by monoamine oxidase, a mitochondrial enzyme (MAO), generating H_2O_2 , and the second mechanism is the DA autoxidation generating superoxide anion and H_2O_2 (Hastings, 1995). DA is metabolized primarily by autoxidation when cocaine is consumed, generating large amounts of free radicals, being able to induce oxidative stress and cell death in dopaminergic neurons and adjacent neurons (Jones et al., 2000).

Given these evidences, we may assume that cocaine use can lead to an increase of oxidative stress and be one of the mechanisms by which cocaine damages the CNS. Indeed, changes in antioxidant defenses (Dietrich et al., 2005; Macedo et al., 2005; Muriach et al., 2010; Uys et al., 2011; Peraile et al., 2013; Pomierny-Chamiolo et al., 2013) and free radicals (Bashkatova et al., 2006; Numa et al., 2011) have been shown after cocaine consumption.

6.5 Cell death by apoptosis

Apoptosis provides the organism with a safe method to maintain tissue integrity, allowing removing damaged or abnormal cells without compromising neighboring cells (Kerr et al., 1972).

The apoptosis initiation is mainly linked to the activation of the related proteins Bcl-2 family. Bcl-2 belongs to a family of genomic products that can act as inhibitors proteins of apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1 and A1) or induce proapoptotic proteins (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik and HRK).

Cell death by apoptosis can occur as a result of exposure to physical agents, toxic agents, viral infection and other immunological mechanisms

(Hockenbery et al., 1993, Maiese et al., 2007). This heterogeneity of apoptosis promoters suggests that many mechanisms can lead cells to apoptosis.

The initial phase of apoptosis is characterized by the activation of a protease family called caspases; they are responsible of the dismantling and apoptosis execution. Caspases cut a variety of intracellular polypeptides that include structural elements of the cytoplasm and nucleus, components of the DNA repair machinery and a large number of protein kinases.

Eleven caspases have been described in human cells that cause well-defined protein degradation up to the formation of apoptotic bodies. Some caspases are "starter" and other "effector" of the catalytic mechanism, acting on endonucleases that are directly responsible of DNA fragmentation.

Caspases are regulated at post translational level, ensuring that they can be quickly activated. Caspases are initially synthesized as inactive zymogens (pro-caspases) with its classical structure consisting of a prodomain, a small subunit and large subunit. These molecules answer to stimuli, resulting in clustering of initiator caspases, allowing them to activate themselves and then proceed to activate effector caspases (Zou et al., 1997). In the case of caspase-3, its activation is highly correlated with the induction of apoptosis (Moreno et al., 2000, Ceccatelli et al., 2004).

Today, there are several studies linking the presence of oxidative stress as a triggering mechanism of mitochondrial apoptotic pathway. Annunziato et al. in studies with neuronal cultures, claimed the involvement of oxidative stress as a trigger of the caspase cascade by activating caspase-3 and leading to apoptotic death independent of Ca^{+2} concentrations (Annunziato et al., 2003). In addition, Donovan et al., demonstrated that the presence of free radicals is necessary to contribute to the apoptotic death of photoreceptors, and caspase-3 could be consider as the main trigger of apoptosis (Donovan et al., 2001).

The induction of apoptosis by some drugs of abuse has been widely documented. Thus, for example, it has been documented that after chronic consumption of alcohol, the number of hippocampal neurons that die by apoptosis increases (Herrera et al., 2003). In addition, alcohol also affects

neurons during brain development (Ullah et al., 2011). Amphetamine (Krasnova et al., 2005; Warren et al., 2007) and the opiates consumption (Tramullas et al., 2008) also causes neuronal death. Programmed cell death can occur by different pathways and the identification of the pathways induced by drugs of abuse can help to build strategies for the prevention of neuronal damage.

6.6 Nitric oxide and oxidative stress

Nitric oxide (NO) is a gas molecule characterized by its high lipid solubility and its short half-life. It has signaling functions in the central and peripheral nervous system. It is involved in many physiological and pathological processes in the brain, such as neurotransmission (Garthwaite et al., 1988), vascular tone (Palmer et al., 1987), immune system (Knowles et al., 1989) and cardiovascular system (Barañano et al., 2001). It also participates in the processes of neurogenesis, neuronal differentiation and development (Contestabile and Ciani, 2004; Estrada and Murillo-Carretero, 2005; Mize and Lo, 2000), memory, learning and other behaviors (Garthwaite, 2008; Golombek et al. 2004; Nelson et al., 2006; Susswein et al., 2004) and in other processes involved in neuropathology and/or neuroprotection (Calabrese et al., 2007; Contestabile et al., 2003; Dawson and Dawson, 1998; Keynes and Garthwaite, 2004). It has also been demonstrated that drugs of abuse may affect some aspects of the NO function (Bonthius et al., 2008, Loftis and Janowsky, 2000; Przewlocka et al., 1994).

Low NO levels may mediate protective effects generally, while its overproduction can induce tissue damage (Garthwaite, 2008). This damage can happen because there are also reactive nitrogen species (RNS) derived from the metabolism of NO. Nitric oxide, due to the unpaired electron orbital can be consider a radical itself, but it also reacts with molecular oxygen (Radi et al., 1991). Therefore, the concept of nitrosative stress appeare, which happens when there is an excessive or unregulated production of nitric oxide (Hausladen and Stamler, 1999).

Nitric oxide is synthesized from L-arginine in a reaction catalyzed by nitric oxide synthase (NOS) in the presence of oxygen and NADPH, which also generates L-citrulline and NADP⁺ (Knowles and Moncada, 1994). An interesting feature of NOS is that in the absence or low amounts of L-arginine, it produces ROS instead of NO (Heinzel et al., 1992). Therefore it can contribute to increase free radical levels.

There are two constitutive forms of NOS, endothelial (eNOS) present in endothelial cells and neuronal (nNOS). There is a third isoform called inducible (iNOS), which rarely occurs in physiological conditions, but can be expressed in many cell types (microglia, macrophages) in response to certain stimuli (Garthwaite, 2008).

Of the three isozymes, nNOS is the main form expressed in the brain (Liu et al., 2002), where nitric oxide is synthesized by specific neurons that express this isoenzyme (Bredt et al., 1990; Rodrigo et al. 1994).

HYPOTHESIS

Cocaine is a stimulant drug that causes addiction. It has many effects on the CNS, and can induce usurpation of neural learning and memory mechanisms under normal circumstances. It can also lead to impaired cognition, learning and memory. However, the molecular mechanisms by which cocaine cause such damage are still not well known, and the need to find a treatment is urgent in an attempt to alleviate the negative effects associated with cocaine. Therefore it is proposed that:

Cocaine administration induces molecular and functional changes in the CNS.

Topiramate can prevent these alterations.

OBJECTIVES

1. To determine the impact of cocaine consumption on past experiences memory retrieval.
2. To test changes in the activity of NF-KB induced by cocaine in the rat brain.
3. To characterize the cocaine-induced alterations in rat brain oxidative stress, apoptosis and nNOS enzyme activation
4. To study CREB and related proteins and their relationship to different signaling pathways and cocaine.
5. To determine the efficacy of topiramate pretreatment in preventing cocaine-induced alterations in brain function.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

1. ANIMALS CARE

Male Wistar rats were used throughout the study from Charles Rivers (Spain). The animals used had a weight at the beginning of the experiment of 300 g approx. In all cases, we allowed rats to acclimate at least one week before starting the experiments.

The housing was made in the University CEU Cardenal Herrera. During the confinement, the animals were kept in cages under controlled temperature (20°C) and humidity (60%) and constant cycles of light-dark of 12 hours, from 08:00 to 20:00 and 20: 00 to 08:00. Animals had free access to water and a standard diet for small animals, manufactured and distributed by Letica (Spain), during all experiments.

2. EXPERIMENTAL MODEL

Two experiments were conducted with a similar design for this work.

During the first experiment, rats were separated into 4 groups and were administered cocaine and/or topiramate for 20 days. One group was the control group which was administered saline (0.9%). The control group and topiramate received saline and topiramate. The cocaine group was administered cocaine throughout the duration of the experiment and finally the cocaine and topiramate group was coadministered both drugs, cocaine and topiramate.

Cocaine (Sigma-Aldrich, USA) was injected intraperitoneally to the corresponding group, with a daily dose of 15 mg/kg. The vehicle was saline (0.9%), and this vehicle had no effect on the parameters studied. The animals that were not administered cocaine received saline (0.9%).

Topiramate (Topamax ®, Jassen-Cilag, SA, Spain) was administered orally with a daily dose of 10 mg/kg. The vehicle was saline (0.9%). Similarly, animals not receiving topiramate were administered saline (0.9%).

The second experiment lasted 36 days, and in this case rats were divided into two groups, one control and one cocaine group. Cocaine was administered intraperitoneally with the same dose as in the previous experiment, 15 mg/kg. The control group received saline (0.9%).

3. MORRIS WATER MAZE TEST

Memory and spatial learning have been studied following a variant of the Morris water maze test (Morris et al., 1982) conducted in our laboratory (Muriach et al., 2010).

Briefly, the behavior can be separated into two blocks. First, rats are trained in the water maze task before the drug administration and secondly, the drug effect in memory and learning is evaluated the last day of drug administration.

Rats are trained to find a 10 cm diameter platform hidden 4 cm below water. Task is performed in a round pool about 2 m in diameter, divided into four quadrants; the quadrant where the platform is placed is called the “target quadrant”. This task is based on the rats ability to learn where the platform is located observing visual cues around the pool. Therefore, rats learn where the invisible platform is and climb to it. The measured parameter is the latency, the time in seconds a rat takes to reach the platform, up to 90 seconds. In addition the number of times the rat enters the target quadrant were also recorded.

Training is started three days before the start of drug administration. Rats were given 3 trials each day, for 3 consecutive days, resulting in 9 total trials.

The last day of drug administration the second part of the behavior study is performed, in order to identify how drugs affect the spatial learning and memory. Three new trials are made during a single day (trials 10-12) in the same way as during training. The platform is placed in the same position that in

the training phase. Also the transfer test was performed the last day of the experiment. In this case, the platform position is changed.

4. STUDY OF ANTIOXIDANT DEFENSES

4.1 GSH determination

The GSH content was quantified by the method of Reed (Reed et al., 1980). Briefly, samples were homogenized in prechilled medium containing phosphate buffer (pH 7.0) and perchloric acid (PCA). Suspensions were centrifuged at 14000 x g and the resulting supernatants were collected and stored at -80° C. The samples were mixed with a solution of iodoacetic acid and Sanger reagent (1-fluor-2,4- dinitrobenzene). These products are quickly separated by HPLC which allows the quantification of nanomolar levels of GSH.

4.2 GPx activity

GPx activity was assayed as reported by Lawrence (Lawrence et al., 1978) towards hydrogen peroxide in hippocampus and in frontal cortex. The disappearance of NADPH was followed spectrophotometrically at 340 nm. The reaction mixture consisted of 240 mU/ml of glutathione disulfide reductase, 1 mM GSH, 0,15 mM NADPH in 0,1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA and 1 mM sodium azide; 50 μ l sample were added to this mixture and allowed to equilibrate at 37 $^{\circ}$ C for 3 min. Reaction was started by the addition of 1.5 mM hydrogen peroxide to adjust the final volume of the assay mixture to 1 ml.

Protein content was measured by means of the Lowry method (Lowry et al., 1951).

5. WESTERN BLOT ANALYSIS

The western blot methodology employed is described in "Current Protocols in Protein Science" (Coligan, 2003). This procedure involves the migration of tissue proteins fractionated by electrophoresis through a denaturing acrylamide gel (SDS-PAGE). These proteins, once they have separated on the gel due to its size, are transferred to a nitrocellulose membrane. The presence of proteins is illustrated by specific antibody bound to a detection and display system.

6. NF-KB ACTIVITY

The transcription factor NF- κ B exists in a latent form in the cytoplasm bound to the inhibitory protein I κ B (Baeuerle and Baltimore, 1988).

The activation of NF- κ B was determined using the nuclear extract obtained from cell fraction of hippocampus and frontal cortex, using an ELISA kit, TransAM NF- κ B. The kit comprises a 96-well plate, each of which contains the consensus sequence linked only exposed when the NF- κ B is activated. This sequence is specific for the p65 subunit.

7. HISTOCHEMICAL NADPH-DIAPHORASE

Coronal brain sections with a thickness of 35 μ m were obtained using a cryostat (Microm).

NADPH-diaphorase histochemistry is used to detect the nNOS neurons in PFA-fixed tissue (Dawson et al., 1991; Hope et al., 1991). The enzyme nNOS, as mentioned above has a reductase and an oxygenase domain. As a result of the reaction NADPH is oxidized to NADP⁺ and H⁺. In this histochemical test we used the ability of the proton to reduce a salt, nitro blue tetrazolium, to a complex insoluble and of blue colour, known as the NADPH-d reaction, allowing us to identify where this activity is located in the tissue.

8. STATISTICAL ANALYSIS

The results are presented as mean values and standar desviation. Statistical significance was assessed by Student's t-test (when comparing two groups) or when necessary by ANOVA followed by the DMS or T3 Dunnett test (when comparing more than two groups). The level of significance was set at $p < 0.05$. The program used is SPSS 15.0 for Windows.

RESULTS

I. COCAINE ADMINISTRATION FOR 20 DAYS AND TOPIRAMATE TREATMENT

1. MORRIS WATER MAZE TEST

The following figure shows an overall diagram of the Morris water maze test after 20 days of cocaine administration. It is observed that animals in the different groups show no changes in learning before cocaine and topiramate administration (trials from 1 to 9).

On day 22 of the experiment (last day of drug administration) three more trials are performed. The most interesting result occurs in trial 10 (the first post-treatment). The accumulative latency in the cocaine group is statistically higher on trial 10 if we compare to all the other groups. It is also interesting to note that topiramate prevents damage in memory retrieval.

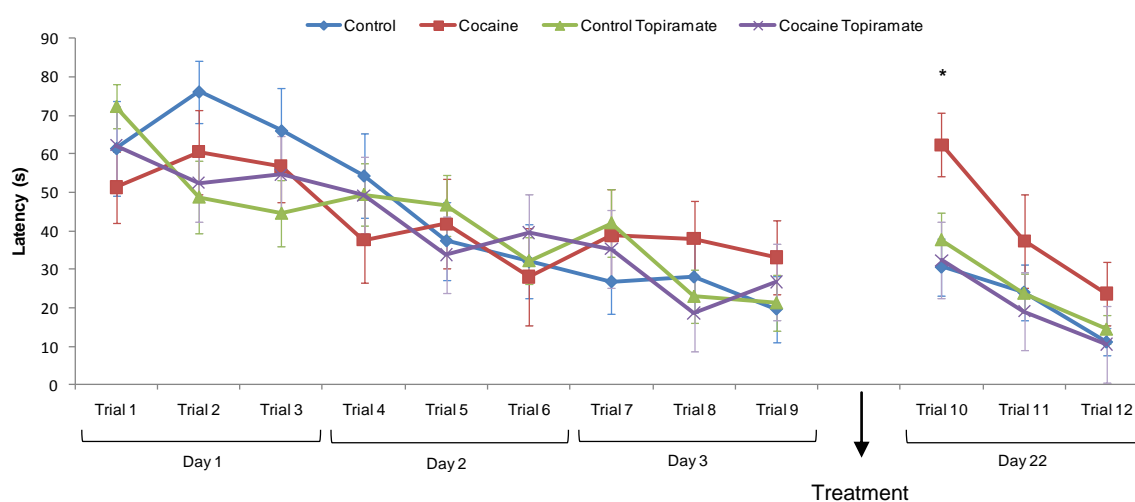


Figure 64: Morris water maze test. Accumulated latency (s). * $p < 0.05$ vs all groups. $n = 8-16$.

Moreover, when comparing group by group, the latency on trial 10 (the first one after treatment) and the latency on trial 9 (the last one before starting treatments), the only group in which the latency is significantly higher, is in the cocaine-treated one (Figure 65).

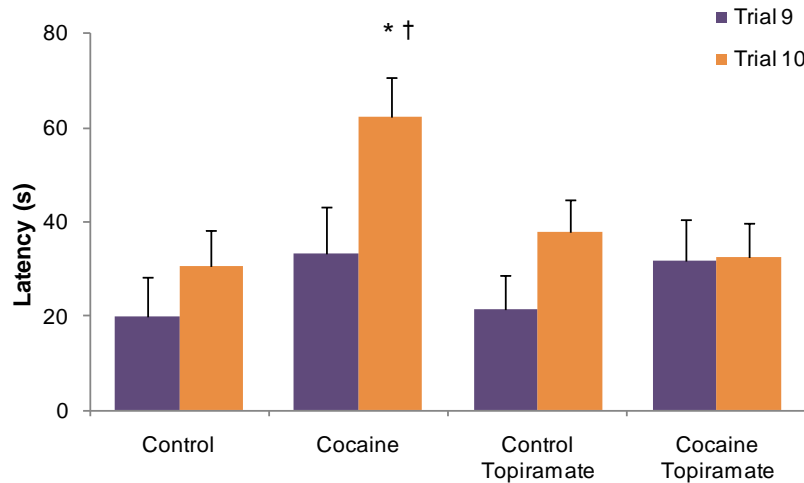


Figure 65: Latencies comparison (s) between trial 9 (last trial before treatment) and trial 10 (the first trial post-treatment). * $p < 0.05$ vs all groups, † $p < 0.05$ vs trial 9. $n = 8-16$.

In the transfer test, cocaine treated animals spent the same time to find the hidden platform than in trial 12 (the last one after treatments) while the rest of groups increased significantly the latency to find it (Figure 66).

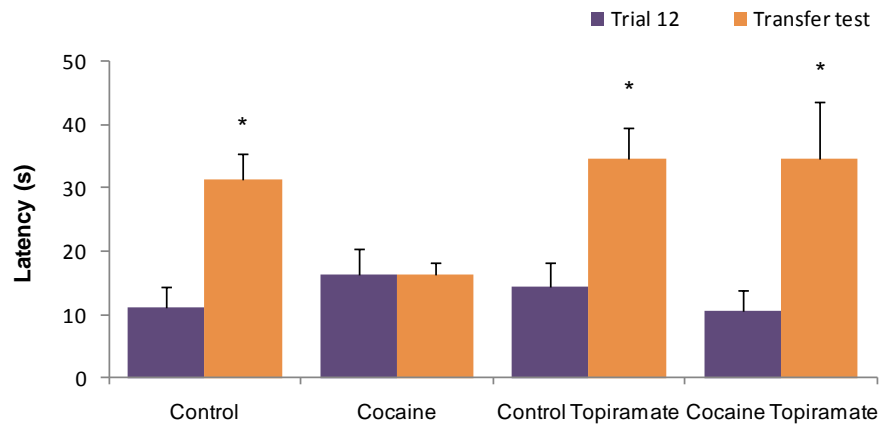


Figure 66: Latencies comparison (s) between trial 12 (final trial after treatment) and transfer test (platform position changed). * $p < 0.05$ vs trial 12. $n = 8-16$.

No differences were found in the number of times that animals entered the quadrant where the platform was located related with the latency, suggesting that locomotor activity was not influencing this task acquisition (Figure 67).

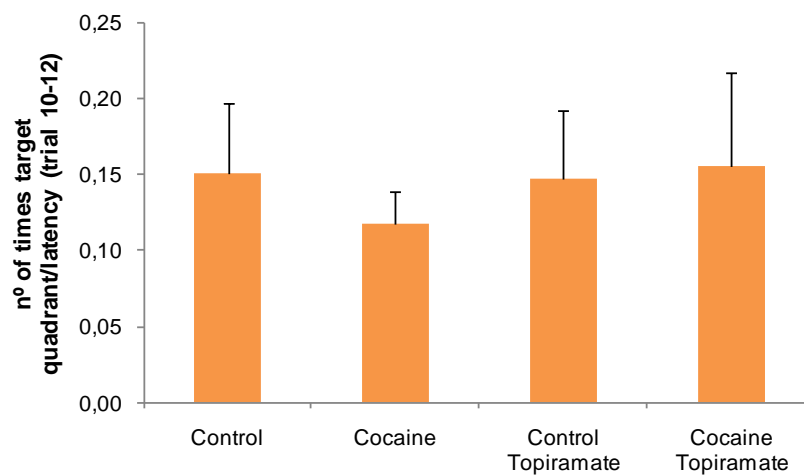


Figure 67: Number of times that animal enters target quadrant and accumulated latency (trials 10-12). $n = 8-16$.

2. NF-κB ACTIVITY

Nuclear factor kappa B activity is decreased in frontal cortex of cocaine-treated animals when compared to control rats. In addition, administration of topiramate kept NF-κB activity at control levels in the cocaine-treated animals (Figure 68). No changes were observed in the hippocampus (Figure 69).

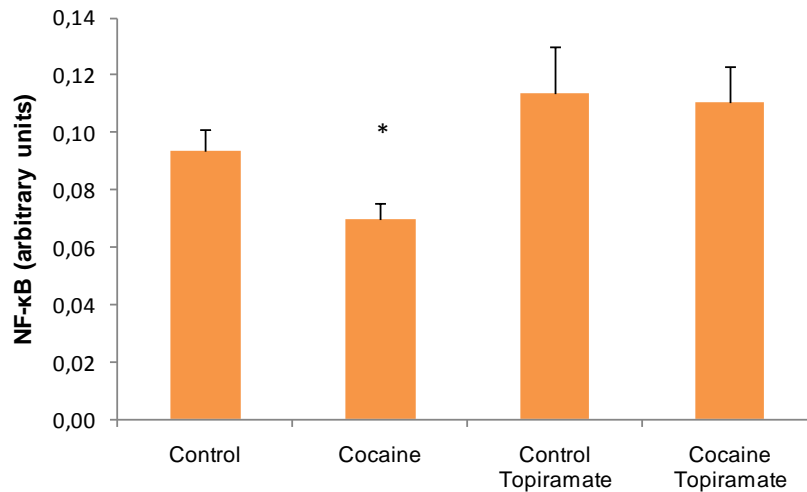


Figure 68: NF-κB activity in frontal cortex. * $p < 0.05$ vs all groups. $n = 6$.

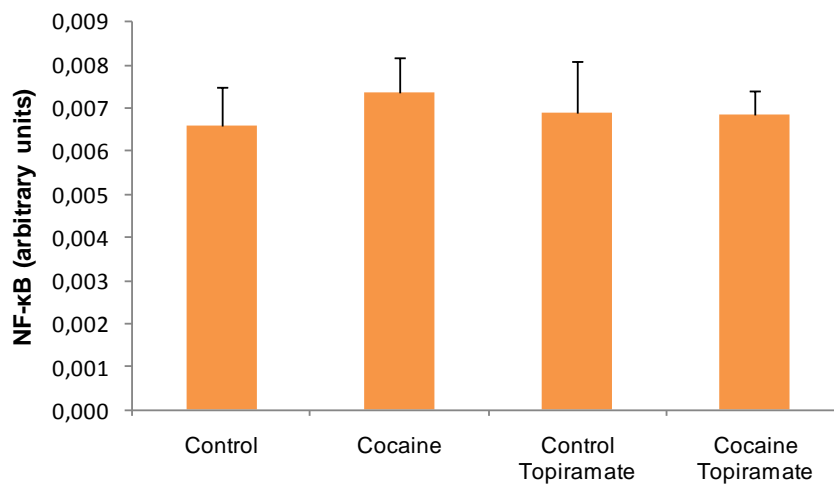


Figure 69: NF-κB activity in hippocampus. $n = 6$.

There is a statistically significant negative correlation between NF- κ B activity in frontal cortex and the difference in latency between trial 10 (the first trial after treatment) and trial 9 (the last trial before treatment) (Figure 70). Rats that have a higher latency variation (those who need more time to find the hidden platform in relation to that required prior to treatment), have reduced NF- κ B activity in the frontal cortex after administration of cocaine.

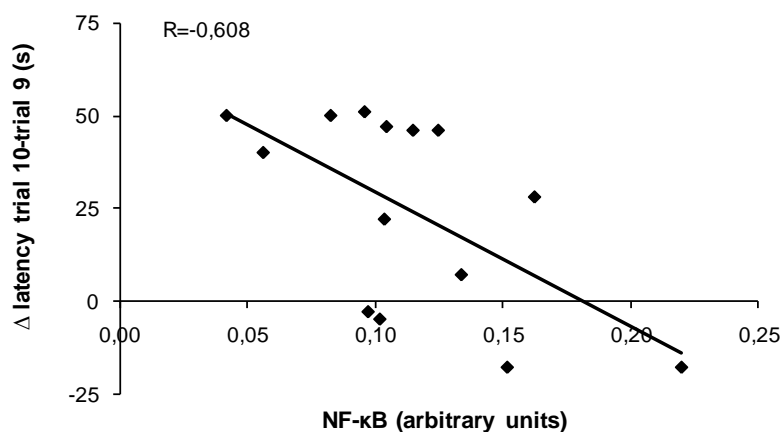


Figure 70: Correlation between NF- κ B activity in the frontal cortex and latency increased between trials 9 and 10. $p=0.021$.

3. ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS

No changes in either of the oxidative stress markers studied were observed in the frontal cortex after cocaine administration (data not shown). In contrast, both GSH concentration and GPx activity were decreased in the hippocampus of cocaine treated animals (Figure 71 and Figure 72), and topiramate prevented these decreases.

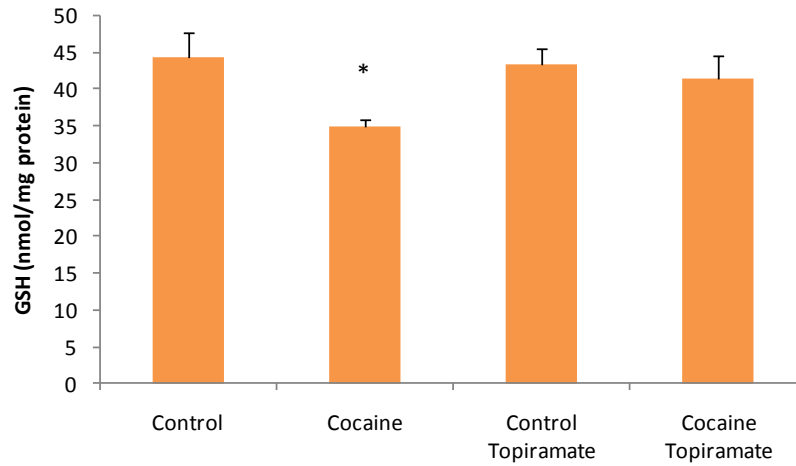


Figure 71: GSH concentration in hippocampus. * $p < 0.05$ vs all groups. $n = 8$.

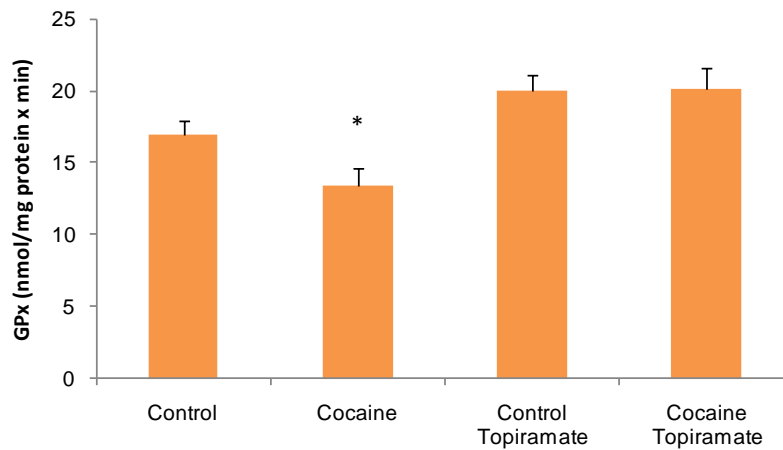


Figure 72: GPx activity in hippocampus. * $p < 0.05$ vs all groups. $n = 8$.

Moreover, there is a statistically significant positive correlation between the GPx activity in hippocampus (which is reduced by the cocaine administration), and latency difference between the trial 12 (final trial after treatment) and the transfer test (Figure 73). That is, there is a relationship between GPx activity and the ability to learn new tasks.

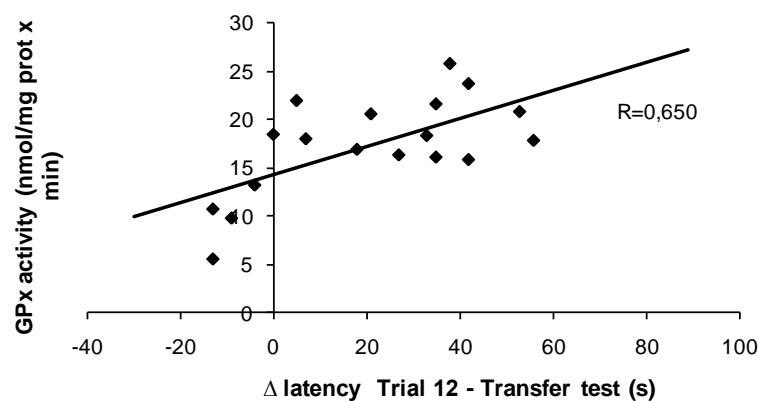


Figure 73: Correlation between GPx activity in hippocampus and the difference between the transfer test and trial 12. $p=0.003$.

4. NADPH-DIAPHORASE HISTOCHEMISTRY

As shown in Figure 74, there was a significant increase in the number of NADPH diaphorase positive cells in the dentate gyrus of cocaine treated animals when compared to control rats, and Topiramate prevented this increase. In contrast, no differences were found in the frontal cortex in either of the areas studied: Bregma +1.92 and +1.08 or Bregma +2.28 and +2.04 (data not shown).

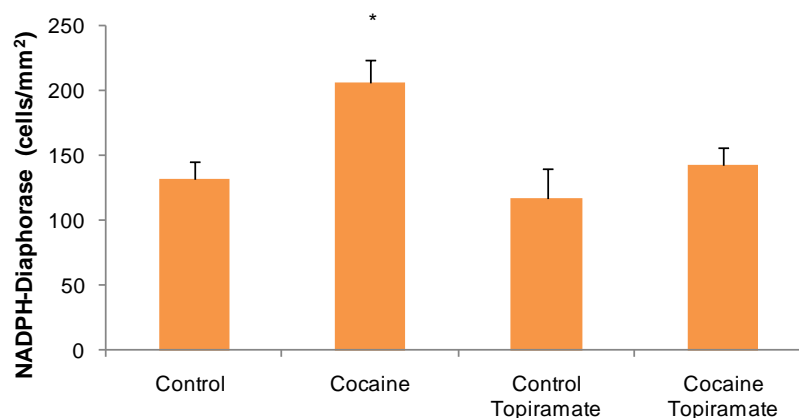


Figure 74: Number of NADPH diaphorase-positive cells in subgranular layer of the dentate gyrus of hippocampus. * $p<0.05$ vs all groups. $n=6$.

When the relation between the number of NADPH-diaphorase-positive cells in hippocampus and increased latency between trial 12 and transfer test is studied, a statistically significant negative correlation is established (Figure 75). The increase of NADPH diaphorase-positive cells in the hippocampal DG could be related in some way to the improvement task performance after cocaine administration.

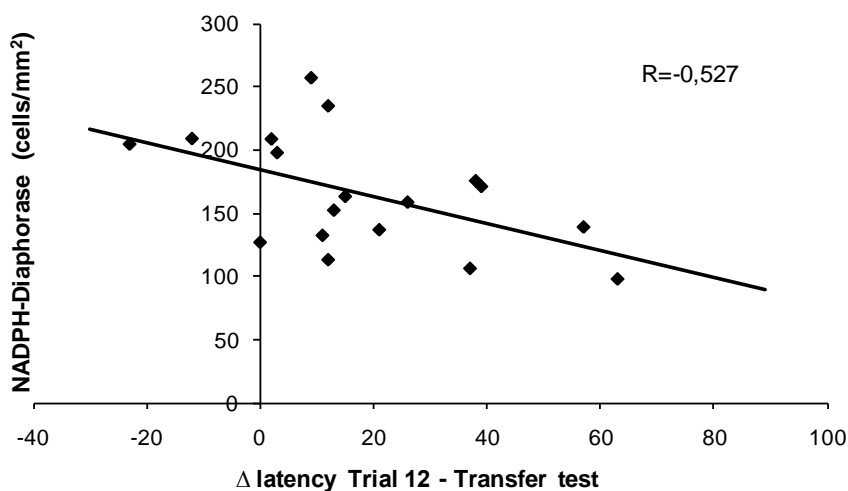


Figure 75: Correlation between NADPH-diaphorase in hippocampus and difference between the transfer test and trial 12.

II. COCAINE ADMINISTRATION FOR 36 DAYS

This section explores the mechanisms of action of cocaine, with special focus on how this drug impairs memory retrieval of experiences acquired prior to drug administration.

1. MORRIS WATER MAZE TEST

The following figure shows an overall scheme of the results of the water maze test. Before cocaine administration animals learned the task, since rats of different groups spent the same time to find the hidden platform when comparing trial 1 with trial 9.

After 36 days of administration of cocaine, 3 new trials are made. A statistically significant increase in the latency (time needed to find the hidden platform) is observed on trial number 10, the first trial after cocaine administration, when compared to latency of trial number 9, the last one before the treatment (Figure 76).

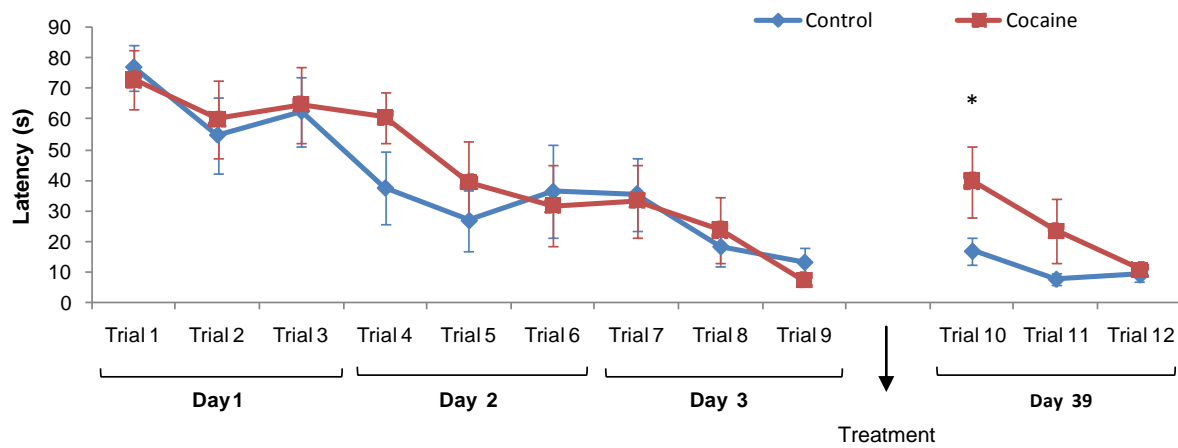


Figure 76: Test Morris water maze. Accumulated latency (s). * $p < 0.05$ vs cocaine group trial 9. $n = 8$.

In addition, the impairment in memory retrieval in rats treated with cocaine has also been demonstrated in the Figure 77.

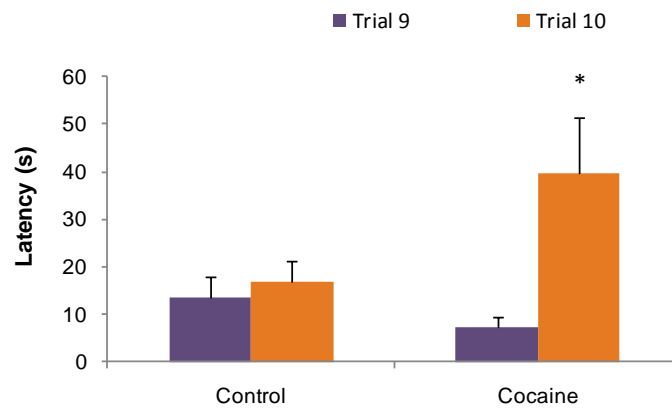


Figure 77: Latency comparison (s) between trial 9 (last trial before treatment) and trial 10 (first trial post-treatment). * $p < 0.05$ vs trial 9. $n = 8$.

No differences were found in the number of times that animals entered the quadrant where the platform was located related with the latency, suggesting that locomotor activity was not influencing this task performance (Figure 78).

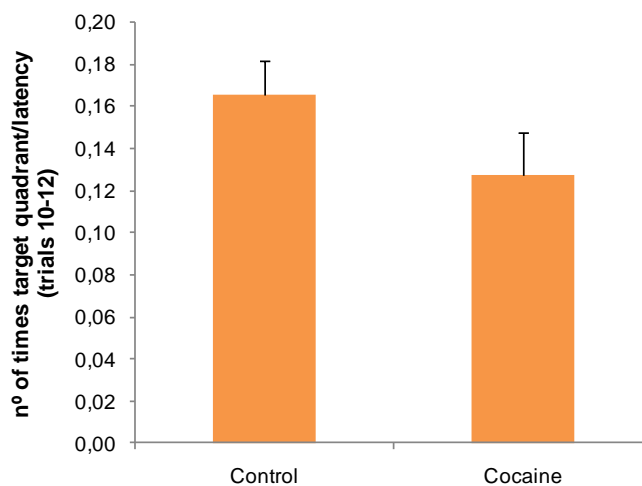


Figure 78: Number of times that animal enters to target quadrant and accumulated latency (trials 10-12). $n = 8$.

2. NF-KB ACTIVITY

After 36 days of cocaine administration, NF- κ B activity is decreased in frontal cortex (Figure 79) and in hippocampus (Figure 80) when compared to the control group. Moreover, NF- κ B activity levels negatively correlates ($p < 0.05$; $R = -0.647$) with latency differences between trials 10 (the first one after cocaine administration) and 9 (the last one before cocaine administration) (Figure 81).

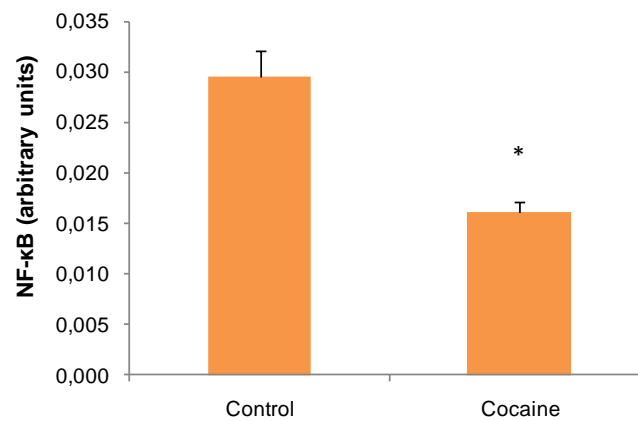


Figure 79: NF- κ B activity in frontal cortex. * $p < 0.05$. $n = 6$.

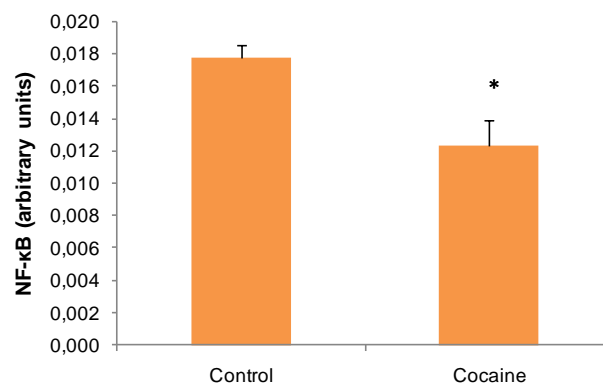


Figure 80: NF- κ B activity in hippocampus. * $p < 0.05$. $n = 7$.

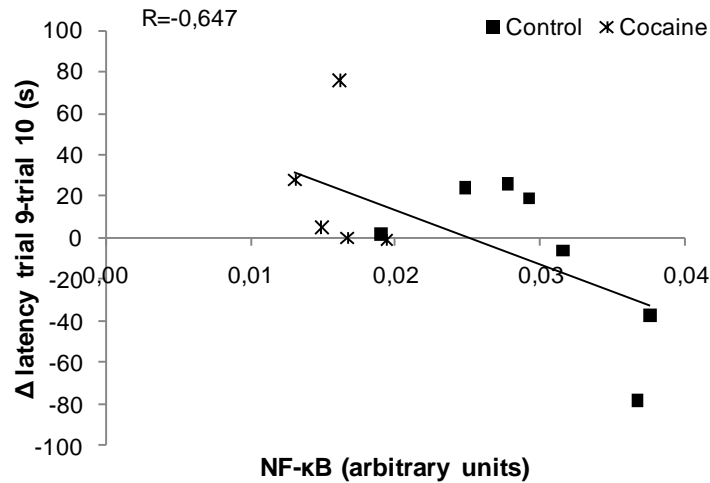


Figure 81: Correlation between NF-κB activity in the frontal cortex and increased latency between trials 9 and 10. $p=0.023$.

3. STUDY OF OTHER PROTEINS INVOLVED IN LEARNING AND MEMORY PROCESSES

3.1 cAMP response element-binding (CREB)

A protein which plays a very important role in memory formation is CREB, as mentioned above. There was no change in the two forms of the protein (CREB and pCREB) in frontal cortex after cocaine (data not shown). However, pCREB levels were decreased after cocaine administration in hippocampus, while its inactive form was unchanged (Figure 82 and Figure 83).

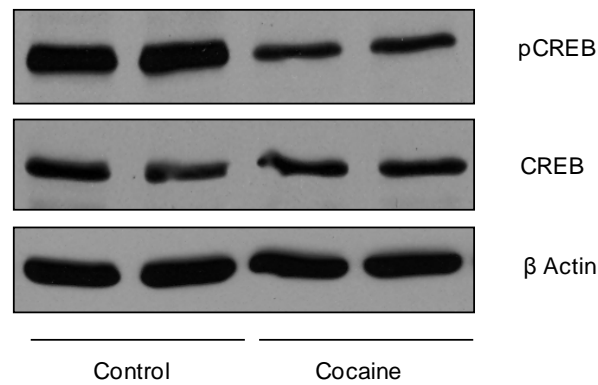


Figure 82: Western blot representation of pCREB (43 kDa), CREB (43 kDa) and β actin (42 kDa) in hippocampus.

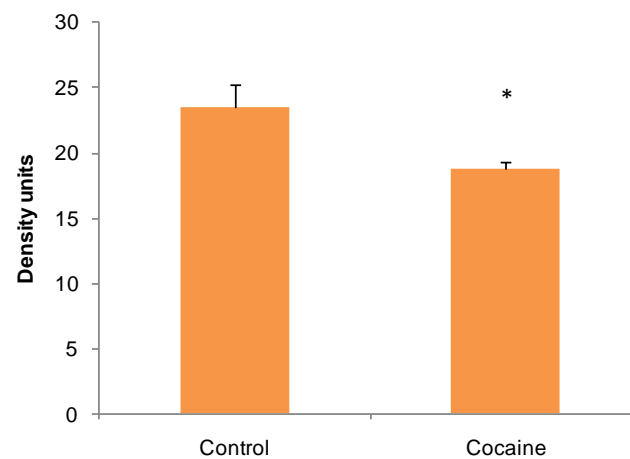


Figure 83: Western blot quantification of pCREB related with CREB in hippocampus. * $p < 0.05$.
n=6.

The following figure shows a statistically significant correlation between the levels of pCREB and NF- κ B activity in hippocampus, thus establishing a relationship between these two proteins.

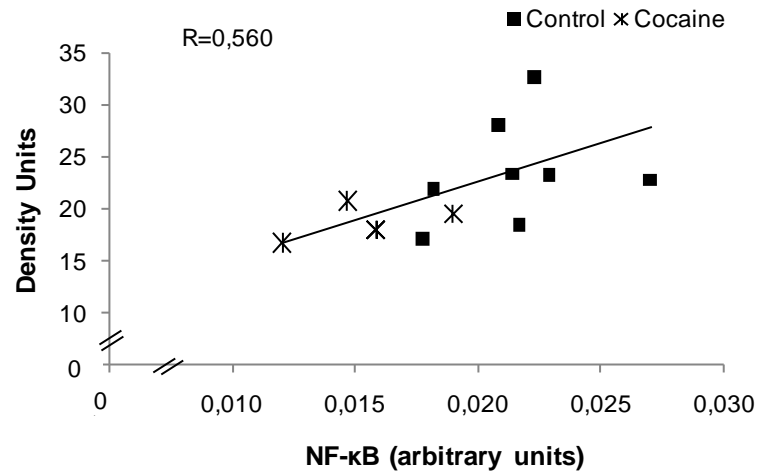


Figure 84: Correlation between pCREB/CREB and NF-κB activity in hippocampus. $p = 0.046$.

3.2 Protein kinase A (PKA)

It is known that CREB is phosphorylated by several different kinases, including PKA. One of the subunits of this protein has been studied, PKA catalytic alpha (PKAc α), and it has been found that the level of this protein is decreased in frontal cortex in those animals where cocaine has been administered (Figure 85 and Figure 86).

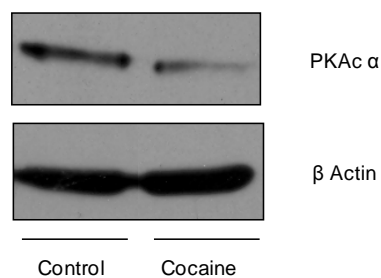


Figure 85: Western blot representation of PKAc α (42 kDa) and β Actin (42 kDa) in frontal cortex.

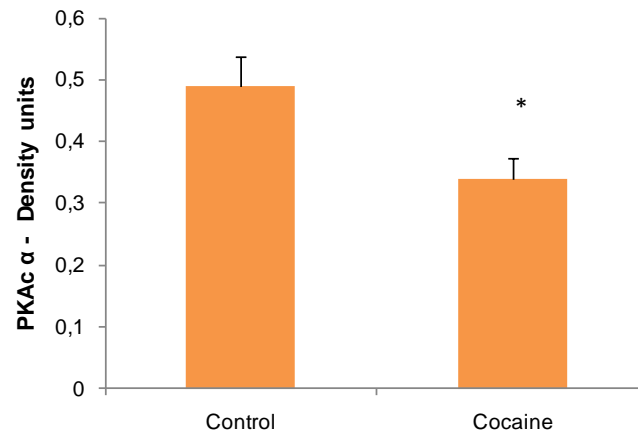


Figure 86: Western blot quantification of PKAc α in frontal cortex. * $p < 0.05$. $n = 6$.

In addition, a significant positive correlation appears between NF- κ B activity and PKAc α (Figure 87) in the frontal cortex area.

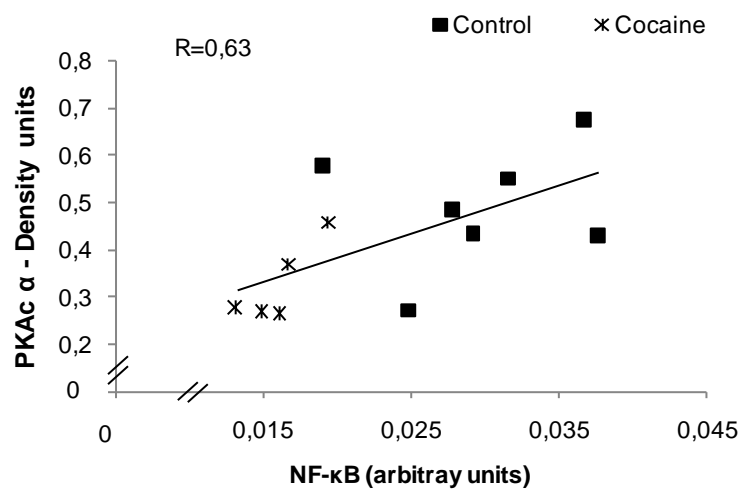


Figure 87: Correlation between PKAc α and NF- κ B activity in frontal cortex. $p = 0.028$.

3.3 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

In our experimental model, there was a decrease of BDNF levels after 36 days of cocaine administration in the frontal cortex, as shown in Figure 88 and Figure 89.

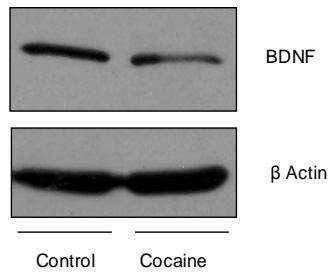


Figure 88: Western blot representation of BDNF (20 kDa) and β Actin (42 kDa) in frontal cortex.

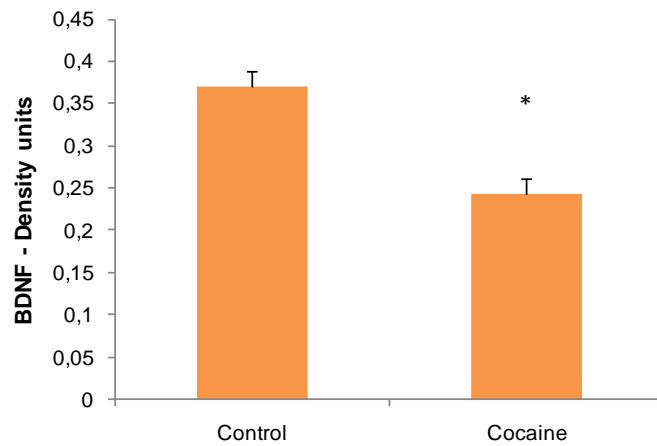


Figure 89: Western blot quantification of BDNF in frontal cortex. * $p < 0.05$. $n = 6$.

Furthermore, it was found a positive correlation between NF-κB activity and BDNF levels was found that was statistically significant in the frontal cortex (Figure 90).

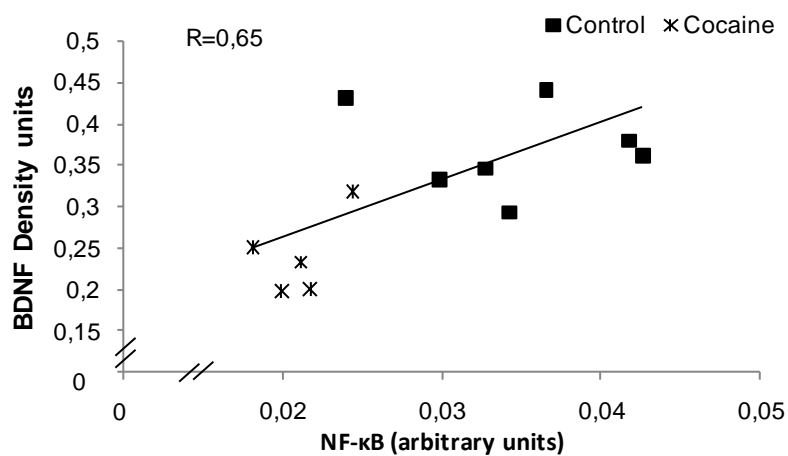


Figure 90: Correlation between BDNF and NF-κB activity in frontal cortex. $p = 0.022$

3.4 Glutamate decarboxylase 65 (GAD65)

We did not observe any changes in this protein levels in the cocaine group when compared with the control group in hippocampus. However, NF- κ B activity and GAD65 levels in hippocampus showed a significant and positive correlation as shown in Figure 91.

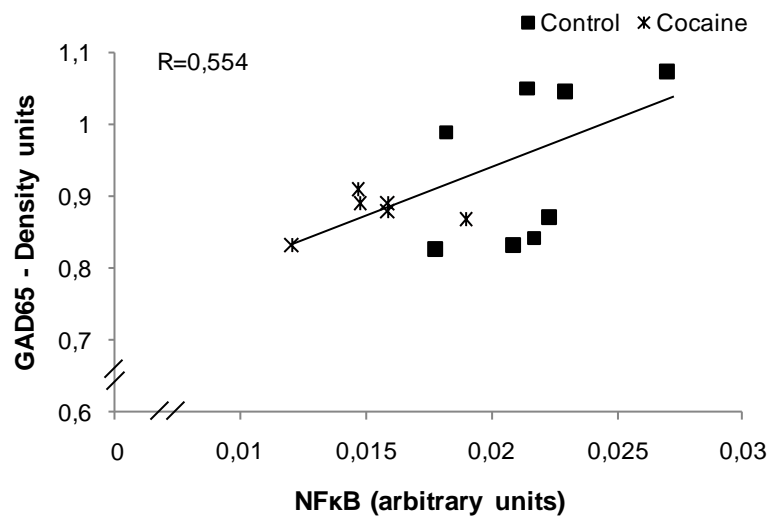


Figure 91: Correlation between GAD65 and NF- κ B activity in hippocampus. $p=0.04$

DISCUSSION

I. COCAINE ADMINISTRATION FOR 20 DAYS AND TOPIRAMATE TREATMENT

1. MORRIS WATER MAZE TEST

It is well documented the influence of cocaine on behavior. It has been found that cocaine affects the drug conditional memory, developing a drug-seeking behavior. Specifically, the circuits involved in memory and learning processes are affected by the drug (Chao and Nestler, 2004; Hyman et al., 2006; Kelley, 2004; Thomas and Malenka, 2003).

In our experimental model, it was observed that cocaine-treated rats spent more time to perform the task of the Morris water maze test (learned prior to treatment with cocaine) than other groups, both when comparing the results of the trial 10 (first after drug administration) between all groups, as well as when compared with trial 9 (last before treatment) (Figura 364 and Figure 65). It is important to note, that rats treated with topiramate and cocaine had the same behavior as control rats, indicating that this antiepileptic drug prevents these memory effects caused by cocaine. Memory modification conditioned to cocaine has been widely studied and there are many reports that prove it, however, there is no data showing impairment on memory retrieval of experiences acquired prior to cocaine administration caused by this drug. This study demonstrates for the first time that cocaine alters this process. It should also be particularly emphasized that topiramate prevents this memory impairment (Muriach et al., 2010).

If we focus on the transfer test, we show that cocaine-treated rats spent less time to find the platform than the other groups (Figure 66). This result was demonstrated for the first time in Muriach et al., 2010, and it could be related to the enhancement of task acquisition during the Morris water maze test, that has

been induced after cocaine administration (deOlmo et al., 2007; deOlmo et al., 2006). Topiramate prevents again an alteration observed in rats treated with cocaine, allowing them to behave as control animals.

Topiramate could normalize memory probably due to its opposite action to cocaine, or by its pharmacological characteristics *per se* (AMPA receptor antagonist (GluR5)/kainate of glutamate (Kaminski et al., 2004)). Glutamate and its receptors exert a key role in the learning and memory processes, therefore, the continuous action of topiramate on these receptors can affect this behavior, as we have previously reported (Muriach et al., 2010). There is some controversy about how topiramate acts regarding memory processes: some studies indicate it improves memory (Nowakowska et al., 2009), whereas others show that topiramate induces a memory deficit (Schmidt do Prado-Lima et al., 2011). This difference may be due to the kind of memory and the dose of topiramate administered (Martins de Lima et al., 2007). If we focus on the results obtained, we can rule out a topiramate effect *per se* on spatial memory, because control group was also treated with topiramate and memory was not altered (Figura 364). Heidepper et al. indirectly conformed this result, because they demonstrated that topiramate does not affect LTP (Heidegger et al., 2010).

2. NF-KB ACTIVITY

The hippocampus results indicate that despite of the decreased of antioxidant defenses after cocaine administration, the activity of NF- κ B (proposed such as oxidative stress sensor (Schmidt et al. 1995; Schreck et al., 1992)) was not superior to the controls (Figure 69).

However, NF- κ B activity did not increase, but it decreased in cocaine treated animals compared to controls, in the frontal cortex (Figure 68). Additionally, topiramate prevents this decrease induced by cocaine. This fact is remarkable and novel because it has not been described elsewhere.

Considering that NF- κ B has been postulated as a positive regulator of the inhibitory GABAergic tone *in vivo* (O'Mahony et al., 2006), NF- κ B activity

decrease in frontal cortex of cocaine-treated rats, could be influenced by inhibitory GABAergic tone induced by cocaine (Gasior et al., 2004, Tseng and O'Donnell, 2004). Topiramate could increase GABA concentrations in human brain (Kuzniecky et al., 1998; Petroff et al., 1999), the results allow us to propose a possible link between NF- κ B and topiramate. Therefore, memory normalization induced by topiramate (Figura 364) might be due related, at least in part, to the recovery of NF- κ B activity in frontal cortex, also induced by topiramate (Figure 68).

In relation with NF- κ B and their functions in the CNS, it is known that lack of different subunits, can induce a damage in learning and memory processes (Kaltschmidt et al., 2006; Meffert et al., 2003; O'Mahony et al., 2006; Yang et al., 2011). Furthermore, this transcription factor appears to be important in the memory consolidation (Freudenthal et al., 2005, Levenson et al., 2004; Merlo et al., 2002). It is possible to conclude that NF- κ B activation is important for long term memory formation, especially one that depends on hippocampus, as the spatial memory. This evidence allows us to relate decreasing NF- κ B activity in the frontal cortex with spatial memory deficit as shown in Figure 70. Furthermore, memory in these conditions may be more dependent on frontal cortex than hippocampus (Anagnostaras et al., 2001; Takehara et al., 2003). In this sense, previous studies show that NF- κ B is activated in the cell nucleus only when memory must be retrieved (Merlo et al., 2005). Thus, the decrease of NF- κ B activity in frontal cortex observed after cocaine administration could help to memory impairment.

3. ENDOGENOUS ANTIOXIDANTS

GSH concentration and GPx activity were reduced in cocaine treated rats with respect to controls in rat hippocampus (Figure 71 and Figure 72). This decrease in antioxidant defenses may indicate an increase of oxidative stress following cocaine administration in hippocampus. Although other authors have shown an oxidative stress situation in hippocampus of rats following intrauterine exposure to cocaine (Bashkatova et al., 2005; Bashkatova et al., 2006), there

are not many studies demonstrating this process in adults rats (Pomierny-Chamiolo et al., 2013).

The main cocaine effect on CNS is the inhibition of DA reuptake (Nestler, 2005), with an accumulation of this neurotransmitter in the synaptic cleft. Free DA, can increase oxidative stress, because during the metabolism of this neurotransmitter, free radicals are generated (Hastings, 1995). Therefore it is possible that the decrease of antioxidant defenses in hippocampus may be due to the accumulation and subsequent oxidation of DA.

We have demonstrated a memory deficit induced by cocaine (Figura 364) which could be due, at least in part, to the GSH depletion that this drug causes in hippocampus (Figure 71), since there is a link between low levels of GSH with an impairment in the long and short-term synaptic plasticity (Almaguer-Melian et al., 2000). Furthermore, Shukitt-Hale et al. have shown that GSH depletion induces a memory deficit following an increase of oxidative stress induced by DA (Shukitt-Hale et al., 1998). Other studies also have proved the need of a right function of antioxidant defenses (GSH and GPx) for the memory formation (Cruz-Aguado et al., 2001, Dean et al., 2009). It is also known that GSH synthesis is produced from glutamate and the glutamatergic system and that is is involved in memory formation. Therefore GSH system modification by cocaine could also contribute to the modification of the plasticity behavior induced by cocaine as Uys et al. demonstrated (Uys et al., 2011).

Cocaine also decreases GABAergic inhibitory tone (Frankowska et al., 2009; Gasior et al., 2004, Huang et al., 2007a, Liu et al., 2005). It is known that a reduction of GSH levels, (as we have observed in our study, Figure 71), can lead to significant loss of GABA concentrations (Gramsbergen et al., 2002; Lyng and Seegal, 2008). Linking with this idea, a study by Zheng et al. shows that a GABA(A) receptor agonist, in part, enhances spatial task, in rats with an induced stress (Zheng et al., 2007). In our case, we have observed a statistically significant positive correlation between the GPx activity in hippocampus (which is reduced by the administration of cocaine), and the latency difference between trial 12 (final trial after treatment) and the transfer test (platform position changed) (Figure 73) (this difference is minimum in

cocaine group). Several studies have postulated a relationship between GPx enzyme and memory impairment (Chiu et al., 2009, He et al., 2010). Similarly, in our case, the decrease in antioxidant defenses observed in hippocampus of cocaine-treated rats can contribute to modify the task of Morris water maze test.

Topiramate is able to normalize the antioxidant defenses in hippocampus (Figure 71 and Figure 72), and this is an important finding since there are no data in the literature related to this subject (Kutluhan et al., 2009; Nazıroğlu et al., 2008). These antioxidant effects may result from inhibition of carbonic anhydrase (Dodgson et al., 2000). Price et al. (2012) have observed a reduction of oxidative stress induced by mitochondrial carbonic anhydrase after administration of topiramate (Price et al., 2012). However, we should not forget that, contrary to the results of this work, other groups have described a possible oxidative stress situation after topiramate addition (Huang et al., 2007b; Pavone and Cardile, 2003), although this results have been observed in vitro studies, such as astrocytes or hepatocytes culture.

Furthermore, as mentioned above, topiramate allows that cocaine-treated rats behave as controls rats, when spatial memory is studied (Figure 364 and Figure 665). The fact that topiramate is able to stimulate GABAergic connections could justify its effect in rats treated with cocaine. However, we should also note that topiramate normalizes GSH and GPx values in hippocampus in our study (Figure 71 and Figure 72), which could help to improve the GABAergic tone. Moreover, the correlation between the GPx activity in the hippocampus and the task of Morris water maze test in Figure 73 could suggest that topiramate effect on cocaine-treated rats was induced by its possible antioxidant capacity.

4. NADPH-DIAPHORASE HISTOCHEMISTRY

The number of NADPH-diaphorase positive cells increased in the subgranular layer of dentate gyrus of hippocampus due to cocaine administration that could indicate an increase of nNOS activity in cocaine group (Figure 74). It is known a relation between cocaine addiction and the nitric oxide

synthase enzyme, since NOS has been associated with DA transmission processes (Balda et al., 2009; Volz and Schenk, 2004), behavioral sensitization to cocaine (Balda et al., 2008), abstinence-induced withdrawal drug (Rawls et al., 2006), drug self-administration behavior (Collins and Kantak, 2002) or the learning of conditioning place preference (Itzhak and Anderson, 2007).

Moreover, other authors have also demonstrated that nNOS is affected by cocaine in hippocampus (Bhargava and Kumar, 1997), and are in agreement with the increase of positive NADPH diaphorase- cells reported in our experiment (Figure 74).

On the other side, there is a structural connection between nNOS and NMDA glutamate receptor (necessary for memory formation in the hippocampus) (Christopherson et al., 1999). In fact, the activation of NMDA receptors induces an increase of Ca^{2+} flux, activating Calmodulin proteins (CaM) necessary for proper functioning of NOS. Therefore, a relationship between the improvement in cocaine-induced learning and hippocampal nNOS increase could be established, as we have shown (Figure 75). In fact, cocaine induces an increase in NMDA receptor action by increasing dopamine transmission (Zhang et al., 2009) and this it also helps increasing nNOS activity (Bhargava and Kumar, 1997).

It is also known that NO is necessary for LTP generation (Schuman and Madison, 1991) and therefore necessary for learning and memory processes. In fact there are numerous studies showing that the lack of NO induces spatial memory deficits (Chapman et al., 1992; Estall et al., 1993). Other studies in nNOS knock out mice that performed the spatial Morris water maze test, showed a worsening in the execution of the task (Kirchner et al., 2004). It is also known that the expression of the neuronal NOS in the dentate gyrus of hippocampus and frontal cortex is significantly increased following the completion of a task similar to Morris water maze (Zhang et al., 1998).

The increase of NADPH diaphorase-positive cells in the subgranular layer of the hippocampal dentate gyrus of cocaine treated animals (Figure 74) is of interest, since this area is associated with the formation of new memory. This is because adult neurogenesis occurs in this area (Kempermann and Gage, 2000;

Lledo et al., 2006), and the formation of new neurons in the hippocampus is intimately related to spatial memory formation (Herrera et al., 2003, Snyder et al., 2005). In fact, the increase observed in the number of NADPH-diaphorase cells in the dentate gyrus of animals treated with cocaine may be related to the improved performance of the water maze test observed in these animals, as Figure 75 shows.

Finally, as with other parameters, it is noteworthy that topiramate is able to keep the number of NADPH diaphorase-positive cells similar to the controls in the dentate gyrus of hippocampus of cocaine treated rats (Figure 74). This topiramate effect may also contribute, therefore, to normalize the execution of Morris water maze test in the cocaine-treated animals (Figure 66 and Figure 65).

II. COCAINE ADMINISTRATION FOR 36 DAYS

1. MORRIS WATER MAZE TEST

Cocaine administration for 36 days caused memory impairment, as shown in Figure 76. Therefore, it is confirmed that cocaine impairs memory of experiences acquired prior to drug consumption, and memory impairment is maintained with the time increase cocaine administration.

The main cocaine effect when it is administered acutely, as mentioned previously, is the inhibition of DA reuptake, and the consequent increase in free DA in the presynaptic cleft (Nestler, 2005). However, chronic cocaine use is associated with DA underactive since on one hand, it induces a lower DA release (Martinez et al., 2007; Volkow et al., 1997) and on the other, less D2 receptor availability (Briand et al., 2008; Nader et al., 2002; Volkow et al., 1993). This decline in activity of cocaine-induced DA could be related with memory retrieval impairment, because there is a relationship between learning and memory processes and DA (Rinaldi et al., 2007). Specifically, it is known that DA controls the maintaining of long term memory via D1 receptors in the dorsal region of hippocampus (Bethus et al., 2010).

Memory impairment induced by cocaine has been demonstrated previously by many researchers (Achat-Mendes et al., 2007; George et al., 2008; Iñiguez et al., 2011; Ramirez et al., 2009), as a mechanism that could contribute to development of drug addiction. In this work, we show, for the first time, the cocaine effect on the spatial memory retrieval of experiences acquired prior to cocaine consumption.

2. NF-KB ACTIVITY

It has been shown the decrease of NF- κ B activity in frontal cortex and hippocampus due to the cocaine administration (Figure 79 and Figure 80). As it has been previously postulated, the most important cocaine neuroadaptation when this drug is administered chronically, is the decline of D2 receptors availability (Volkow et al., 1993), and if we consider that these D2 receptors regulate NF- κ B activity (Takeuchi and Fukunaga, 2004; Yang et al., 2003), it is possible to establish a relationship between the decrease in NF- κ B activity and the effects of long-term cocaine treatment. In fact, we show a statistically significant relationship between the decrease in the NF- κ B activity in the frontal cortex and deficits in spatial memory (Figure 81) at 20 days of drug administration. It has been previously mentioned the importance of NF- κ B in the memory formation, but is also important in the memory retrieval, as evidenced by Boccia (2005) and our results (Boccia et al. 2005; Muriach et al, 2010).

Several authors have demonstrated the NF- κ B influence in synaptic plasticity (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009; Marini et al., 2004; Mattson and Meffert, 2006; Memet, 2006). On the other hand, it is well known that cocaine also induces changes in synaptic plasticity associated with changes in memory and learning (Chao and Nestler, 2004; Hyman et al., 2006; Bonci and Jones, 2005; Kelley, 2004; Nestler, 2002; Thomas et al., 2008; Thomas and Malenka, 2003). Therefore, it is possible that changes in synaptic plasticity associated with chronic cocaine administration, especially in the spatial memory retrieval, could be mediated by NF- κ B, as could be interpreted from Figure 81.

At the same time, it is well established that LTP is the basis of memory formation in the hippocampus (Bliss and Collingridge, 1993). Besides of this, Albeni and Mattson have reported that the prevention of the NF- κ B binding to their consensus DNA sequence reduces the magnitude of LTP in hippocampus (Albeni and Mattson, 2000). This supports our findings related to damage in the memory recovery (Figure 76 and Figure 77) with the decrease of NF- κ B activity in the hippocampus (Figure 80) of the cocaine-treated rats.

3. STUDY OF OTHER PROTEINS INVOLVED IN LEARNING AND MEMORY PROCESSES

Several authors have demonstrated the influence of DA in learning and memory processes (Bethus et al., 2010, Li et al., 2003, Rinaldi et al., 2007; Rossato et al., 2009). DA acts, among others, on D1 receptors, and it has been documented that D1 activation is involved in memory formation by its association to Gs proteins (Hartman and Civelli, 1996). When DA acts on this kind of receptors, it activates PKA by cAMP, this kinase phosphorylates the transcription factor CREB inducing the activation of the immediate gene cFos, and genes involved in memory and learning processes (Bethus et al. 2010, Jay, 2003; Nestler and Aghajanian, 1997). Furthermore, in the hippocampus, the memory core area, the majority of DA receptors are from the D1 family (Niznik and Van Tol, 1992). Therefore, the decline shown of CREB phosphorylation in the hippocampus after cocaine administration (Figure 82 and Figure 83) could related to the decrease of dopaminergic function (Martinez et al., 2007; Volkow et al., 1997), and partially responsible for the memory impairment observed (

Figure 76). In fact, it has been shown experimentally that DA depletion induces an impairment in learning and memory processes in prefrontal cortex and hippocampus (Gasbarri et al., 1996; Nelson et al., 2011). Furthermore, CREB activation is demonstrated in rat hippocampus when developing spatial memory task, as in the water maze test (Mizuno et al., 2002; Morris et al., 2006, Porte et al., 2008), therefore the decrease of CREB phosphorylation in

hippocampus (Figure 82 and Figure 83) may be associated with memory impairment.

Since CREB and NF- κ B are involved in memory formation and synaptic plasticity (Bourtchuladze et al., 1994; Kandel, 2001; Armentia Lopez et al., 2007; Meffert et al., 2003), it is interesting to study if there is a connection between these transcription factors in this chronic cocaine model. In fact, Kaltschmidt et al. suggested a new transcriptional cascade where NF- κ B pathway may control CREB through the expression of PKA (a kinase that phosphorylates CREB), namely the PKA catalytic alpha (PKAc α) (Kaltschmidt et al., 2006). The connection between NF- κ B and CREB is demonstrated in our work by the statistically significant positive correlation between these two factors in the hippocampus (Figure 84).

pCREB levels do not change in the frontal cortex of cocaine treated rats after 36 days of administration, contrary to what happens in hippocampus, but as shown in Figure 85 and Figure 86, there is a reduction of PKAc α levels in this area. In fact, it should also be noted that these levels correlate positively with NF- κ B activity (Figure 87), confirming the connection between NF- κ B and CREB via PKA α given by Kaltschmidt et al. (2006) (Kaltschmidt et al., 2006). Since PKA is related to memory processes (Grimes et al., 2012; Isiegas et al.; 2006; Koh and Bernstein, 2003), the observed decrease in PKA levels in the frontal cortex after cocaine administration (Figure 86 and Figure 87) may also contribute to memory retrieval impairment (Figure 76), task which is also more dependent of frontal cortex than hippocampus (Takehara et al., 2003).

Furthermore Figure 88 and Figure 89, it has been described a decrease in BDNF levels in the frontal cortex in cocaine-treated rats. BDNF is a protein regulated by CREB (Tao et al., 1998), it is also involved in synaptic plasticity, and in the learning and memory processes (Callaghan and Kelly, 2012; Hemmerle et al., 2012; Leibrock et al., 1989, Mizuno et al., 2012; McCarthy et al., 2012). Therefore, the decrease in BDNF may also contribute to the damage of the memory retrieval observed after cocaine administration (Figure 76). At the same time, it is important to note that BDNF may also be regulated by NF- κ B (Marini et al., 2004), this alternative also fits with the statistically significant

positive correlation between BDNF levels and NF- κ B activity in the frontal cortex shown in Figure 90.

It has been proposed that NF- κ B acts as a critical homeostasis modulator between excitatory and inhibitory neuronal function (O'Mahony et al., 2006). Specifically, animals that do not express NF- κ B have increased LTP, promoting exploratory activity, showing higher incidence of crisis, and improving performance in several tests of spatial learning (O'Mahony et al., 2006). Interestingly these are features observed in rats after cocaine administration (deIolmo et al.; 2006 Gasior et al., 2004; Huang et al. 2007a). These features are consistent with the ability of cocaine (probably due to its negative influence on GABAergic activity), to enhance excitatory signals (Freund and Buzsaki, 1996). Furthermore, cocaine also causes a GABAergic inhibitory tone decrease, through the modulation of their receptors (Frankowska et al., 2009; Gasior et al., 2004; Huang et al. 2007a; Liu et al., 2005). In this regard, it is important that NF- κ B has also been postulated as a positive regulator for the establishment of inhibitory GABAergic tone in vivo (O'Mahony et al., 2006). Moreover, GABA synthesis is regulated by an enzyme in the brain of mammals, the glutamate decarboxylase (Soghomonian and Martin, 1998). O'Mahony et al. have postulated that NF- κ B regulates a GAD isoenzyme, the GAD65 (O'Mahony et al., 2006). In our study, no change of GAD65 levels were found after cocaine administration in hippocampus, but we have found a statistically significant correlation between the expression of GAD65 and NF- κ B activity (Figure 91), giving support to the propose above.

In summary, the data provided by this thesis demonstrates the crucial role of NF- κ B activity and CREB in the impairment of spatial memory retrieval induced by cocaine administration, as well as a possible protective role of topiramate in some cocaine negative effects.

CONCLUSIONS

1. Cocaine administered at dose of 15 mg/kg, alters learning and also memory retrieval of previous experiences in our rat experimental model.
2. NF- κ B activity is reduced after 20 and 36 days of cocaine administration in frontal cortex and correlates with memory impairment.
3. Cocaine induces a decrease of antioxidant defenses (GSH concentration and GPx activity) as well as an increase in nitric oxide synthase activity after 20 days of cocaine administration. Both of them, a decrease in GPx activity, and the increase of nNOS activity correlate with better acquisition of new task in the Morris water maze test.
4. Cocaine administered during 36 days induces a decrease of CREB activation in the hippocampus. Furthermore, PKAc α and BDNF levels are reduced in the frontal cortex. All of these parameters correlate with the decrease of NF- κ B activity as well as with the memory impairment.
5. Topiramate is able to prevent all the alterations observed at 20 days of cocaine administration.

BIBLIOGRAFÍA

- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y. 2007. Impairment in consolidation of learned place preference following dopaminergic neurotoxicity in mice is ameliorated by N-acetylcysteine but not D1 and D2 dopamine receptor agonists. *Neuropsychopharmacology* 32:531-541.
- Adams J, Klaidman L, Odunze I, Shen H, Miller C. 1991. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathion disulfide, and vitamin E. *Mol Chem Neuropathol* 14:213-226.
- Akhondzadeh S, Hampa AD. 2005. Topiramate prevents ecstasy consumption: a case report. *Fundam Clin Pharmacol* 19:601-602.
- Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, El-Remessy A, Bartoli M, Parpia AK, Liou G, Caldwell RB. 2008. Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3239-3244.
- Albensi BC, Mattson MP. 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappa B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 35:151-159.
- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.
- Almaguer-Melian W, Cruz-Aguado R, Bergado JA. 2000. Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content. *Synapse* 38:369-374.
- Almansa I, Fernandez A, Garcia-Ruiz C, Muriach M, Barcia JM, Miranda M, Fernandez-Checa JC, Romero FJ. 2009. Brain mitochondrial alterations after chronic alcohol consumption. *J Physiol Biochem* 65:305-312.
- Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C. 1992. Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11347-1151.
- Alvaro-Bartolome M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA. 2011. Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience* 196:1-15.
- Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. 1993. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295-307.
- Amara SG, Kuhar MJ. 1993. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 16:73-93.
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. 2001. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11:8-17.
- Anderson N, Oliver MN. 2003. Oral topiramate effective for alcoholism. *J Fam Pract* 52:682-683.
- Ang E, Chen J, Zagouras P, Magna H, Holland J, Schaeffer E, Nestler EJ. 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J Neurochem* 79:221-224.
- Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, Di Renzo GF. 2003. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett* 139:125-133.
- Arnal E, Miranda M, Barcia J, Bosch-Morell F, Romero FJ. 2010. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166:271-278.

- Arnone D. 2005. Review of the use of Topiramate for treatment of psychiatric disorders. *Annals of General Psychiatry* 4:5.
- Asanuma M, Cadet JL. 1998. Methamphetamine-induced increase in striatal NF-kappaB DNA-binding activity is attenuated in superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 60:305-309.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. 2000. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265-277.
- Baeuerle PA, Baltimore D. 1988. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53:211-217.
- Baeuerle PA, Henkel T. 1994. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12:141-179.
- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y. 2004. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* 19:1115-1118.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13445-13452.
- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y. 2008. Differential role of the nNOS gene in the development of behavioral sensitization to cocaine in adolescent and adult B6;129S mice. *Psychopharmacology (Berl)* 200:509-519.
- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y. 2009. The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457:120-124.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.
- Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH. 2001. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24:99-106.
- Bardo M. 1998. Neuropharmacological Mechanisms of Drug Reward: Beyond Dopamine in the Nucleus Accumbens. *Clinical Reviews in Neurobiology* 12:37-67.
- Barkett M, Gilmore TD. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6910-6924.
- Bashkatova V, Meunier J, Maurice T, Vanin A. 2005. Memory impairments and oxidative stress in the hippocampus of in-utero cocaine-exposed rats. *Neuroreport* 16:1217-1221.
- 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.
- Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.
- Bechara A, Damasio H, Damasio A. 2000. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex.* 10:295-307.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Bell K, Duffy P, Kalivas PW. 2000. Context-specific enhancement of glutamate transmission by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 23:335-344.

- Berglind WJ, See RE, Fuchs RA, Ghee SM, Whitfield TW, Jr, Miller SW, McGinty JF. 2007. A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci* 26:757-766.
- Berglind WJ, Whitfield TW, Jr, LaLumiere RT, Kalivas PW, McGinty JF. 2009. A single intra-PFC infusion of BDNF prevents cocaine-induced alterations in extracellular glutamate within the nucleus accumbens. *J Neurosci* 29:3715-3719.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E, Girault JA. 2008. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28:5671-5685.
- Bethus I, Tse D, Morris RG. 2010. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J Neurosci* 30:1610-1618.
- Bhargava HN, Kumar S. 1997. Sensitization to the locomotor stimulant activity of cocaine is associated with increases in nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice. *Pharmacology* 55:292-298.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324-1336.
- Blendy JA, Maldonado R. 1998. Genetic analysis of drug addiction: the role of cAMP response element binding protein. *J Mol Med (Berl)* 76:104-110.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. 2001. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 21:4668-4677.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, Romano A. 2005. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* 27:13436-13445.
- Bolla KI, Eldreth DA, London ED, Kiehl KA, Mouratidis M, Contoreggi C, Matochik JA, Kurian V, Cadet JL, Kimes AS and others. 2003. Orbitofrontal cortex dysfunction in abstinent cocaine abusers performing a decision-making task. *Neuroimage* 19:1085-1094.
- Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.
- Bonthius DJ, Luong T, Bonthius NE, Hostager BS, Karacay B. 2008. Nitric oxide utilizes NF-kappaB to signal its neuroprotective effect against alcohol toxicity. *Neuropharmacology* 56:716-731.
- Borges K, Dingledine R. 2001. Functional organization of the GluR1 glutamate receptor promoter. *J Biol Chem* 276:25929-25938.
- Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaisser E, Copeland J, McDonagh P, Debré P, Gandjbakhch I. 2004. The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26:932-938.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68.

- Bozon B, Davis S, Laroche S. 2003. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40:695-701.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 202:145-156.
- Braugher J, Hall E. 1989. Central nervous system trauma and stroke I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 6:289-301.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.
- Briand LA, Flagel SB, García-Fuster MJ, Watson SJ, Akil H, Sarter M, Robinson TE. 2008. Persistent Alterations in Cognitive Function and Prefrontal Dopamine D2 Receptors Following Extended, but Not Limited, Access to Self-Administered Cocaine. *Neuropsychopharmacology* 33:2969-2980.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14515-14520.
- Brown JS, Papadopoulos G, Neumann PJ, Friedman M, Miller JD, Menzin J. 2005. Cost-effectiveness of topiramate in migraine prevention: results from a pharmacoeconomic model of topiramate treatment. *Headache* 45:1012-1022.
- Buckner RL, Kelley WM, Petersen SE. 1999. Frontal cortex contributes to human memory formation. *Nat Neurosci* 2:311-314.
- Bussone G, Diener HC, Pfeil J, Schwalen S. 2005. Topiramate 100 mg/day in migraine prevention: a pooled analysis of double-blind randomised controlled trials. *Int J Clin Pract* 59:961-968.
- Byrne JH, Kandel ER. 1996. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16:425-435.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:766-775.
- Callaghan CK, Kelly AM. 2012. Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus* 22:2127-2135.
- Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. 2005. The many faces of CREB. *TRENDS in Neurosciences* 28:436-445.
- Carlezon WA, Jr, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ. 1998. Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 282:2272-2275.
- Ceccatelli S, Tamm C, Sleeper E, Orrenius S. 2004. Neural stem cells and cell death. *Toxicol Lett* 149:59-66.
- Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield A. 2008. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 45:81-85.

- Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. 1997. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke* 28:1073-1080.
- Coligan JE. 2003. *Current Protocols in Protein Science*. 810 p.
- Collins SL, Kantak KM. 2002. Neuronal nitric oxide synthase inhibition decreases cocaine self-administration behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 159:361-369.
- Contestabile A, Ciani E. 2004. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem. Int* 45:903-914.
- Contestabile A, Monti B, Contestabile A, Ciani E. 2003. Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration / neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. *Curr. Med. Chem* 10:2147-2174.
- Courtney S, Petit L, Haxby J, Ungerleider L. 1998. The role of prefrontal cortex in working memory: examining the contents of consciousness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:1819-1828.
- Croll SD, Wiegand SJ, Anderson KD, Lindsay RM, Nawa H. 1994. Regulation of neuropeptides in adult rat forebrain by the neurotrophins BDNF and NGF. *Eur J Neurosci* 6:1343-1353.
- Cruz-Aguado R, Almaguer-Melian W, Diaz CM, Lorigados L, Bergado J. 2001. Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain. *Brain Res Bull* 55:327-333.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Cardoso SM, Borges F, Swerdlow RH, Macedo T, de Oliveira CR. 2006. Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. *Brain Res* 1089:44-54.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira RC. 2008. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res. Rev* 58:192-208.
- Chambers D, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord J, Yoshida S, Parmley L, Downey J. 1985. Xanthine oxidase as a source of free radicals damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 17:145-152.
- Chao J, Nestler EJ. 2004. Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113-132.
- Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, Haley JE, Steinmetz JE. 1992. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3:567-570.
- Chen Z, Gardi J, Kushikata T, Fang J, Krueger JM. 1999. Nuclear factor-kappaB-like activity increases in murine cerebral cortex after sleep deprivation. *Am J Physiol* 276:R1812-R1818.
- Chiu CS, Deng JS, Hsieh MT, Fan MJ, Lee MM, Chueh FS, Han CK, Lin YC, Peng WH. 2009. Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto) ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *Am J Chin Med* 37:889-902.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS. 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.

- Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. 2010. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 93:415-421.
- Danielson SR, Andersen JK. 2008. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 44:1787-1794.
- Davis RL, Syapina PJ. 2004. Ethanol increases nuclear factor- κ B activity in human astroglial cells. *Neurosci Lett* 371:128-132.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-7801.
- Dawson VL, Dawson TM. 1998. Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog. Brain Res* 118:215-229.
- De Bernardi C, Ferraris S, D'Innella P, Do F, Torre E. 2005. Topiramate for binge eating disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:339-341.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 17:4426-4441.
- Dean O, Bush AI, Berk M, Copolov DL, van den Buuse M. 2009. Glutathione depletion in the brain disrupts short-term spatial memory in the Y-maze in rats and mice. *Behav Brain Res* 198:258-262.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36:527-538.
- deOlmo N, Higuera-Matas A, Miguéns M, García-Lecumberri C, Ambrosio E. 2007. Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task. *Psychopharmacology (Berl.)* 195:19-25.
- deOlmo N, Higuera-Matas A, Miguéns M, García-Lecumberri C, Borcel E, Solis JM, Ambrosio E. 2006. Hippocampal synaptic plasticity and water maze learning in cocaine self-administered rats. *Ann N Y Acad Sci* 1074:427-437.
- Della-Maggiore V, Sekuler AB, Grady CL, Bennett PJ, Sekuler R, McIntosh AR. 2000. Corticolimbic interactions associated with performance on a short-term memory task are modified by age. *J. Neurosci.* 20:8410–8416.
- Denis-Donini S, Dellarole A, Crociara P, Francese MT, Bortolotto V, Quadrato G, Canonico PL, Orsetti M, Ghi P, Memo M and others. 2008. Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF- κ B p50-deficient mice. *The Journal of Neuroscience* 28:3911–3919.
- Dey S, Mactutus CF, Booze RM, Snow DM. 2007. Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling. *Neuroscience* 144:509-521.
- Di Chiara G, Tanda G, Bassareo V, Pontieri F, Acquas E, Fenu S, Cadoni C, Carboni E. 1999. Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 877:461-485.
- Diamond M, Dahlöf C, Papadopoulos G, Neto W, Wu SC. 2005. Topiramate improves health-related quality of life when used to prevent migraine. *Headache* 45:1023-1030.
- Dietrich JB, Mangeol A, Revel MO, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. 2005. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and

- induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology* 48:965-974.
- Dodgson SJ, Shank RP, Marynoff BE. 2000. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia* 41:35-39.
- Dominguez-Escriba L, Hernandez-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM, Canales JJ. 2006. Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 24:586-594.
- Donovan M, Carmody RJ, Cotter TG. 2001. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 276:23000-23008.
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Edenberg HJ, Xuei X, Wetherill LF, Bierut L, Bucholz K, Dick DM, Hesselbrock V, Kuperman S, Porjesz B, Schuckit MA and others. 2008. Association of NFKB1, which encodes a subunit of the transcription factor NF-kappaB, with alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 17:963-970.
- Edwards S, Graham DL, Bachtell RK, Self DW. 2007. Region-specific tolerance to cocaine-regulated cAMP-dependent protein phosphorylation following chronic self-administration. *Eur J Neurosci* 25:2201-2213.
- Eisch AJ, Mandyam CD. 2004. Drug dependence and addiction. II: Adult neurogenesis and drug abuse. *Am J Psychiatry* 161:426.
- El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR. 2007. Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci* 18:37-66.
- Ernst M, Bolla K, Mouratidis M, Contoreggi C, Matochik JA, Kurian V, Cadet JL, Kimes AS, London ED. 2002. Decision-making in a risk-taking task: a PET study. *Neuropsychopharmacology* 26:682-691.
- Estall LB, Grant SJ, Cicala GA. 1993. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 46:959-962.
- Estrada C, Murillo-Carretero M. 2005. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 11:294-307.
- Everitt BJ, Robbins TW. 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.
- Farook JM, Morrell DJ, Lewis B, Littleton JM, Barron S. 2007. Topiramate (Topamax) reduces conditioned abstinence behaviours and handling-induced convulsions (HIC) after chronic administration of alcohol in Swiss-Webster mice. *Alcohol Alcohol* 42:296-300.
- Farooqui T. 2008. Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. *Behav Neurosci* 122:433-447.
- Fillebeen C, Pantopoulos K. 2002. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7:15-22.
- Frankowska M, Nowak E, Filip M. 2009. Effects of GABAB receptor agonists on cocaine hyperlocomotor and sensitizing effects in rats. *Pharmacol Rep* 61:1042-1049.
- Freudenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, Romano A. 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory

- avoidance long-term memory in mice. *European Journal of Neuroscience* 21:2845–2852.
- Freund TF, Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, Israel A, Memet S. 2003. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* 23:9403-9408.
- Fridovich I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.
- Fumagalli F, Caffino L, Racagni G, Riva MA. 2009. Repeated stress prevents cocaine-induced activation of BDNF signaling in rat prefrontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:402-408.
- Fumagalli F, Di Pasquale L, Caffino L, Racagni G, Riva MA. 2007. Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 26:2756–2763.
- Furukawa K, Mattson MP. 1998. The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-alpha in hippocampal neurons. *J Neurochem* 70:1876-1886.
- Gabig T, Babior B. 1979. The O₂(-) forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.
- Gardner EL, Ashby CR, Jr. 2000. Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. *Neurosci Biobehav Rev* 24:115-118.
- Garthwaite J. 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience* 27:2783-2802.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-387.
- Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD. 1996. Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 74:1037-1044.
- Gasior M, Kaminski R, Witkin JM. 2004. Pharmacological modulation of GABA(B) receptor affects cocaine-induced seizures in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 174:211-219.
- Gass JT, Olive MF. 2008. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218-265.
- George MS, Anton RF, Bloomer C, Teneback C, Drobles DJ, Lorberbaum JP, Nahas Z, Vincent DJ. 2001. Activation of Prefrontal Cortex and Anterior Thalamus in Alcoholic Subjects on Exposure to Alcohol-Specific Cues. *Arch Gen Psychiatry* 58:345-352.
- George O, Mandyam CD, Wee S, Koob GF. 2008. Extended access to cocaine self-administration produces long-lasting prefrontal cortex-dependent working memory impairments. *Neuropsychopharmacology* 33:2474-2482.

- Gibbs JW, Sombati S, DeLorenzo RJ, Coulter DA. 2000. Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 41:Suppl 1:S10-S16.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. 1996. Oxidative stress and vascular diabetic complications. *Diabetes Care* 19:257-267.
- Golombek DA, Agostino PV, Plano SA, Ferreyra GA. 2004. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO / cGMP pathway. *Neurochem. Int* 45:929-936.
- Gordey M, DeLorey TM, Olsen RW. 2000. Differential sensitivity of recombinant GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes to modulation by topiramate. *Epilepsia* 41:S25-S29.
- Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW. 2007. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10:1029-1037.
- Gramsbergen JB, Sandberg M, Møller-Dall A, Kornblit B, Zimmer J. 2002. Glutathione depletion in nigrostriatal slice cultures: GABA loss, dopamine resistance and protection by the tetrahydrobiopterin precursor sepiapterin. *Brain Res* 935:47-58.
- Grilli M, Ribola M, Alberici A, Valerio A, Memo M, Spano P. 1995. Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 270:26774-26777.
- Grimes MT, Harley CW, Darby-King A, McLean JH. 2012. PKA increases in the olfactory bulb act as unconditioned stimuli and provide evidence for parallel memory systems: pairing odor with increased PKA creates intermediate- and long-term, but not short-term, memories. *Learn Mem* 19:107-115.
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y. 2003. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 23:742-747.
- Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. 1995. Synaptic activation of NF- κ B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9077-9081.
- Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP. 1998. Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med* 4:957-962.
- Gupta A, Tripathi AK, Tripathi RL, Madhu SV, Banerjee BD. 2007. Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 44:373-378.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514.
- Hardy K, Hunt NH. 2004. Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 37:1550-1563.
- Hartman DS, Civelli O. 1996. Molecular attributes of dopamine receptors: new potential for antipsychotic drug development. *Ann Med* 28:211-219.

- Hastings TG. 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* 64:919-924.
- Hausladen A, Stamler JS. 1999. Nitrosative stress. *Methods Enzymol* 300:389-395.
- He XL, Zhou WQ, Bi MG, Du GH. 2010. Neuroprotective effects of icariin on memory impairment and neurochemical deficits in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Brain Res* 1334:73-83.
- Heidegger T, Krakow K, Ziemann U. 2010. Effects of antiepileptic drugs on associative LTP-like plasticity in human motor cortex. *Eur J Neurosci* 32:1215-1222.
- Heinzel B, John M, Klatt P, Bohm E, Mayer B. 1992. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281 (Pt 3):627-630.
- Hemmerle AM, Dickerson JW, Herring NR, Schaefer TL, Vorhees CV, Williams MT, Serogy KB. 2012. (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") treatment modulates expression of neurotrophins and their receptors in multiple regions of adult rat brain. *J Comp Neurol* 520:2459-2474.
- Hernandez PJ, Sadeghian K, Kelley AE. 2002. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 5:1327-1331.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, García-Verdugo JM. 2003. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7919-7924.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
- Hoch M, Jackle H. 1993. Transcriptional regulation and spatial patterning in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 3:566-573.
- Hope BT, Michael GJ, Nigge KM, Vincent SR. 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2811-2814.
- Horger BA, Iyasere CA, Berhow MT, Messer CJ, Nestler EJ, Taylor JR. 1999. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19:4110-4122.
- Huang CC, Lin HJ, Hsu KS. 2007a. Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 17:1877-1888.
- Huang J, Ren RN, Chen XM, Ye LY. 2007b. An experimental study on hepatotoxicity of topiramate in young rats. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 9:54-58.
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. 1997. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7531-7536.
- Hyman SE. 2005. Addiction: A Disease of Learning and Memory. *Am J Psychiatry* 162:1414-1422.

- Hyman SE, Malenka RC. 2001. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews. Neuroscience* 2:695-703.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci* 29:565-598.
- Iñiguez SD, Charntikov S, Baella SA, Herbert MS, Bolaños-Guzmán CA, Crawford CA. 2012. Post-Training Cocaine Exposure Facilitates Spatial Memory Consolidation in C57BL/6 Mice. *Hippocampus* 22:802-813.
- Ioannides-Demos LL, Proietto J, McNeil JJ. 2005. Pharmacotherapy for obesity. *Drugs* 65:1391-1418.
- Ishikawa M, Mu P, Moyer JT, Wolf JA, Quock RM, Davies NM, Hu XT, Schlüter OM, Dong Y. 2009. Homeostatic synapse-driven membrane plasticity in nucleus accumbens neurons. *J Neurosci.* 29:5820-5831.
- Isiegas C, Park A, Kandel ER, Abel T, Lattal KM. 2006. Transgenic inhibition of neuronal protein kinase A activity facilitates fear extinction. *J Neurosci*:12700-12707.
- Itzhak Y, Anderson KL. 2007. Memory reconsolidation of cocaine-associated context requires nitric oxide signaling. *Synapse* 61:1002-1005.
- Iwai K, Tokunaga F. 2009. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep* 10:706-713.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64:291-370.
- Jareño EJ, Roma J, Romero B, Marin N, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Marselou L, Romero FJ. 2002. Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res* 36:341-344.
- Jay TM. 2003. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol* 69:375-390.
- Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia JM, Romá J, Monfort P, Felipo V, Romero FJ. 2007. Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res* 31:486-492.
- Johnson B, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ. 2003. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *361*:1677-1685.
- Johnson BA. 2005. Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs* 19:873-896.
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar FZ, Ma JZ. 2004. Oral Topiramate Reduces the Consequences of Drinking and Improves the Quality of Life of Alcohol-Dependent Individuals. A Randomized Controlled Trial. *Arch Gen Psychiatry* 61:905-912.
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Gunderson EW, Haughey HM, Wang XQ, Liu L. 2013. Topiramate's effects on cocaine-induced subjective mood, craving and preference for money over drug taking. *Addict Biol* 18:405-416.

- Jones DC, Gunasekar PG, Borowitz JL, Isom GE. 2000. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 74:2296-2304.
- Jones S, Bonci A. 2005. Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr Opin Pharmacol* 5:20-25.
- Juric DM, Miklic S, Carman-Krzan M. 2006. Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res* 1108:54-62.
- Kalivas PW, Duffy P. 1998. Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem* 70:1497-1502.
- Kalivas PW, Volkow ND. 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162:1403-14013.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. 2009. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001271.
- Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prüllage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israël A and others. 2006. NFkappB Regulates Spatial Memory Formation and Synaptic Plasticity through Protein Kinase A/CREB Signaling. *Molecular and cellular biology* 26:2936–2946.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. 1993. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-κB. *Mech. Dev* 43:135-147.
- Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA. 2004. Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 46:1097-1104.
- Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, O'Brien CP. 2004. A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 75:233-240.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kandel ER, Schwartz JH. 1982. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218:433-443.
- Karch SB. Cocaine. 1993. CRC Press. In: Steven B. Karch,Olaf Drummer,Steven B. Karch. *The Pathology of Drug Abuse*. Third Edition.
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. 2002. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109:143-148.
- Karila L, Weinstein A, Benyamina A, Coscas S, Leroy C, Noble F, Lowenstein W, Aubin HJ, Lépine JP, Reynaud M. 2008. Current pharmacotherapies and immunotherapy in cocaine addiction. *Presse Med* 37:689-698.
- Kas J, Blattna J. 1986. Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol* 32:81-92.
- Kasahara J, Fukunaga K, Miyamoto E. 2001. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem* 276:24044-24050.
- Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA. 1988. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1:911-917.
- Kaufman MJ, Levin JM, Ross MH, Lange N, Rose SL, Kukes TJ, Mendelson JH, Lukas SE, Cohen BM, Renshaw P. 1998. Cocaine-induced cerebral vasoconstriction detected in humans with magnetic resonance angiography. *JAMA* 279:376-380.
- Kelley AE. 2004. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179.

- Kelley JB, Anderson KL, Itzhak Y. 2007. Long-term memory of cocaine-associated context: disruption and reinstatement. *Neuroreport* 18:777-780.
- Kempermann G, Gage FH. 2000. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231:220-235.
- Kenna GA, Nielsen DM, Mello P, Schiesl A, Swift RM. 2007. Pharmacotherapy of dual substance abuse and dependence. *CNS Drugs* 21:213-237.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* B2:239-257.
- Keynes RG, Garthwaite J. 2004. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr. Mol. Med* 4:179-191.
- Khazaal Y, Cornuz J, Bilancioni R, Zullino DF. 2006. Topiramate for smoking cessation. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 60:384-388.
- Khoshnan A, Ko J, Watkin EE, Paige LA, Reinhart PH, Patterson PH. 2004. Activation of the I κ B kinase complex and nuclear factor- κ B contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *J Neurosci* 24:7999-8008.
- Kida S, Josselyn SA, Peña de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.
- Kirchner L, Weitzdoerfer R, Hoeger H, Url A, Schmidt P, Engelmann M, Villar SR, Fountoulakis M, Lubec G, Lubec B. 2004. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knock-out mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide* 11:316-330.
- Klann E. 1998. Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 80:452-457.
- Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J* 298:249-258.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 89:5159-5162.
- Koh MT, Bernstein IL. 2003. Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14:405-407.
- Koob GF, Nestler E. 1997. The Neurobiology of Drug Addiction. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 9:482-497.
- Kosower N, Kosowe E. 1978. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109-160.
- Kosten TR, Scanley BE, Tucker KA, Oliveto A, Prince C, Sinha R, Potenza MN, Skudlarski P, Wexler BE. 2006. Cue-induced brain activity changes and relapse in cocaine-dependent patients. *Neuropsychopharmacology* 31:644-650.
- Krasnova IN, Ladenheim B, Cadet JL. 2005. Amphetamine induces apoptosis of medium spiny striatal projection neurons via the mitochondria-dependent pathway. *Faseb J* 19:851-853.
- Kraus J, Borner C, Giannini E, Holtt V. 2003. The role of nuclear factor κ B in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human μ -opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* 64:876-884.

- Krause S, Schindowski K, Zechel S, von Bohlen und Halbach O. 2008. Expression of trkB and trkC receptors and their ligands brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the murine amygdala. *J Neurosci Res* 86:411-421.
- Krushel LA, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 1999. NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 274:2432-2439.
- Kuczewski N, Porcher C, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL. 2009. Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol* 39:37-49.
- Kutluhan S, Nazıroğlu M, Celik O, Yilmaz M. 2009. Effects of Selenium and Topiramate on Lipid Peroxidation and Antioxidant Vitamin Levels in Blood of Pentylentetrazol-Induced Epileptic Rats. *Biol Trace Elem Res* 229:131-140.
- Kuzniecky R, Hetherington H, Ho S, Pan J, Martin R, Gilliam F, Hugg J, Faught E. 1998. Topiramate increases cerebral GABA in healthy humans. *Neurology* 51:627-629.
- Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. 1978. Hepatic cytosolic non-selenium dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 108:981-987.
- Lee DK, Koh WC, Shim YB, Shim I, Choe ES. 2010. Repeated cocaine administration increases nitric oxide efflux in the rat dorsal striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 208:245-256.
- Lee JL. 2009. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci.* 32:413-420.
- Lee JL, Di Ciano P, Thomas KL, Everitt BJ. 2005. Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron* 47:795-801.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341:149-152.
- Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, Salgado TM, Curi R, Planeta CS, Scavone C. 2009. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. *Mol Brain* 2:3.
- Leshner AI. 1997. Addiction is a brain disease, and it matters. *Science* 278:45-47.
- Levenson JM, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC, Sweatt JD. 2004. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *The Journal of Neuroscience* 24:3933-3943.
- Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. 2003. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* 6:526-531.
- Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. 2002. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946:221-231.

- Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, Marini AM. 2001. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J Neurochem* 78:254-264.
- Liu PK, Robertson CS, Valadka A. 2002. The association between neuronal nitric oxide synthase and neuronal sensitivity in the brain after brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 962:226-241.
- Liu QS, Pu L, Poo MM. 2005. Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* 437:1027-1031.
- Loftis JM, Janowsky A. 2000. Regulation of NMDA Receptor Subunits and Nitric Oxide Synthase Expression During Cocaine Withdrawal. *Journal of Neurochemistry* 75:2040–2050.
- Lopez de Armentia M, Jancic D, Olivares R, Alarcon JM, Kandel ER, Barco A. 2007. cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27:13909-13918.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu H, Cheng PL, Lim BK, Khoshnevisrad N, Poo MM. 2010. Elevated BDNF after cocaine withdrawal facilitates LTP in medial prefrontal cortex by suppressing GABA inhibition. *Neuron* 67:821-833.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y. 2006. Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 29:695-703.
- Luo Y, Hattori A, Munoz J, Qin ZH, Roth GS. 1999. Intrastratial dopamine injection induces apoptosis through oxidation-involved activation of transcription factors AP-1 and NF-kappaB in rats. *Mol Pharmacol* 56:254-264.
- Lyng GD, Seegal RF. 2008. Polychlorinated biphenyl-induced oxidative stress in organotypic co-cultures: experimental dopamine depletion prevents reductions in GABA. *Neurotoxicology* 29:301-308.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Macêdo DS, deVasconcelos SM, dosSantos RS, Aguillar LM, Lima VT, Viana GS, deSousa FC. 2005. Cocaine alters catalase activity in prefrontal cortex and striatum of mice. *Neurosci Lett* 387:53-56.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC. 2001. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem* 76:532-538.
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. 2007. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chem* 14:1729-1738.
- Majewska MD. 1996. Neurotoxicity and Neuropathology Associated with Cocaine Abuse. National Institutes of Health NR, editor: National Institute on Drug Abuse.
- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. 2001. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276:45225-45235.
- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA. 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-84.

- Malinow R, Schulman H, Tsien RW. 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Malvaez M, Mhillaj E, Matheos DP, Palmery M, Wood MA. 2011. CBP in the nucleus accumbens regulates cocaine-induced histone acetylation and is critical for cocaine-associated behaviors. *J Neurosci* 31:16941-16948.
- Marin MT, Berkow A, Golden SA, Koya E, Planeta CS, Hope BT. 2009. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 30:1931-1940.
- Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, Lipsky RH. 2004. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF κ B in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restorative Neurology and Neuroscience* 22:121-130.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER. 1997. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 18:899-912.
- Martinez D, Narendran R, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Broft A, Huang Y, Cooper TB, Fischman MW, Kleber HD and others. 2007. Amphetamine-induced dopamine release: markedly blunted in cocaine dependence and predictive of the choice to self-administer cocaine. *Am J Psychiatry* 164:622-629.
- Martins de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Bromberg E, Schroder N. 2007. Differential effects of low and high doses of topiramate on consolidation and retrieval of novel object recognition memory in rats. *Epilepsy Behav* 10:32-37.
- Maryanoff BE, Nortey SO, Gardoki JF, Shank RP, Dodgson SP. 1987. Anticonvulsant O-alkyl sulphamates. 2, 3, 4, 5-bis-O-(1-methylethylidene)-B-D-fructopyranose sulfamate and related compounds. *J Med Chem* 30:880-887.
- Massaad CA, Klann E. 2011. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 14:2013-2054.
- Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD, Hope BT. 2005. Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem* 95:1481-1494.
- Mattson MP, Meffert MK. 2006. Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. 13:852-860.
- Mayr B, Montminy M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
- Maze I, Nestler EJ. 2011. The epigenetic landscape of addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1216:99-113.
- McCarthy DM, Brown AN, Bhide PG. 2012. Regulation of BDNF expression by cocaine. *Yale J Biol Med* 85:437-446.
- McClung CA, Nestler EJ. 2003. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6:1208-1215.
- McFarland K, Davidge SB, Lapish CC, Kalivas PW. 2004. Limbic and motor circuitry underlying footshock-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* 24:1551-1560.

- McGaugh JL. 2000. Memory-a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McGinty JF, Whitfield TW, Jr, Berglind WJ. 2010. Brain-derived neurotrophic factor and cocaine addiction. *Brain Res* 1314:183-193.
- Meffert MK, Baltimore D. 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 28:37-43.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. 2003. NF-kappaB functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6:1072-1078.
- Meister A, Anderson M. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Mémet S. 2006. NF-kB functions in the nervous system: From development to disease *Biochem Pharmacol* 72:1180-1195.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. 2005. Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12:23-29.
- Merlo E, Freudenthal R, Romano A. 2002. The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112:161-172.
- Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. 2000. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148:325-332.
- Miller CA, Marshall JF. 2005. Molecular Substrates for Retrieval and Reconsolidation of Cocaine-Associated Contextual Memory. *Neuron* 47:873-884.
- Minamiyama Y, Takemura S, Tsukioka T, Shinkawa H, Kobayashi F, Nishikawa Y, Kodai S, Mizuguchi S, Suehiro S, Okada S. 2007. Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Biofactors* 30:91-104.
- Miranda M, Bosch-Morell F, Johnsen-Soriano S, Barcia J, Almansa I, Asensio S, Araiz J, Messeguer A, Romero FJ. 2007. Oxidative stress in rat retina and hippocampus after chronic MDMA ('ecstasy') administration. *Neurochem Res* 32:1156-1162.
- Miranda M, Muriach M, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Araiz J, Romá J, Romero FJ. 2004. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol* 79:289-294.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mize RR, Lo F. 2000. Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development. *Brain Res* 886:15-32.
- Mizuno K, Dempster E, Mill J, Giese KP. 2012. Long-lasting regulation of hippocampal Bdnf gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav* 11: 651-659.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima N. 2002. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behavioural Brain Research* 133:135-141.
- Moore RJ, Vinsant SL, Nader MA, Porrino LJ, Friedman DP. 1998. Effect of cocaine self-administration on striatal dopamine D1 receptors in rhesus monkeys. *Synapse* 28:1-9.

- Moreno EA, Cuellar C, Gonzalez A. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, implicaciones y limitaciones. *Cancerología* 46:275-280.
- Mori A, Hiramatsu M, Yokoi I, Edamatsu R. 1990. Biochemical pathogenesis of post-traumatic epilepsy. *Pavlov J Biol Sci* 25:54-62.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Morris RGM, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PAT. 2006. Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus during Encoding and Retrieval. *Neuron* 50:479-489.
- Moya C, Torrens M, Sánchez A, Farré M, Sendino R, Álvarez C, Flores J, Bobes J, Luna A, Díez E and others. 2007. Cocaína. Informes de la comisión clínica. Madrid.
- Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. 2006. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 41:979-984.
- Muriach M, López-Pedrajas R, Barcia JM, Sánchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ. 2010. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem* 114:675-684.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nader MA, Morgan D, Gage HD, Nader SH, Calhoun TL, Buchheimer N, Ehrenkaufer R, Mach RH. 2006. PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat Neurosci* 9:1050-1056.
- National Institutes of Health NR. 2001. Cocaína. Abuso y adicción.
- Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. 2008. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol* 225:39-49.
- Nelson AJ, Cooper MT, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ. 2011. The effect of catecholaminergic depletion within the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex on recognition memory for recency, location, and objects. *Behav Neurosci* 125:396-403.
- Nelson RJ, Trainor BC, Chiavegatto S, Demas GE. 2006. Pleiotropic contributions of nitric oxide to aggressive behavior. *Neurosci. Biobehav* 30:346-355.
- Nestler EJ. 2001. Molecular basis of neural plasticity underlying addiction. *Nature Reviews. Neuroscience* 2:119-128.
- Nestler EJ. 2002. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78:637-647.
- Nestler EJ. 2005. The Neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3:4-10.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. 1997. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278:58-63.

- Nickel MK, Nickel C, Kaplan P, Lahmann C, Mühlbacher M, Tritt K, Krawczyk J, Leiberich PK, Rother WK, Loew TH. 2005. Treatment of aggression with topiramate in male borderline patients: a double-blind, placebo-controlled study. *Biol Psychiatry* 57:495-499.
- Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD. 2003. Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* 6:161-167.
- NIDA. 2008. Drugs, Brains and behaviour. The science of addiction. National Institute on Drug Abuse: National Institute on Drug Abuse.
- Niznik HB, Van Tol HH. 1992. Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J Psychiatry Neurosci* 17:158-180.
- Nordmann R. 1994. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol* 29:513-522.
- Novikova SI, He F, Bai J, Badan I, Lidow IA, Lidow MS. 2005. Cocaine-induced changes in the expression of apoptosis-related genes in the fetal mouse cerebral wall. *Neurotoxicol Teratol* 27:3-14.
- Nowakowska E, Kus K, Czubak A, Jedrzejewska J. 2009. Memory improving and antidepressant effects of topiramate in rats. *Arzneimittelforschung* 59:487-492.
- Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V. 2011. Cocaine Addiction Treatments to improve Control and reduce Harm (CATCH): new pharmacological treatment options for crack-cocaine dependence in the Netherlands. *BMC Psychiatry* 11:135.
- Numa R, Baron M, Kohen R, Yaka R. 2011. Tempol attenuates cocaine-induced death of PC12 cells through decreased oxidative damage. *Eur J Pharmacol* 650:157-162.
- O'Mahony A, Raber J, Montano JM, Foehr E, Ham V, Lu SM, Kwon H, Lefevour A, Chakraborty-Sett S, Greene WC. 2006. NF-kappa B/Rel regulated inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity. *Mol Cell Biol* 26:7283-7298.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. 1997. NF-kappaB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.
- O'Brien CP. 2006. Drug addiction and drug abuse. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGrawHill. p 607-627.
- Observatorio Español Sobre Drogas. 2012. Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) (2010/2012).
- Observatorio Español Sobre Drogas. 2010. Encuesta estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES), 1994-2008.
- Oficina de las Naciones Unidas contra las Drogas y el Delito. 2011. Situación del consumo, la producción y el tráfico de drogas ilícitas a nivel mundial.
- Oliveira MT, Rego AC, Macedo TR, Oliveira CR. 2003. Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1010:667-670.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Pandey SC, Roy A, Zhang H, Xu T. 2004. Partial deletion of the cAMP response element-binding protein gene promotes alcohol-drinking behaviors. *J Neurosci* 24:5022-5030.

- Paravicini TM, Touyz RM. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31:Suppl 2:S170-180.
- Passig C. 1994. Los sistemas de memoria. *Revista de Psicología Universidad de Chile* 5.
- Pavone A, Cardile V. 2003. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia* 44:34-39.
- Peraile I, Granado N, Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Moratalla R, Colado MI, O'Shea E. 2013. Cocaine potentiates MDMA-induced oxidative stress but not dopaminergic neurotoxicity in mice: implications for the pathogenesis of free radical-induced neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 230:125-135.
- Peterson G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
- Petroff OA, Hyder F, Mattson RH, Rothman DL. 1999. Topiramate increases brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in patients with epilepsy. *Neurology* 52:473-478.
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW. 1996. Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16:1550-1560.
- Pierce RC, Kumaresan V. 2006. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30:215-238.
- Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM. 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.
- Pomierny-Chamiolo L, Moniczewski A, Wydra K, Suder A, Filip M. 2013. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox Res* 23:92-102.
- Poo MM. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Porte Y, Buhot MC, Mons NE. 2008. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. *Learn Mem* 15:885-894.
- Preti A. 2007. New developments in the pharmacotherapy of cocaine abuse. *Addict Biol* 12:133-151.
- Price TO, Eranki V, Banks WA, Ercal N, Shah GN. 2012. Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *Endocrinology* 153:362-372.
- Privitera MD. 1997. Topiramate: a new antiepileptic drug. *Ann Pharmacother*. 1164-1173.
- Przewlocka B, Lason W, Machelska H, Przewlocki R. 1994. The effects of cocaine-induced seizures on the proenkephalin mRNA level in the mouse hippocampus: a possible involvement of the nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 168:81-84.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.

- Ramachandran V, Watts L, Maffi S, Chen J, Schenker S, Henderson G. 2003. Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 74:577-588.
- Ramirez DR, Bell GH, Lasseter HC, Xie X, Traina SA, Fuchs RA. 2009. Dorsal hippocampal regulation of memory reconsolidation processes that facilitate drug context-induced cocaine-seeking behavior in rats. *European Journal of Neuroscience* 30:901–912.
- Rattner A, Korner M, Walker MD, Citri Y. 1993. NF-kappa B activates the HIV promoter in neurons. *Embo J* 12:4261-4267.
- Rawls SM, Rodriguez T, Baron DA, Raffa RB. 2006. A nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) attenuates abstinence-induced withdrawal from both cocaine and a cannabinoid agonist (WIN 55212-2) in Planaria. *Brain Res* 1099:82-87.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. 1980. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.
- Rehni AK, Bhateja P, Singh TG, Singh N. 2008. Nuclear factor-kappa-B inhibitor modulates the development of opioid dependence in a mouse model of naloxone-induced opioid withdrawal syndrome. *Behav Pharmacol* 19:265-269.
- Reichardt LF. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Riday TT, Kosofsky BE, Malanga CJ. 2012. The rewarding and locomotor-sensitizing effects of repeated cocaine administration are distinct and separable in mice. *Neuropharmacology* 62:1858-1866.
- Rigoulot MA, Boehrer A, Nehlig A. 2003. Effects of topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the Audiogenic Wistar AS. *Epilepsia* 44:14-19.
- Rinaldi A, Mandillo S, Oliverio A, Mele A. 2007. D1 and D2 receptor antagonist injections in the prefrontal cortex selectively impair spatial learning in mice. *Neuropsychopharmacology* 32:309-319.
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-1223.
- Rockville MD. 1996. National Institute on Drug Abuse. NIDA slide teaching packet for scientists. The brain and the actions of cocaine, opiates, and marijuana.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadía-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moncada S. 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2006. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13:431-440.
- Rossato JI, Bevilaqua LRM, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. 2009. Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. *Science* 325:1017-1020.

- Rubio G, Ponce G, Jiménez-Arriero MA, Palomo T, Manzanares J, Ferre F. 2004. Effects of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry* 37:37-40.
- Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, Renthal W, Graham A, Birnbaum SG, Green TA and others. 2009. Nuclear Factor kappa B Signaling Regulates Neuronal Morphology and Cocaine Reward. *The Journal of Neuroscience* 29:3529 -3537.
- Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Famous KR, Chawla P, Vassoler FM, Overland RP, Xia E, Bass CE, Terwilliger EF and others. 2010. Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. *J Neurosci* 30:11735-11744.
- Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD. 2002. Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80:383-391.
- Santiago AR, Rosa SC, Santos PF, Cristovao AJ, Barber AJ, Ambrosio AF. 2006. Elevated glucose changes the expression of ionotropic glutamate receptor subunits and impairs calcium homeostasis in retinal neural cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4130-4137.
- Sanvicens N, Gómez-Vicente V, Masip I, Messeguer A, Cotter TG. 2004. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *JBC* 17:39268-39278.
- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. 1993. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 92:1564-1571.
- Scharmm H, Rebertson L, Oesch F. 1985. Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 34:3735-3739.
- Schmidt do Prado-Lima PA, Perrenoud MF, Kristensen CH, Cammarota M, Izquierdo I. 2011. Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *J Psychiatry Neurosci* 36:250-255.
- Schmidt K, Amstad P, Ceruti P, Baeuerle PA. 1995. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappaB. *Chem. Biol.* 2:13-22.
- Schreck R, Albertmann K, Bauerle PA. 1992. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-response transcription factor of eukaryotic cells. *Free Rad Res Commun* 17:221-237.
- Schroeder JA, McCafferty MR, Unterwald EM. 2009. Regulation of dynamin 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 in rat nucleus accumbens during acute and repeated cocaine administration. *Synapse* 63:863-870.
- Schuman EM, Madison DV. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506.
- Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG. 1998. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions. *J. Neurosci.* 18:1613-1621.

- Seeger D. 2010. Cocaine, metamfetamine, and MDMA abuse: the role and clinical importance of neuroadaptation. *Clin Toxicol (Phila)* 48:695-708.
- Self DW, Genova LM, Hope BT, Barnhart WJ, Spencer JJ, Nestler EJ. 1998. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci* 18:1848-1859.
- Shaldubina A, Einat H, Szechtman H, Shimon H, Belmaker RH. 2002. Preliminary evaluation of oral anticonvulsant treatment in the quinpirole model of bipolar disorder. *J Neural Transm* 109:433-440.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. 1990. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571-582.
- Shimamura AP. 2000. Toward a cognitive neuroscience of metacognition. *Conscious Cogn* 9:313-326.
- Shinn AK, Greenfield SF. 2010. Topiramate in the treatment of substance-related disorders: a critical review of the literature. *J Clin Psychiatry* 71:634-648.
- Shukitt-Hale B, Erat SA, Joseph JA. 1998. Spatial learning and memory deficits induced by dopamine administration with decreased glutathione. *Free Radic Biol Med* 24:1149-1158.
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr, Shen Y. 1993. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol* 35:391-415.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. In: Press A, editor. London.
- Sies H, de Groot H. 1992. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64-65:547-551.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Sofuoglu M, Kosten TR. 2006. Emerging pharmacological strategies in the fight against cocaine addiction. *Expert Opin Emerg Drugs* 11:91-98.
- Soghomonian JJ, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19:500-505.
- Squire LR. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.
- Squire LR, Zola SM. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13515-13522.
- Stern R, Prohaska M. 1996: Neuropsychological evaluation of executive functioning. In: Dikstein J, Riba M, Oldham J editors. *Review of Psychiatry, Neuropsychiatry for clinicians*. Washington: American Psychiatric Press.
- Sulzer D, Zecca L. 2000. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res* 1:181-195.
- Susswein AJ, Katzoff A, Miller N, Hurwitz I. 2004. Nitric oxide and memory. *Neuroscientist* 10:153-162.
- Svensk A-M, Soini Y, Pääkkö P, Hirvikoski P, Kinnula VL. 2004. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 122:395-404.

- Takehara K, Kawahara S, Kirino Y. 2003. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 23:9897-9905.
- Takeuchi Y, Fukunaga K. 2004. Different activation of NF-kappa B by stimulation of dopamine D2L and D2S receptors through calcineurin activation. *J Neurochem* 90:155-163.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
- Telfer J, Brock J. 2004. Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 10:91-95.
- Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ. 1991. A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res* 548:100-110.
- Théberge FR, Milton AL, Belin D, Lee JL, Everitt BJ. 2010. The basolateral amygdala and nucleus accumbens core mediate dissociable aspects of drug memory reconsolidation. *Learn Mem* 17:444-453.
- Thoenen H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. 2008. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British Journal of Pharmacology* 154:327-342.
- Thomas MJ, Malenka RC. 2003. Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:815-819.
- Tiihonen J, Halonen P, Wahlbeck K, Repo-Tiihonen E, Hyvärinen S, Eronen M, Putkonen H, Takala P, Mehtonen OP, Puck M and others. 2005. Topiramate add-on in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Psychiatry* 66:1012-1015.
- Tirapu-Ustarroz J, Munoz-Céspedes JM. 2005. [Memory and the executive functions]. *Rev Neurol* 41:475-484.
- Torchinsky A, Toder V. 2007. TNFalpha in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: functions and targets. *Rev Diabet Stud* 4:200-209.
- Touyz RM. 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. *Hypertension*. 44: 248-252.
- Tramullas M, Martinez-Cue C, Hurlle MA. 2008. Chronic administration of heroin to mice produces up-regulation of brain apoptosis-related proteins and impairs spatial learning and memory. *Neuropharmacology* 54:640-652.
- Trush M, Mimnaugh E, Gram T. 1982. Activation of pharmacology agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:33-35.
- Tseng KY, O'Donnell P. 2004. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci* 24:5131-5139.
- Tulving E. 2002. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53:1-25.

- Ullah N, Naseer MI, Ullah I, Lee HY, Koh PO, Kim MO. 2011. Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neuropharmacology* 61:1248-1255.
- Undie AS, Weinstock J, Sarau HM, Friedman E. 1994. Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem* 62:2045-2048.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. 2001. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-587.
- Uys JD, Knackstedt L, Hurt P, Tew KD, Manevich Y, Hutchens S, Townsend DM, Kalivas PW. 2011. Cocaine-induced adaptations in cellular redox balance contributes to enduring behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* 36:2551-2560.
- Uys JD, LaLumiere RT. 2008. Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:482-491.
- Van Vleet J, Boon G, Ferrans V. 1981. Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in weaning swine fed silver, cobalt, tellurium, zinc, cadmium, and vanadium. *Am J Vet Res* 42:789-799.
- Vendrell P, Junque C, Pujol J, Jurado MA, Molet J, Grafman J. 1995. The role of prefrontal regions in the Stroop task. *Neuropsychologia* 33:341-352.
- Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. 2003. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 22:1313-1324.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. 1999. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* 13:337-345.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP. 1993. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14:169-177.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM. 2004. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry* 9:557-569.
- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey SL, Logan J, Bendriem B, Christman D and others. 1990. Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry* 147:719-724.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Chen AD, Dewey SL, Pappas N. 1997. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature* 386:830-833.
- Volkow ND, Wang GJ, Ma Y, Fowler JS, Zhu W, Maynard L, Telang F, Vaska P, Ding YS, Wong C and others. 2003. Expectation enhances the regional brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *J Neurosci* 23:11461-11468.
- Volz TJ, Schenk JO. 2004. L-arginine increases dopamine transporter activity in rat striatum via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Synapse* 54:173-182.

- Walters CL, Cleck JN, Kuo YC, Blendy JA. 2005. Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward. *Neuron* 46:933-943.
- Warren MW, Lerner SF, Kobeissy FH, Brezing CA, Jeung JA, Hayes RL, Gold MS, Wang KK. 2007. Calpain and caspase proteolytic markers co-localize with rat cortical neurons after exposure to methamphetamine and MDMA. *Acta Neuropathol* 114:277-286.
- Watkins JC, Jane DE. 2006. The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S100-108.
- Welter M, Vallone D, Samad TA, Meziane H, Usiello A, Borrelli E. 2007. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6840-6845.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. 2002. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 3:921-929.
- White HS. 2005. Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine. *Headache* 45 Suppl 1:S48-56.
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH. 2000. Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia* 41:17-20.
- Wilding J. 2004. Clinical evaluation of anti-obesity drugs. *Curr Drug Targets*:325-332.
- Winkelman JW. 2003. Treatment of nocturnal eating syndrome and sleep-related eating disorder with topiramate. *Sleep Med*:243-246.
- Winyard P, Morris C, Winrow V, Ziaidi M, Blake D. 1994. Free radical pathways in the inflammatory response. In: Rice-Evans C and Burdon R. *Free radical damage and its control*. Amsterdam: Elsevier Science:361-383.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. 2004. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47:61-79.
- Yang J, Yub J, Jia X, Zhu X, Zhao L, Li S, Xu C, Yang C, Wu P, Lu L. 2011. Inhibition of nuclear factor kappa B impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behavioural Brain Research* 2011:592-596.
- Yang M, Zhang H, Voyno-Yasenetskaya T, Ye RD. 2003. Requirement of G-beta-gamma and c-Src in D2 dopamine receptor-mediated nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* 64:447-455.
- Zabel U, Baeuerle PA. 1990. Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61:255-265.
- Zabel U, Henkel T, Silva MS, Baeuerle PA. 1993. Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, and I kappa B protein present in the nucleus. *EMBO J* 12:201-211.
- Zafra F, Lindholm D, Castren E, Hartikka J, Thoenen H. 1992. Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4793-4799.
- Zhang J, Xu TX, Hallett PJ, Watanabe M, Grant SG, Isacson O, Yao WD. 2009. PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the D1/PSD-95/NMDA receptor complex. *J Neurosci* 29:2948-2960.
- Zhang S, Chen J, Wang S. 1998. Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Res* 801:101-106.

- Zheng G, Zhagn X, Chen Y, Zhagn Y, Luo W, Chen J. 2007. Evidence for a role of GABAA receptor in the acute restraint stress-induced enhancement of spatial memory. *Brain Res* 1181:61-73.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. 2002. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of capsase-3. *Cell* 90:405-413.
- Zullino DF, Khazaal Y, Hättenschwiler J, Borgeat F, Besson J. 2004. Anticonvulsant drugs in the treatment of substance withdrawal. *Drugs Today (Barc)* 40:603-619.

