

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBÁREA NEUROCIENCIA - PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

**Cocaína en la adolescencia y la adultez:
efectos a largo plazo en los
comportamientos maternal y afectivo y
en la función cerebral de la rata**

Estudiante: Lic. Hernán Delgado Vivas

Orientadora: Dra. Annabel Ferreira

Co-orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Noviembre de 2016

Montevideo - Uruguay



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy

CUDIM



*concordia res
parvae crescent*



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

CSIC COMISIÓN
SECTORIAL DE
INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Dependencia a cocaína durante la maternidad	1
1.2 Comportamiento maternal y cambios afectivos.....	2
1.2.1 La red neural maternal	3
1.2.2 La CPF en la modulación de la cognición maternal	6
1.3 Efectos de la cocaína en el comportamiento maternal de la rata	7
1.3.1 Efectos a largo plazo.....	8
1.3.2 Exposición pregestacional a la cocaína y sus consecuencias a largo plazo en el comportamiento maternal	8
1.4 Neurobiología de la dependencia a cocaína	9
1.4.1 Mecanismos neurobiológicos implicados en el desarrollo de la sensibilización a cocaína y sus efectos en el comportamiento maternal	11
1.5 Neurodesarrollo adolescente: un período sensible	13
1.5.1 El período adolescente	13
1.5.2 El cerebro adolescente en desarrollo.....	14
1.5.3 Remodelación de la neurotransmisión DAérgica durante la adolescencia.....	15
1.5.4 Remodelación de la neurotransmisión serotoninérgica durante la adolescencia.....	17
1.5.5 La exposición a cocaína durante la adolescencia.	17
1.6 Imagen funcional cerebral	18
1.6.1 Imagen funcional cerebral: PET.....	19
1.6.2 Micro PET/CT.....	19

1.6.3	Neuroimagen funcional en la adicción a cocaína	22
1.7	Planteamiento del problema e hipótesis	22
2	OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	23
2.1	Objetivos Generales	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	METODOLOGÍA.....	24
3.1	Animales.....	24
3.1.1	Grupos experimentales	24
3.1.2	Determinación del día de apertura vaginal.....	25
3.1.3	Determinación de la fase del ciclo estral	25
3.2	Administración de cocaína (de acuerdo a Febo y Ferris (2007)).....	25
3.3	Evaluación de estereotipias durante el tratamiento con cocaína (de acuerdo a Ellinwood y Balster (1974)).....	25
3.4	Prueba de actividad locomotora (de acuerdo a Zuluaga et al. (2005)).....	28
3.5	Apareamiento y gestación	28
3.6	Evaluación de comportamiento maternal, agresión maternal y ansiedad experimental.....	28
3.6.1	Prueba de comportamiento maternal (de acuerdo a Agrati et al. (2008))	28
3.6.2	Agresión maternal: prueba de intruso en caja nido (de acuerdo a Ferreira et al. (2002)).....	30
3.6.3	Prueba de ansiedad experimental: laberinto elevado en cruz (de acuerdo a Pereira et al. (2005)).....	31
3.7	Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes obtenidas en micro-PET.....	32
3.8	Análisis estadístico	33
3.8.1	Pruebas comportamentales	33
3.8.2	Análisis estadístico de imágenes obtenidas por micro-PET	34
4	RESULTADOS.....	36
4.1	Sensibilización comportamental inducida por la administración de cocaína	36

4.1.1	Estereotipias	36
4.1.2	Actividad Locomotora	39
4.2	Parámetros reproductivos	41
4.3	Comportamiento maternal	41
4.4	Agresión maternal.....	48
4.5	Ansiedad experimental	51
4.6	Tasa metabólica cerebral regional	53
5	DISCUSIÓN.....	56
5.1	Efecto de la cocaína en las conductas estereotipadas y en la actividad locomotora de hembras adultas y adolescentes	56
5.2	Efecto de la cocaína en el comportamiento maternal de hembras tratadas en la etapa adulta o en la adolescente	58
5.3	Efecto de la exposición a cocaína sobre la agresión maternal	65
5.4	Efecto de la exposición crónica a cocaína sobre la ansiedad.....	66
5.5	Efecto de la administración de cocaína en el metabolismo cerebral de la glucosa mediante micro-PET	69
6	LIMITACIONES.....	71
7	PERSPECTIVAS.....	72
8	CONCLUSIONES	74
9	COMUNICACIONES CIENTÍFICAS.....	76
10	FINANCIACIÓN	76
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ABREVIATURAS

ADO: Hembras adultas tratadas durante la adolescencia.

ADO_{COCAÍNA}: Hembras tratadas con cocaína durante la adolescencia.

ADO_{SALINA}: Hembras tratadas con salina durante la adolescencia.

ADU: Hembras tratadas durante la adultez.

ADU_{COCAÍNA}: Hembras tratadas con cocaína durante la adultez.

ADU_{SALINA}: Hembras tratadas con salina durante la adultez.

AMY: Amígdala.

APOM: Área preóptica media.

ATV: Área tegmental ventral.

COF: Corteza orbitofrontal.

CPF: Corteza prefrontal.

CPFm: Corteza prefrontal medial.

CT: del inglés, Computed Tomography.

DA: Dopamina.

DAérgico: Dopaminérgico.

DAT: Transportador de dopamina.

NA: Noradrenalina.

NAC: Núcleo Accumbens.

PET: del inglés, Positron Emission Tomography.

PV: Pálido ventral.

RSIQ: rango semi-intercuartil.

TMC: tasa metabólica cerebral.

TMCr: tasa metabólica cerebral regional.

5-HT: Serotonina.

RESUMEN

Tanto en la mujer como en la rata, la cocaína interfiere con el comportamiento maternal. La exposición crónica a cocaína se asocia a la disfunción del circuito mesocorticolímbico, clave en los procesos cognitivos y motivacionales que modulan la respuesta materna. Por otra parte, se ha demostrado que durante la adolescencia este circuito sufre una profunda reorganización y es altamente sensible a perturbaciones externas, posicionando a esta etapa como un período de elevada vulnerabilidad biológica a los efectos a largo plazo de la cocaína.

Sobre la base de esta evidencia, en el presente trabajo nos planteamos que la administración de cocaína durante la adolescencia induce mayor sensibilización comportamental y tiene mayores efectos a largo plazo en el comportamiento maternal, la agresión, la ansiedad experimental y en la función cerebral que durante la etapa adulta.

Para probar esta hipótesis, ratas hembras adolescentes (~37 días) y adultas (~90 días) recibieron un tratamiento crónico intraperitoneal con cocaína (15 mg/kg) durante 10 días consecutivos. En primer término, evaluamos el efecto del tratamiento sobre las conductas estereotipadas y la actividad locomotora, demostrando que la droga ocasionó una mayor sensibilización comportamental en ratas adolescentes que en adultas.

A los 3-8 días de finalizado el tratamiento, las hembras se aparearon y habiendo transcurrido el período gestacional se realizaron distintas evaluaciones durante el postparto. Así, en segundo lugar evaluamos el comportamiento y la agresión maternal y la ansiedad experimental. Las alteraciones en el comportamiento maternal fueron más pronunciadas en las hembras expuestas a la sustancia durante la adolescencia, en comparación a lo observado en hembras tratadas durante la etapa adulta. Por otro lado, las ratas expuestas a la droga durante la adolescencia mostraron una disminución significativa de la ansiedad en el laberinto elevado en cruz, en comparación a las ratas tratadas cuando adultas, que exhibieron una respuesta ansiogénica. No se observaron diferencias en la agresión maternal entre las hembras tratadas con la droga y sus respectivos controles salinos.

Finalmente y posterior a las evaluaciones comportamentales, exploramos el efecto de la cocaína en la tasa metabólica cerebral regional basal mediante tomografía por emisión de positrones y utilizando como radiofármaco la [¹⁸F]-FDG. El metabolismo cerebral en la

corteza prefrontal medial difirió significativamente entre ambos grupos tratados, con mayores niveles de actividad en las hembras que recibieron la droga cuando adultas.

En la presente tesis mostramos que si bien el tratamiento indujo sensibilización comportamental en ambos grupos de hembras, las hembras adolescentes fueron más sensibles a los efectos motores de la administración crónica de cocaína previa a la gestación, que en ambos grupos tratados la cocaína provocó alteraciones a largo plazo en el comportamiento maternal y ansiedad, y que la actividad de la corteza prefrontal medial entre ellos fue diferente. En particular, la mayor distorsión del comportamiento maternal observada en las hembras que recibieron la droga en la adolescencia sugiere que la cocaína pudo haber modificado la trayectoria normal del neurodesarrollo, afectando procesos que moldean la conectividad y maduración adecuada del circuito mesocorticolímbico en una etapa en que ese sistema no está completamente desarrollado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dependencia a cocaína durante la maternidad

Es ampliamente conocido que tanto el abuso como la dependencia a cocaína generan dificultades para el desarrollo saludable de la vida de las personas. Si bien esta problemática debe ser contemplada en todas las etapas de la vida, existe especial interés en lo que sucede durante las primeras etapas de la maternidad. La interacción y el involucramiento de una madre con su hijo constituyen una experiencia placentera y reforzadora que asegura el cuidado óptimo para el desarrollo del hijo, y motiva la conducta maternal incluso en condiciones de extrema fatiga o ante la presencia de otros estímulos que compitan por la atención (3). No obstante, la investigación clínica y preclínica sugiere que madres que han desarrollado adicciones a sustancias, en particular a cocaína, pueden ver dificultada su capacidad de responder adecuadamente a las señales de su hijo, encontrando estas interacciones menos gratificantes o más estresantes, hecho que puede poner al niño en riesgo (4-7). Se ha visto que mujeres que abusan o dependen del consumo de cocaína, ya sea durante el embarazo o en etapa postparto, desarrollan hábitos de crianza problemáticos y presentan déficits en el vínculo madre-hijo con mayor frecuencia que madres que no consumen cocaína (8-11). El uso y abuso de sustancias psicoactivas durante la maternidad ha sido asociado a incrementos significativos en el descuido y desatención de las necesidades biológicas, afectivas, intelectuales, sociales, morales y éticas del niño (12).

Dada la amplitud de factores biológicos y psicosociales asociados al uso de cocaína, evaluar los efectos de la sustancia en la crianza de los humanos a nivel comportamental y neurobiológico se torna complejo. Asimismo, aunque los estudios en humanos son de gran utilidad en la caracterización del vínculo entre el uso de cocaína y la expresión de la conducta maternal, éstos tienden a manifestar correlaciones y no causalidades. De modo que la posibilidad de controlar estas variables en modelos preclínicos ha abierto nuevas ventanas en la comprensión del efecto de las drogas en el comportamiento parental en humanos.

1.2 Comportamiento maternal y cambios afectivos

La mayoría de las especies de mamíferos exhiben alguna modalidad de cuidado parental hacia las crías, mas ha sido la rata que se ha posicionado como el animal de laboratorio más apropiado para estudiar el comportamiento maternal. Las crías de la rata son altriciales: nacen con los ojos y oídos cerrados, sin pelo, y son incapaces de regular su temperatura corporal, defecar, orinar o de protegerse de ataques, necesitando, de forma similar a los humanos, del cuidado parental para sobrevivir (13). El comportamiento maternal en la rata ha sido bien caracterizado tanto en sus bases comportamentales como neurobiológicas. La rata exhibe comportamientos relativamente estereotipados hacia las crías que pueden ser cuantificados, presentando ventajas para evaluar y determinar las consecuencias ocasionadas por agentes perturbadores. Es preciso señalar, además, que los circuitos neurales que controlan el comportamiento parental se han conservado evolutivamente (14). Se postula la existencia de una homología en el control neural de esta conducta en todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo la especie humana (15, 16), lo cual permite el estudio comparativo de estos mecanismos neurales entre especies.

El comportamiento maternal está constituido por aquellas respuestas o comportamientos desplegados por la hembra que específicamente contribuyen al desarrollo y crecimiento de su descendencia en la fase más vulnerable del período de vida (15). Entre ellos se encuentran las respuestas dirigidas directamente al cuidado de las crías y comportamientos no dirigidos específicamente a las crías que aumentan la probabilidad de que sobrevivan y se desarrollen. Uno de estos comportamientos es la agresión maternal, conducta a través de la cual la hembra protege a sus crías de posibles depredadores y del infanticidio por parte de hembras o machos co-específicos (17-20). Otro cambio comportamental de las hembras postparturientas es la reducción de la ansiedad y el miedo en relación a otros períodos del ciclo reproductivo de la hembra (21-24). Se ha hipotetizado con que la reducción del miedo y de la ansiedad es necesaria para el proceso de transición que permite que estímulos de las crías inicialmente novedosos y ansiogénicos se vuelvan atractivos estimulando el contacto e iniciando el ciclo de reforzamiento positivo que concluye con la formación de un vínculo duradero entre la madre y los hijos (25). Incluso se ha sugerido que la reducción en la ansiedad podría contribuir al incremento de los niveles de agresividad durante el postparto (22-24, 26-28). Este conjunto de comportamientos, que puede desarrollarse desde la pubertad hasta la

adulthood, se encuentra altamente conservado en términos evolutivos, constituyendo su expresión una característica que define a los mamíferos (15). Los hallazgos alcanzados en las últimas décadas han documentado que la expresión de la conducta materna involucra una compleja interacción de procesos neurales de percepción, motivación, afecto y cognición (16, 29). En tanto, los sustratos neurales involucrados en el comportamiento maternal son flexibles y adaptativos, siendo muestra consistente de ello el hecho de que hembras ajusten sus comportamientos a las necesidades de las crías y a lo largo del postparto (30-33) y que desarrollen diferentes estrategias de cuidados en distintos estados hormonales y condiciones fisiológicas (15, 32, 34).

1.2.1 La red neural maternal

Las investigaciones iniciadas por Jay Rosenblatt en la década de los 50 del siglo pasado y continuadas por Michael Numan y Alison Fleming han sido claves en la identificación de los mecanismos neurales involucrados en la expresión del comportamiento maternal. Michael Numan, junto a Barry Komisaruk y Jay Rosenblatt fueron los primeros en demostrar la importancia del área preóptica media (APOM) (35), iniciando los estudios de las bases neurales del comportamiento maternal. En estudios posteriores demostraron que el APOM y los núcleos de la estría terminal operan en la regulación del comportamiento maternal como sitios integradores de las señales hormonales con la información sensorial proveniente de las crías (36-44). En tanto, Fleming y sus colaboradores esclarecieron el rol clave del olfato y sus vías asociadas en las fases iniciales del comportamiento maternal (45), así como la implicancia del núcleo accumbens (NAc) en aspectos motivacionales de las respuestas maternas (46). En la actualidad existe evidencia acumulada proveniente de estudios en animales y humanos que ha puesto de manifiesto la existencia de una red de estructuras cerebrales, incluyendo regiones de la corteza prefrontal (CPF), APOM, núcleos de la estría terminal, amígdala (AMY), hipocampo, área tegmental ventral (ATV) y NAc, entre otras, encargada de modular la respuesta maternal (15, 29, 32, 33, 47-49).

La actividad del APOM es importante en todas las fases del comportamiento maternal, tanto en el inicio como durante su mantenimiento durante el periodo postparto temprano en hembras primíparas y multíparas, así como en hembras vírgenes (37). Se ha visto que lesiones en el APOM alteran el comportamiento maternal (42, 50). Por otra parte, el

APOM es un sitio crítico para la acción de distintas hormonas en la modulación de la respuesta maternal. La acción de los estrógenos y la prolactina en el APOM activa el inicio de la conducta materna (51, 52). Asimismo, la acción de la oxitocina en el APOM es clave en el inicio del comportamiento maternal (15, 53). Se ha sugerido que una de las acciones de los estrógenos en neuronas del APOM sería estimular la expresión de receptores de oxitocina, permitiendo a la oxitocina activar las eferentes del APOM. Éstas proyectan hacia una de las principales estructuras del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (DAérgico), el ATV, y son claves en la interacción de la red neural maternal con el sistema mesolímbico, regulando la motivación maternal (37).

El rol del sistema mesocorticolímbico DAérgico en el procesamiento de estímulos con valor de incentivo y en la mediación de los comportamientos motivados está bien establecido (54, 55), así como reconocido su papel en el procesamiento de la significancia motivacional vinculada a las crías (29, 37, 56-60). En términos básicos, este sistema está conformado por células dopaminérgicas (DAérgicas) del ATV que envían proyecciones al NAc y a la corteza prefrontal medial (CPFm) (59, 61). En el NAc estas neuronas DAérgicas establecen contactos sinápticos en receptores de las neuronas espinosas mediales, que son GABAérgicas y envían proyecciones al pálido ventral (PV) para regular su activación. El PV, por su parte, envía proyecciones hacia el cerebro anterior y las regiones motoras del tronco cerebral, siendo su actividad esencial en la respuesta motora de la conducta maternal (37).

De acuerdo al modelo de Mogenson (1980) y Numan (2007), las proyecciones de las neuronas DAérgicas desde el ATV serían inhibitorias sobre las neuronas espinosas mediales que proyectan desde el NAc al PV, de tal modo que su inhibición resulta en una mayor actividad del PV (54). Estas neuronas espinosas mediales del NAc también reciben aferencias glutamatérgicas desde la AMY, el hipocampo y la CPFm (54). En el modelado de la interacción entre el APOM y el sistema mesolímbico DAérgico (56, 62), se ha propuesto que cuando el APOM es sensibilizada por hormonas (ej. estrógenos, progesterona, oxitocina, prolactina), ésta se torna sensible a los estímulos provenientes de las crías procesados en la CPFm, bulbo olfatorio y áreas límbicas (56, 62), que activan las proyecciones del APOM al ATV, estimulando la liberación de dopamina (DA) en el NAc. En este modelo, las eferentes excitatorias provenientes de las regiones basomedial y basolateral de la AMY y de la CPF portan información de entradas sensoriales asociadas a las crías, que es dirigida tanto al NAc como al PV. Numan et al. (56) proponen que en

ausencia de la liberación de DA desencadenada por las crías, como ocurriría en hembras vírgenes nulíparas, la capacidad de respuesta del PV se vería suprimida por la inhibición mediada por las neuronas espinosas GABAérgicas del NAc, impidiendo la expresión de comportamientos maternos apetitivos, como el acarreo de las crías. Por el contrario, en el caso de hembras postparturientes, los estímulos de las crías a nivel del APOM sensibilizada por la acción hormonal estimulan la liberación de DA en el NAc. En este caso, la acción depresora de la DA sobre las neuronas espinosas GABAérgicas del NAc desinhibe al PV, cuya activación se incrementaría por las entradas glutamatérgicas provenientes de la AMY y CPF (áreas implicadas en el procesamiento de estímulos de las crías), facilitando la expresión de conductas maternas activas (Figura 1).

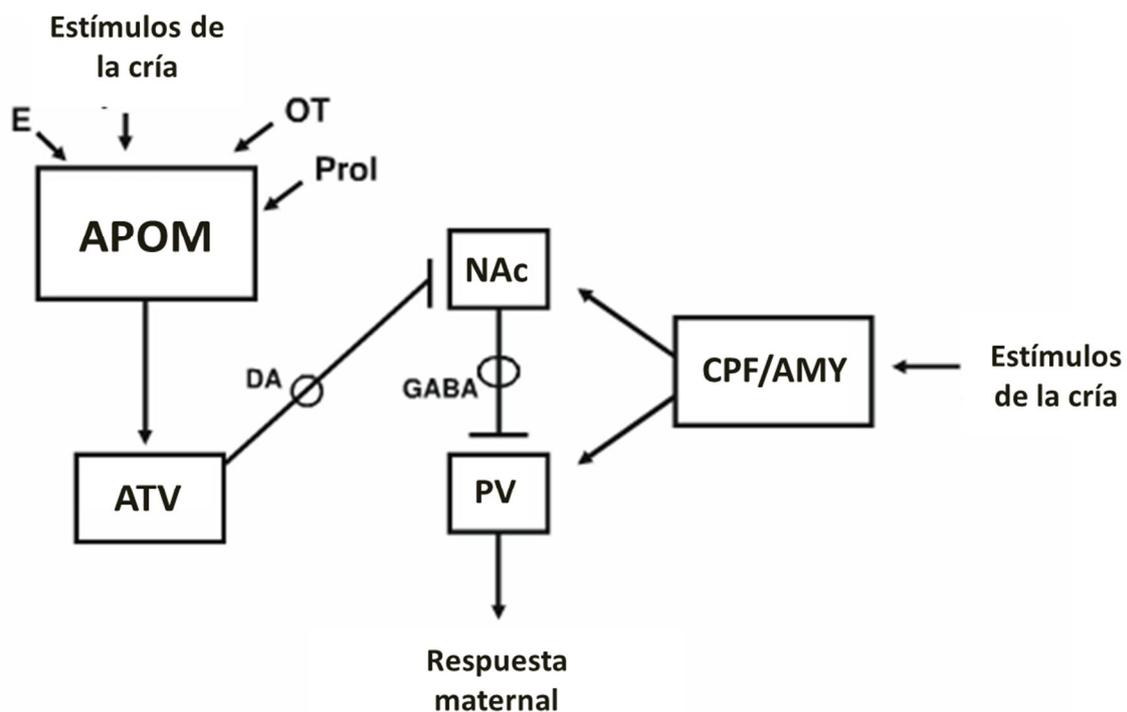


Figura 1. Modelo de la red neural maternal propuesto por Michael Numan. Extraído de Numan et al. (2009).

Los estudios dirigidos a identificar los sustratos neurales que modulan la agresión maternal durante el postparto temprano han mostrado que las áreas del cerebro involucradas en otras formas de agresión también participan en la modulación de la agresión maternal. Regiones como el APOM, hipotálamo anterior, núcleo ventromedial hipotalámico, varios núcleos del complejo amigdalino, la sustancia gris periacueductal y la

CPF, implicadas en la regulación de la agresión en machos, también se encuentran vinculadas a la expresión de la agresión maternal (por revisión ver (27, 63)).

Por ejemplo, lesiones en el núcleo ventromedial hipotalámico reducen considerablemente la agresión maternal (64). Además, distintos reportes han marcado la relevancia de regiones como el tálamo mediodorsal o la corteza insular prefrontal que participan del procesamiento o transmisión de las señales provenientes de las crías, documentado que la lesión de estas áreas reduce la agresión maternal (18, 65). En esta línea, se ha evidenciado que lesiones en el núcleo peripeduncular, involucrado en la transmisión de información de la estimulación de las glándulas mamarias al hipotálamo y estructuras límbicas también reducen la agresión maternal (66, 67).

Llamativamente, el rol del APOM, crítico en la integración de estímulos provenientes de las crías y de factores endócrinos en el comportamiento maternal (68), no ha sido abordado en profundidad el contexto de la agresión maternal (27), aunque su activación parecería estar implicada en la expresión de esta última.

Por otra parte, se ha sugerido que la reducción del miedo y de la ansiedad durante el postparto tiene origen en el perfil endócrino que se establece en el período del periparto y que su mantenimiento también requiere del contacto físico con las crías (19, 67, 69).

1.2.2 La CPF en la modulación de la cognición maternal

El rol de la CPF y de las funciones cognitivas de orden superior ha sido menos considerado por los estudios del comportamiento maternal en roedores. Existen reportes pioneros como los de Beach (70) y Stone (71), que han documentado cómo el patrón organizado del comportamiento materno, en especial el comportamiento de acarreo, se ve alterado o completamente abolido como consecuencia de la remoción del 1-57% de tejido de la corteza. Asimismo, Slotnick y Nigrosh (72, 73), años después, evidenciaron que la lesión del cíngulo anterior y posterior reduce la conducta maternal, también afectando mayoritariamente el acarreo de las crías, tanto en ratas como en ratones.

Ha sido en los últimos años que ha renacido un marcado interés por determinar el rol cortical en la modulación del comportamiento maternal, particularmente el de la CPFm. La CPFm ha sido abordada extensivamente en el contexto de la cognición. Su posición y sus conexiones con el APOM, hipotálamo, AMY, sistema límbico, y otras áreas corticales de

asociación sensorial y motora (74-76), sitúan a la CPFm como una región clave en el procesamiento de información sensorial, motora, motivacional y emocional (68, 77-80).

1.3 Efectos de la cocaína en el comportamiento maternal de la rata

El uso de animales de laboratorio ha sido particularmente útil en la determinación de los mecanismos neurobiológicos implicados en las alteraciones comportamentales producidas por las drogas de abuso. Numerosos reportes han examinado las consecuencias de la exposición a cocaína en la expresión de la conducta maternal de la rata, estableciendo que la cocaína provoca alteraciones cuantitativas y cualitativas en diversos aspectos del comportamiento maternal, como el acarreo de las crías, las posturas de amamantamiento y el interés en la construcción y mantenimiento del nido (6, 7, 81-88).

Por ejemplo, los grupos de Craig Kinsley y de Josephine Johns realizaron una serie de experimentos que demostraron que la administración de cocaína reduce la respuesta maternal en forma dosis dependiente. Administrada de forma aguda, ya sea durante los días 5 o 6 postparto a dosis únicas de 5.0 o 10.0 mg/kg (83), o de forma inmediata al parto, a dosis única de 15 mg/kg (7), ambos grupos evidenciaron que la cocaína producía un incremento en las latencias de contacto, acarreo, lamido y agrupamiento de las crías. En tanto, con el objetivo de evaluar las consecuencias en el comportamiento maternal de la exposición crónica a la sustancia durante la gestación y el postparto, en el día 14 de gestación, Kinsley y sus colaboradores realizaron implantaciones subcutáneas de bombas osmóticas que liberaban 20 mg/kg/día de cocaína y evaluaron la respuesta maternal en los días 1 y 2 postparto, documentando que el tratamiento crónico también alteraba la correcta expresión del comportamiento maternal (83). El equipo de Johns alcanzó resultados similares utilizando un protocolo de administración de dosis diarias de 30 mg/kg durante los días 1 y 20 de gestación (7, 81).

Adicionalmente, se ha documentado que el tratamiento crónico y gestacional con cocaína incrementa la expresión de la agresión maternal en una forma dosis dependiente (6, 7, 81, 87) y genera un incremento en la ansiedad de los animales adultos (89-91).

1.3.1 Efectos a largo plazo

Existe consenso sobre que la administración de cocaína afecta el comportamiento maternal, siempre que ésta sea administrada de forma aguda en dosis superiores a 5 mg/kg (92). En cambio, hace unos años emergió el debate en relación a la persistencia de las alteraciones en el funcionamiento cerebral y comportamiento maternal generadas por la exposición crónica a cocaína. Si bien algunos investigadores apoyaron la noción de que la disrupción del comportamiento maternal se daba únicamente cuando se registraban niveles elevados de la droga en plasma (86), otros ensayos que involucraron el tratamiento crónico de cocaína durante la gestación documentaron la presencia de alteraciones en el comportamiento maternal en los primeros días postparto, durante un período de abstinencia temprana (5, 81), sugiriendo que la cocaína podría tener efectos a largo plazo. Una de las posibilidades era considerar que estas alteraciones estuvieran mediadas por los efectos de la abstinencia. Sin embargo, tal opción fue desechada por un estudio del grupo de Josephine Johns (81), insinuando así que otros mecanismos podrían estar implicados.

1.3.2 Exposición pregestacional a la cocaína y sus consecuencias a largo plazo en el comportamiento maternal

A diferencia de la cantidad de abordajes preclínicos que involucran tratamientos de cocaína durante la gestación o lactancia, son llamativamente escasos los estudios que han evaluado las consecuencias del uso previo de la cocaína en el subsecuente comportamiento maternal. Este punto resulta llamativo considerando que es frecuente que mujeres usuarias de cocaína abandonen su consumo al momento de planificar un embarazo o de la detección del mismo. De hecho, existen reportes que documentan que madres en recuperación de una adicción a cocaína muestran déficits en la expresión de sus roles maternos (93-95), desconociéndose los mecanismos neurobiológicos que estarían mediando estos efectos. La existencia de consecuencias a largo plazo del uso de cocaína ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar seguimiento a estas mujeres en la clínica y de modelar estas circunstancias en la esfera preclínica.

En esta línea, el equipo de investigación liderado por Marcelo Febo en la Universidad de Florida, en EE.UU., diseñó un novedoso modelo con el fin de continuar profundizando en las alteraciones a largo plazo en la expresión del comportamiento maternal ocasionadas por la cocaína (1, 2). El grupo se inclinó por realizar un tratamiento crónico

pregestacional, en un diseño que permite evaluar un escenario de abstinencia más prolongada.

Este tratamiento crónico con cocaína consistió en la administración de dosis de 15 mg/kg, durante 14 días consecutivos a hembras adultas vírgenes. Una vez finalizado el protocolo de administración, las hembras se alojaron con machos sexualmente activos, verificándose la posterior preñez. Así, permanecieron imperturbadas durante la gestación hasta los primeros días del postparto, cuando se realizó la evaluación del comportamiento maternal.

Febo y sus colaboradores demostraron que la sensibilización comportamental a cocaína antes del embarazo altera el comportamiento maternal durante la etapa temprana del postparto. Los resultados obtenidos por Febo (2007) y Nephew (2010) están en línea con aquellos reportados por el equipo de Johns (5, 81), que en conjunto apoyan la hipótesis de que la administración de cocaína puede tener efectos a largo plazo en la respuesta conductual materna. Sin embargo, como los propios investigadores han señalado, los efectos a largo plazo fueron divergentes (2). Mientras el tratamiento crónico durante la gestación mostró efectos disruptivos en el comportamiento maternal (5, 81), la administración pregestacional redujo la latencia de acarreo e incrementó el número de lamidos (1, 2). Según Febo (2007), este efecto es reminiscente a aquel visto en el comportamiento sexual de ratas macho como consecuencia de la sensibilización a anfetamina (96) y ha postulado que la exposición a cocaína previa a la gestación podría estar incrementando el comportamiento maternal mediante el mecanismo de sensibilización cruzada, reflejando un incremento en el valor de incentivo de las crías.

1.4 Neurobiología de la dependencia a cocaína

La dependencia a drogas es una compleja enfermedad cerebral que resulta de la repetida exposición a drogas de abuso, modulada por factores genéticos, epigenéticos, ambientales y por aquellos vinculados a la experiencia (97). En humanos, el desarrollo de la dependencia a cocaína suele comenzar con un uso recreacional, que con el tiempo se configura en un desorden compulsivo de búsqueda y consumo de la sustancia. El estrés, las claves ambientales y los estímulos condicionados han mostrado jugar un papel relevante en las recaídas, sumado a alteraciones en procesos neurobiológicos, aunque su comprensión es todavía escasa. Si bien se creyó que la dependencia a drogas involucraba

principalmente procesos de recompensa mediados por regiones límbicas, hace unos años diversos estudios, en particular de neuroimagen, han implicado al circuito mesocorticolímbico (98-100). En efecto, se ha sugerido que las vías mesolímbica y mesocortical operan en paralelo y que poseen diferentes roles en el desencadenamiento de los trastornos adictivos (101).

Las drogas de abuso exhiben un amplio rango de estructuras químicas y modos de acción, mas hay un principio que las unifica, y es que desencadenan un incremento significativo en los niveles extracelulares de DA en el circuito mesocorticolímbico (102).

En el caso de la cocaína, su principal mecanismo de acción en el cerebro es a través del bloqueo de la recaptación de las monoaminas DA (103, 104), noradrenalina (NA) (103) y serotonina (5-HT) (105). Además, la cocaína es conocida por tener potentes propiedades anestésicas locales, medidas por su bloqueo de los canales de sodio (106).

Aunque la inhibición de la recaptación de DA media las propiedades reforzadoras de la droga (97), el incremento de DA en el sistema mesocorticolímbico ha sido per se insuficiente en la explicación de los mecanismos que subyacen a las patologías adictivas. Por ello, las investigaciones han cambiado su foco de atención, priorizando el estudio de los procesos neurobiológicos que median el establecimiento de la dependencia ocasionada por la exposición crónica a la cocaína, en contraposición a los efectos producidos por la intoxicación aguda.

Con el paso del tiempo han cobrado fuerza paradigmas que sostienen que los incrementos repetidos en la liberación de DA desencadenan complejas y persistentes adaptaciones en el cerebro, ocasionando un desbalance DAérgico en los circuitos que ésta integra y modula, alterando la estructura y función de diferentes regiones del cerebro que median el desarrollo del trastorno de dependencia y afectando diversos procesos psicológicos que caracterizan su sintomatología. Robinson y Berridge propusieron que una de estas alteraciones es la sensibilización o hipersensibilidad a los efectos motivacionales de incentivo de las drogas y sus estímulos asociados (107). Con base en que los circuitos neurales codifican información a través de cambios plásticos en la eficacia de la transmisión sináptica excitatoria, en su "teoría de la saliencia del incentivo", plantean que la exposición repetida a la cocaína puede generar adaptaciones neuronales en los circuitos encargados de regular la atribución de la saliencia a los estímulos o incentivos (107). El resultado de estas neuroadaptaciones implicaría una asignación mayor y desmedida de valores de incentivo tanto a la droga como a las claves asociadas a la misma, estableciendo

un estado de hipersensibilidad del cerebro a sus efectos. Además, ha sido sugerido que la persistencia de la sensibilización puede perdurar por años, incluso habiendo transcurrido largos períodos de abstinencia (107), determinando la naturaleza crónica de la dependencia a cocaína.

1.4.1 Mecanismos neurobiológicos implicados en el desarrollo de la sensibilización a cocaína y sus efectos en el comportamiento maternal

Existen modelos animales que han sido utilizados para explorar las consecuencias causadas por el incremento progresivo de la frecuencia en el uso de la cocaína, suceso característico del desarrollo de la dependencia. Uno de ellos es el modelo de sensibilización comportamental, en referencia a la tesis de Berridge y Robinson (107). Se ha documentado que la exposición repetida a cocaína puede inducir sensibilización comportamental, volviendo a los roedores hipersensibles a los efectos de la sustancia y a sus estímulos asociados. Una de las medidas utilizadas para evaluar la sensibilidad a la sustancia es la actividad locomotora. La estimulación inicial de la actividad locomotora inducida por una droga es incrementada luego de la administración repetida (108). Así, se ha postulado que aquellos organismos que experimentan una mayor actividad locomotora denotan mayor sensibilidad a los efectos de la droga en comparación a aquellos que exhiben un incremento menor (108). No obstante, es usual que este indicador sea malinterpretado. La sensibilización de la actividad locomotora no equivale a la sensibilización comportamental, sino que constituye uno de los efectos psicomotores generados por las drogas que inducen sensibilización. El punto crítico en la teoría de la saliencia del incentivo no se halla en la sensibilización locomotora; radica en el aumento de la “saliencia” o valor del incentivo asociado a la sensibilización del sistema DAérgico. En la medida que se propone que la activación locomotora refleja el involucramiento del sistema mesolímbico DAérgico, la sensibilización locomotora es a menudo utilizada como evidencia indirecta de la hipersensibilidad de este circuito, reflejando la ocurrencia de neuroadaptaciones como consecuencia de la perturbación repetida, que contribuirían al desarrollo de la dependencia.

La inducción de la sensibilización comportamental producida por la cocaína está mediada, al menos en parte, por el aumento en los niveles extracelulares de DA a través del bloqueo del transportador de DA (DAT). Éste aparenta ser el factor causal primario de

las posteriores adaptaciones duraderas en el sistema mesocorticolímbico, particularmente en el ATV, NAc, CPF y sus conexiones aferentes y eferentes (109) (Figura 2). En esta línea y considerando que este sistema ha sido fuertemente implicado en la expresión de la respuesta maternal (56), se ha hipotetizado que el efecto de la droga en la respuesta maternal podría ser una consecuencia de las alteraciones producidas en el sistema DAérgico. Pese a que las investigaciones dirigidas a identificar los sustratos neurales que subyacen a las alteraciones en el comportamiento maternal inducidas por las drogas de abuso aún son escasas, existen numerosos reportes que han documentado, con modelos de inactivación eléctrica y farmacológica, que interferencias de la actividad DAérgica modifican la conducta materna (62, 110-112). Se ha estipulado que a través de mecanismos de aprendizaje maladaptativos, la cocaína es capaz de cooptar los circuitos del sistema mesocorticolímbico, implicados en el control de comportamientos motivados frente a reforzadores naturales (como las crías para la madre), e inducir formas aberrantes de plasticidad sináptica a largo plazo y distorsionar la conducta materna de hembras expuestas a la sustancia (113).

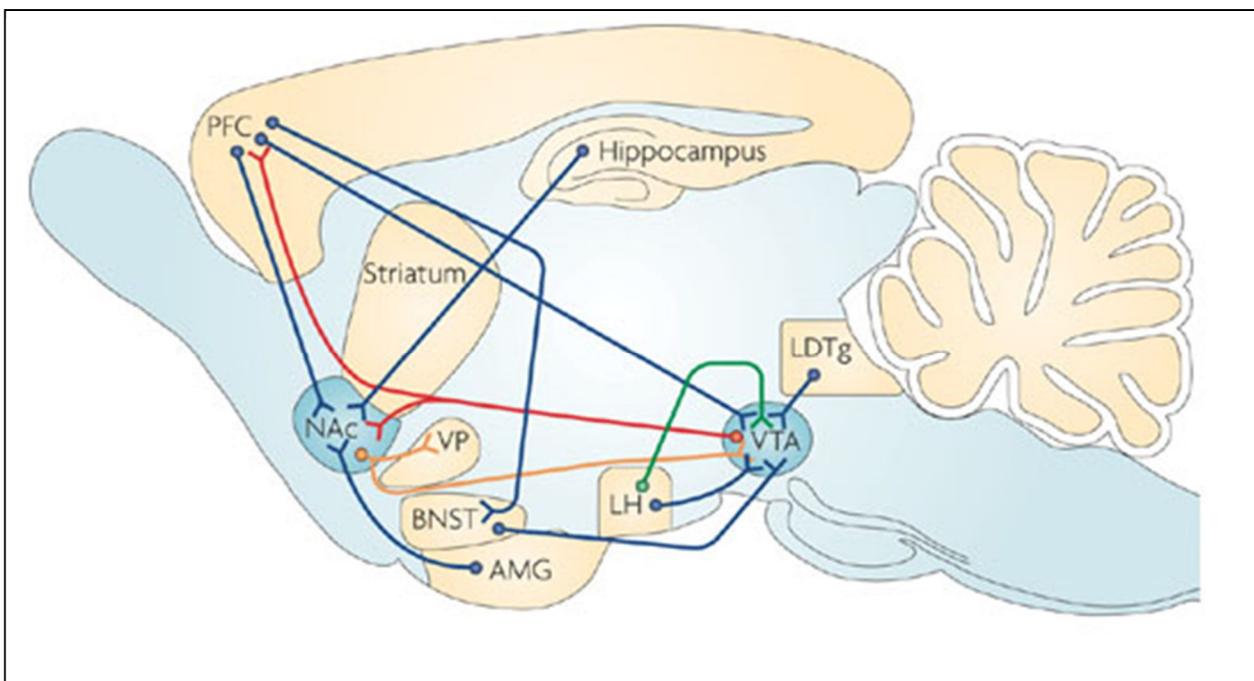


Figura 2. Esquema de corte sagital del cerebro de la rata describiendo las principales regiones implicadas en el circuito de recompensa donde actúan las drogas de abuso. El área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés) envía proyecciones dopaminérgicas (flechas rojas) al núcleo accumbens (NAc) y a la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés). El NAc envía proyecciones GABAérgicas (flechas naranjas) al VTA y al pálido ventral (VP, por sus siglas en inglés), mientras que la PFC envía proyecciones glutamatérgicas (flechas azules) al VTA y NAc. Tomado de Kauer y Malenka (2007).

1.5 Neurodesarrollo adolescente: un período sensible

La evaluación de los efectos de los psicoestimulantes en el sistema nervioso se ha llevado a cabo utilizando mayormente roedores en la etapa de vida adulta. Resulta llamativa la escasa atención que se le ha prestado al estudio de las consecuencias del uso de drogas durante la adolescencia, considerando que el inicio de este fenómeno ocurre con frecuencia durante este período. El interés en los posibles efectos diferenciales de las drogas de abuso en animales adolescentes -en comparación con adultos- es reciente y el foco primario de estos estudios ha sido el alcohol y la nicotina (114, 115).

1.5.1 El período adolescente

La adolescencia es el período entre la niñez y la adultez, marcado por cambios en el desarrollo psicológico, físico y social. Si bien se solapa e interacciona con el período de desarrollo puberal, en el cual el organismo alcanza la madurez sexual que garantizará el éxito reproductivo, desde una perspectiva evolutiva, el neurodesarrollo durante la adolescencia constituye un proceso trascendental para la maduración de las habilidades sociales y cognitivas requeridas para alcanzar la autonomía suficiente que permita la independencia del núcleo familiar (116, 117).

A pesar de que las transiciones que se dan en esta etapa son necesarias para que el organismo alcance la madurez, la adolescencia puede ser conceptualizada como una fase de vulnerabilidad. Por ejemplo, entre los cambios comportamentales se destaca el incremento en la toma de decisiones de riesgo que pueden poner en peligro la vida (118). En ocasiones la adolescencia ha sido caracterizada como una fase única del desarrollo humano. No obstante, todas las especies de mamíferos experimentan una transición similar. Los adolescentes humanos y sus contrapartes en otras especies de mamíferos comparten numerosas similitudes en relación a cambios hormonales, características comportamentales y transformaciones en la estructura y función cerebral (117, 119). En relación a esto último, existe un alto grado de consenso en la relevancia de los procesos de neurodesarrollo que se dan durante la adolescencia; la caracterización más detallada de los mismos ha expandido en los últimos años nuestra comprensión de esta etapa de la vida (119).

En roedores se pueden encontrar distintas definiciones sobre cuál es el período de vida que comprende a la adolescencia. La más aceptada y referenciada es la de Linda Spear,

según la cual la adolescencia se extiende desde P28 hasta P42, aunque esto no implique que tanto animales más jóvenes o mayores no puedan ser considerados adolescentes (117) (Figura 3). En tanto, el comienzo de la adolescencia es acompañado por un período prepuberal, que culmina con la aparición de la primera ovulación, indicando el establecimiento del ciclo hormonal necesario para la reproducción de la hembra. Externamente, el desarrollo puberal de la hembra es indicado por la apertura vaginal, la cual usualmente ocurre en el día posterior al primer pico preovulatorio de gonadotropina, y que se ha visto en ratas entre los días 32 y 40 (120).

PUBERTAD Y ADOLESCENCIA EN RATAS

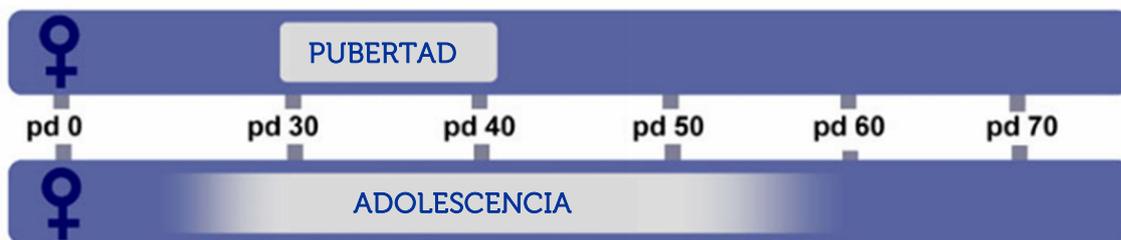


Figura 3. Período puberal y adolescente estimado para ratas hembras. Tomado y modificado de Schneider (2013).

1.5.2 El cerebro adolescente en desarrollo

La remodelación cerebral durante la adolescencia está marcada por una mezcla de cambios progresivos y regresivos que permiten refinar la conectividad, incrementar la velocidad del flujo de información entre distintas regiones, fortalecer las redes neuronales y mejorar la eficacia cerebral (119). Estudios en humanos y roedores han puesto de manifiesto que el volumen de materia gris cambia siguiendo un patrón en forma de U-invertida durante la adolescencia (117, 121, 122). (121). Tal sobreproducción de conexiones es posteriormente eliminada mediante la poda sináptica o *pruning* (123) (Figura 4). Se ha especulado con que este fenómeno es un ejemplo de plasticidad en el desarrollo por el cual el cerebro es recableado con el objetivo de acercarse a una topografía “adulta”, que se acoplará correctamente a las necesidades ambientales (117). El proceso de poda es acompañado por cambios progresivos, como la mielinización de las proyecciones que se han conservado. El recubrimiento selectivo de axones con vainas de

mielina incrementa la velocidad de la transmisión de los impulsos eléctricos, apoyando la idea de que en este proceso se están esculpiendo redes que incrementarían la eficacia en el procesamiento de la información. Aunque la mielinización comienza a darse en regiones sensoriales y motoras en etapas tempranas de la vida, se acentúa notablemente durante la adolescencia (124, 125) (Figura 4).

Los procesos de reorganización durante la adolescencia se dan especialmente en regiones de la CPF y estructuras límbicas (117, 126), largamente implicadas en la expresión del comportamiento maternal, agresión maternal y de la ansiedad. Pese a que los procesos del neurodesarrollo adolescente han sido abordados haciendo foco en el desarrollo del sistema DAérgico, otros sistemas, como el serotoninérgico, también han sido contemplados.

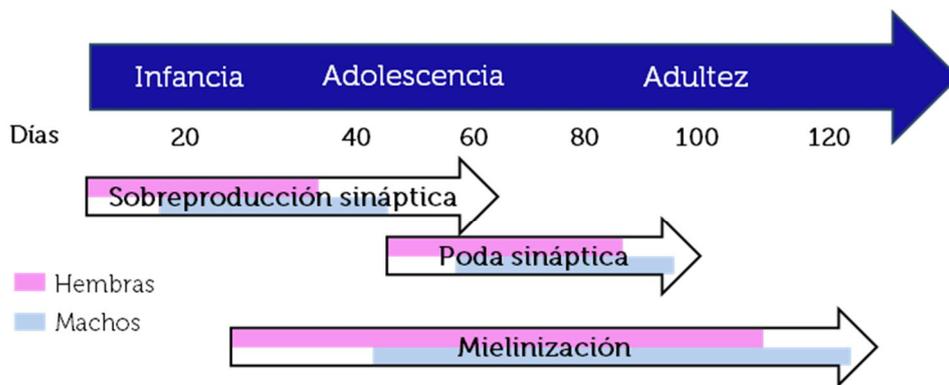


Figura 4. Línea de tiempo de los procesos de desarrollo en roedores. Las barras rosas representan la línea de tiempo para hembras, mientras que la azul la de los machos. Tomado y modificado de Brenhouse y Andersen (2011).

1.5.3 Remodelación de la neurotransmisión DAérgica durante la adolescencia

El sistema DAérgico exhibe cambios significativos durante la adolescencia (125). La mayoría de los hallazgos en roedores sugieren que las concentraciones de DA en la corteza y estriado, y la innervación DAérgica cortical continúan incrementándose hasta aproximadamente el día 60, donde alcanzan la estabilidad de la etapa adulta (127-129). También hay reportes que indican la aparición de un pico en la síntesis de DA durante la adolescencia (130), el cual explicaría las características comportamentales que se observan en este período (117, 127).

En lo que refiere a la ontogenia de los receptores DAérgicos, en el caudado y putamen los receptores D1 y D2 siguen una trayectoria de desarrollo similar, mostrando un pico de densidad entre P28 y P42, proseguido de un descenso que marcará los niveles estables de la adultez (131-133). En relación a la expresión de receptores en el NAc la evidencia es confusa. Los resultados dan cuenta de un incremento sostenido en la densidad de receptores D1 hasta la adultez (134), de la expresión de un pico en la periadolescencia (132) y de un pico en la periadolescencia acompañado por una leve caída en P60 y un posterior pico en P80 (133). Por su parte, los receptores D2 parecen exhibir un pequeño pico en su concentración en el NAc durante la adolescencia, que decrece posteriormente y se mantiene durante la adultez (131, 133). En tanto, en la CPF también existen inconsistencias en los resultados. Aunque hay reportes que sugieren que la concentración de receptores D1 aumenta de forma sostenida desde el nacimiento hasta alcanzar su máximo en la adultez (135), también hay evidencia de que la CPF podría exhibir un pico en la expresión de receptores D1 y D2 durante la adolescencia (136). Sin embargo, resulta crucial mencionar que existen diferencias de sexo claras en la ontogenia del sistema DAérgico, y que los reportes que han evaluado este punto aún son insuficientes. Susan Andersen y sus colaboradores mostraron que solo los machos exhiben cambios en la densidad de receptores D1 y D2 en el estriado entre P25 y P100, aunque machos y hembras muestran niveles similares en la adultez (131). Esta diferencia también se vio en la expresión de receptores D2 en el NAc. La única similitud parece ser que tanto machos como hembras poseen un pico en la expresión de receptores D1 en el NAc durante la adolescencia (137).

En relación a la ontogenia de los DATs, sitio de acción de la cocaína, la evidencia sugiere que aquellas regiones ricas en DATs experimentan distintas trayectorias de desarrollo. Se ha visto que el desarrollo de los DATs ocurre mayoritariamente en el período prenatal, particularmente en aquellas regiones que contienen neuronas DAérgicas (138). Por otro lado, algunas áreas muestran un incremento lineal constante en la concentración de DATs, como el caso del NAc, donde estos transportadores exhiben un incremento desde el momento del parto hasta alcanzar un pico de estabilidad en P35, con pequeños incrementos posteriores durante la etapa adulta (138, 139).

1.5.4 Remodelación de la neurotransmisión serotoninérgica durante la adolescencia

La evidencia de los cambios en la neurotransmisión serotoninérgica, pese a que aún es limitada, sugiere que este sistema también exhibe una dramática reorganización durante la etapa adolescente.

La remodelación de la innervación serotoninérgica se ejemplifica en el caso de las proyecciones hacia el cerebro anterior de la rata, las cuales muestran cambios considerables en forma de U. Se ha observado que las sinapsis serotoninérgicas en esta región experimentan un incremento en su número que alcanza los niveles adultos en P14, sufriendo un posterior y marcado declive al momento del destete en P21, antes de volver a alcanzar los valores adultos, que ya se ven en P90 (140). No obstante, pese a que se podría especular con niveles relativamente bajos de sinapsis en las innervaciones serotoninérgicas, este parámetro no fue evaluado entre el destete y la adultez (140). En la misma línea, otro estudio reportó que el volumen de 5-HT en la corteza cingulada anterior de ratas adolescentes (P30-40) es aproximadamente 4 veces menor en relación al de ratas más jóvenes (P10-15) o adultas (P60-80), fenómeno no observado en el estriado (141). En tanto, y de interés para nuestro estudio, también se han observado cambios durante el desarrollo en el nivel de 5-HT en el APOM, con mayores niveles en ratas juveniles (P20-27) en comparación con adultas (P>60) (142).

La reorganización de los receptores serotoninérgicos también es pronunciada. Por ejemplo, los receptores 5-HT_{2A} de la corteza exhiben un pico en su expresión antes de la adolescencia, decayendo posteriormente y de modo progresivo hasta alcanzar los niveles característicos de la adultez (143). En contraste, los transportadores de 5-HT incrementan en número de forma sostenida desde los primeros días postparto hasta la adultez en el NAc de la rata (139).

1.5.5 La exposición a cocaína durante la adolescencia.

La evidencia sugiere que la adolescencia constituye un momento trascendental para el desarrollo de las redes neurales, durante el cual una sustancia como la cocaína podría convertirse en un factor crítico en la modulación del desarrollo cerebral. La señalización aberrante desencadenada por la droga en la etapa adolescente sería capaz de afectar

procesos del neurodesarrollo que moldean la conectividad del circuito mesocorticolímbico, alterando el subsecuente comportamiento durante el período adulto.

Más aún, se ha especulado con que el organismo inmaduro sería susceptible de incorporar los cambios que las drogas inducen en forma de modificaciones permanentes de la estructura y función cerebral, en una posibilidad que difiere de lo que parece suceder en los organismos maduros, que reaccionan a los agentes perturbadores mediante mecanismos de compensación (144, 145). De esta manera, se ha propuesto que el efecto a largo plazo de una sustancia como la cocaína dependerá de la interacción entre las acciones farmacológicas propias de la sustancia y el estado de maduración de las estructuras y funciones cerebrales que ésta afecta. Tomando en cuenta que ha sido durante la última década que se ha arrojado mayor luz sobre las características de los procesos de desarrollo que sufre el cerebro durante la adolescencia, aún nos encontramos lejos de comprender la peculiaridad de las alteraciones que podrían originarse como corolario del uso de drogas durante este período. En lo que compete al interés principal de nuestro estudio, las consecuencias de la exposición crónica a cocaína durante la adolescencia en el comportamiento maternal de hembras adultas es un campo que aún permanece inexplorado.

1.6 Imagen funcional cerebral

Las técnicas de imagenología funcional cerebral permiten acceder a información tridimensional acerca de la perfusión y el estado metabólico del tejido nervioso. Esta información constituye un valioso insumo para complementar la información anatómica que brindan las técnicas de imagenología estructurales como la tomografía computarizada (CT, del inglés *computed tomography*) y la resonancia magnética. Sin embargo, la imagen funcional posee valor clínico o preclínico en sí misma, dado que las alteraciones funcionales usualmente preceden a los cambios estructurales (146). Además, dichas técnicas son útiles en investigación, ya que proveen un método de evaluación *in vivo* no invasivo de la funcionalidad cerebral en el ser humano, con una alta resolución anatómica (147).

1.6.1 Imagen funcional cerebral: PET

La tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*) es una herramienta de diagnóstico no invasiva que provee imágenes tomográficas de parámetros cuantitativos describiendo varios aspectos hemodinámicos del cerebro. Es esencialmente una técnica de imagen molecular, que permite la visualización de los cambios en la organización molecular de los sistemas biológicos, debido a que los radiotrazadores utilizados son moléculas biológicas indicativas de un proceso bioquímico (148). El PET ha sido utilizado en el estudio de varios desórdenes del SNC. El desarrollo de diferentes radiofármacos marcados con isótopos emisores de positrones como carbono-11 (^{11}C), flúor-18 (^{18}F), oxígeno-15 (^{15}O) y nitrógeno-13 (^{13}N) ha permitido evaluar el flujo sanguíneo cerebral y la tasa metabólica cerebral regional (TMCr), así como sistemas de neurotransmisión (148). Uno de los radiofármacos de mayor uso, tanto con propósitos clínicos como en investigación es la fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG), un análogo de la glucosa que se marca con flúor-18. El ^{18}F es un radionucleido emisor de positrones producido en un ciclotrón que presenta un período de semidesintegración de 110 minutos. La [^{18}F]-FDG provee imágenes de alta resolución del metabolismo cerebral. Permite la evaluación de la TMCr y tiene características físicas que lo hacen relativamente fácil de producir y utilizar (149) (Figura 5).

1.6.2 Micro PET/CT.

El desarrollo de componentes cada vez más pequeños ha permitido que el PET y la CT hoy se encuentren disponibles para su uso en pequeños animales. Similares radiotrazadores pueden ser utilizados en la imagenología preclínica *in vivo* para pequeños animales (150, 151). Así, la administración de radiotrazadores permite obtener imágenes cuantitativas y funcionales de la salud fisiológica, proporcionando el medio para el monitoreo no invasivo de procesos biológicos, con el potencial de officar de puente hacia la esfera clínica y de contribuir al desarrollo de la medicina humana (151) (Figura 5). En la actualidad existen equipos híbridos como PET/CT, que permiten la obtención de imágenes anatómicas y fisiológicas de alta resolución en pequeños animales y superar algunas limitaciones de la adquisición de imágenes por separado. La superposición de diferentes tipos de imágenes como la CT y el PET se conoce como co-registro y puede ser llevada a

cabo mediante la utilización de un software que alinea las imágenes obtenidas en ambos instrumentos.

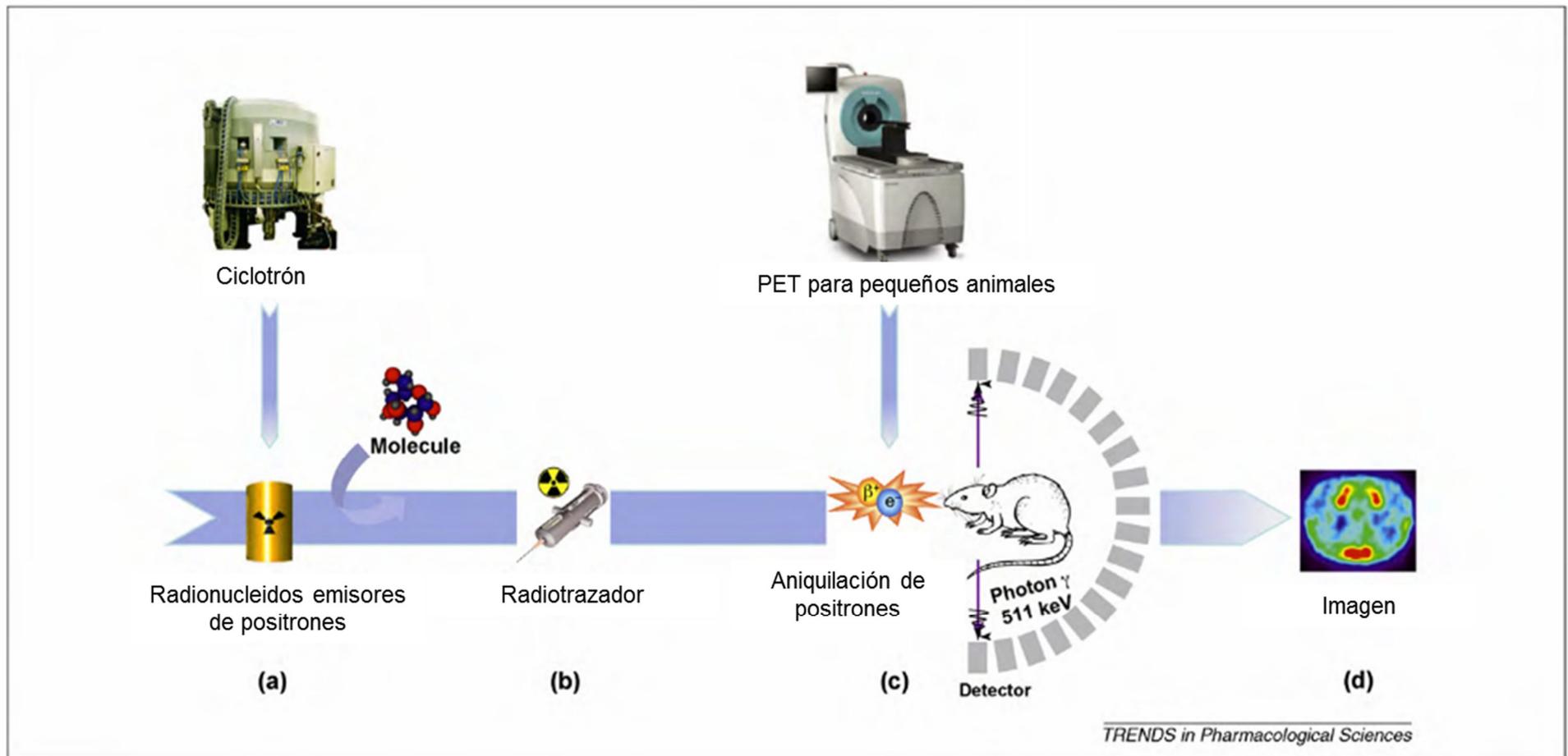


Figura 5. Representación esquemática de los principios de la técnica de micro-PET. (a) El ciclotrón, un acelerador de partículas, produce los radionucleidos emisores de positrones, como el flúor 18. (b) Este radionucleido se incorpora en moléculas, durante el proceso de radiosíntesis, dando lugar al radiotrazador, como el caso del [^{18}F]-FDG. (c) El escaneo PET se realiza luego de inyectar el radiotrazador por vía intravenosa y esperar el tiempo apropiado de biodistribución. El radiotrazador se acumula en el tejido a ser estudiado, y su radionucleido decae por emisión de un positrón. El positrón colisiona con un electrón, liberando de forma simultánea dos rayos gamma (fotones) con una energía de 511 keV en direcciones opuestas. Estos dos fotones son detectados por la cámara micro-PET. (d) A través del registro de un número significativamente estadístico de eventos radiactivos, algoritmos matemáticos reconstruyen la imagen tridimensional que muestra la distribución de las moléculas emisoras de positrones en el cerebro. Extraído de Lancelot y Zimmer (2010).

1.6.3 Neuroimagen funcional en la adicción a cocaína

El PET es una ventana al funcionamiento cerebral y en las últimas décadas ha provisto valiosa información acerca de los sustratos neurales que subyacen a los efectos crónicos y agudos del uso de cocaína. Con esta técnica se han detallado alteraciones significativas de la actividad funcional cerebral en consumidores de cocaína o derivados, principalmente en regiones corticolímbicas, como el estriado, la AMY, el hipocampo y áreas de la CPF (152-154). En lo que refiere a los intereses del presente trabajo, al día de la fecha no existen estudios preclínicos que hayan utilizado la técnica micro-PET en la evaluación de los efectos a largo plazo en la función cerebral ocasionados por la exposición crónica a cocaína durante la adolescencia.

1.7 Planteamiento del problema e hipótesis

El conjunto de los antecedentes muestra que la cocaína es una droga que actúa en el sistema DAérgico, aunque también sobre otros sistemas neurales, y que si bien su acción es capaz de desencadenar alteraciones neurobiológicas y afectar el comportamiento maternal, la agresión maternal y la ansiedad experimental, la caracterización de sus efectos a largo plazo es aún insuficiente.

Por otra parte, el importante desarrollo que experimenta el sistema mesocorticolímbico durante la adolescencia, en especial en circuitos que integran a regiones de la CPF, posiciona a este período como una ventana temporal particularmente sensible a los insultos del entorno. En este escenario, la exposición crónica a cocaína sería capaz de promover adaptaciones aberrantes en el cerebro adolescente, susceptibles de alterar su normal desarrollo, que no se observarían en la exposición durante la etapa adulta.

Basados en la evidencia descrita, y considerando que hasta el momento no existen estudios que hayan evaluado los efectos a largo plazo inducidos por la exposición crónica a cocaína durante la adolescencia en los distintos componentes del comportamiento maternal ni sobre la TMCr durante la etapa adulta, este trabajo de tesis plantea las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: La administración crónica de cocaína durante la adolescencia provoca una sensibilización comportamental de mayor magnitud que durante la etapa adulta y este

efecto se refleja en mayores alteraciones a largo plazo en su comportamiento maternal, agresión maternal y ansiedad experimental.

Hipótesis 2: Las hembras expuestas a un tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia exhiben alteraciones mayores de la TMCr durante su maternidad con respecto a las hembras tratadas cuando adultas, en áreas relacionadas al circuito maternal y a la adicción a drogas.

2 OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

2.1 Objetivos Generales

1. Comparar del efecto comportamental (estereotipias, actividad motora) del tratamiento crónico con cocaína en hembras tratadas durante la adolescencia y hembras tratadas en la fase adulta.
2. Evaluar el comportamiento maternal, agresión maternal y ansiedad experimental de hembras adultas expuestas al tratamiento crónico de cocaína durante su adolescencia en relación a los comportamientos de hembras tratadas durante la adultez.
3. Evaluar la TMCr en hembras adultas expuestas a la droga durante la adolescencia, en comparación con la TMCr de hembras tratadas durante la adultez.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar si la presencia de estereotipias ocasionadas por la administración crónica de cocaína es de mayor grado en hembras adolescentes que en adultas.
2. Determinar si los niveles de actividad locomotora ocasionados por el tratamiento con cocaína son mayores en hembras adolescentes en comparación con adultas.
3. Evaluar si los cambios en el comportamiento maternal generados por la exposición a cocaína son más acentuados en madres que recibieron la droga durante la adolescencia en comparación a aquellas que lo hicieron cuando adultas.
4. Comparar la agresión maternal de las hembras tratadas crónicamente con cocaína en la adolescencia con la exhibida por las tratadas durante la etapa adulta.

5. Determinar si existen diferencias en la ansiedad experimental de las madres tratadas con cocaína en la adolescencia en comparación a la de las tratadas cuando adultas.

6. Determinar si la alteración de la actividad metabólica de áreas relacionadas con la dependencia a drogas y la maternidad de ratas lactantes tratadas con cocaína en la adolescencia difiere de la de las adultas.

3 METODOLOGÍA

3.1 Animales

Se utilizaron ratas hembras (n=47) de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de aproximadamente 37 (adolescentes) y 90 (adultas) días de edad. Luego del parto las hembras permanecieron con ocho crías hasta la culminación de los experimentos. Las ratas se alojaron en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad invertido 12/12 h y temperatura controlada (22 ± 1 °C) en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias y tuvieron acceso continuo a agua y comida, excepto durante las sesiones experimentales. El protocolo experimental utilizado fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias.

3.1.1 Grupos experimentales

Considerando la influencia del ciclo ovárico en la actividad del sistema DAérgico (155) las hembras adolescentes comenzaron el tratamiento con vehículo o cocaína el día de la apertura vaginal (que generalmente coincide con la fase de proestro del ciclo estral (120)) y las hembras adultas en la fase de proestro de su ciclo estral, con el fin de homogeneizar las condiciones endócrinas dentro y entre los grupos. Se determinó el día de apertura vaginal de las hembras adolescentes de acuerdo a Caligioni (2009), y se siguió el ciclo estral de las hembras (adolescentes luego de la apertura vaginal y adultas) a través de frotis vaginales diarios (156).

3.1.2 Determinación del día de apertura vaginal

Diariamente desde el día 33 de vida, se verificó la apertura vaginal de las hembras adolescentes a través de inspección externa (Figura 6).

3.1.3 Determinación de la fase del ciclo estral

Se determinó la fase del ciclo estral en la cual se encontraban las hembras adultas y adolescentes (luego de la apertura vaginal) a través del análisis del tipo de células presentes y su abundancia en un exudado vaginal realizado con solución salina (Figura 7). Este protocolo se realizó una vez al día con el fin de minimizar el estrés y otros potenciales efectos de la manipulación.

3.2 Administración de cocaína (de acuerdo a Febo y Ferris (2007))

El clorhidrato de cocaína (Laboratorio Verardo y CÍA., Argentina) fue disuelto en solución salina 0,9% y su administración y la evaluación comportamental se llevaron a cabo en la fase de luz del ciclo luz:oscuridad (1300 a 1600 hs). A cada rata hembra se le dio una inyección diaria de cocaína (15 mg/kg) o solución salina 0,9% por vía intraperitoneal durante 10 días consecutivos. El tratamiento en hembras adolescentes comenzó el día en el cual se constató la apertura vaginal. La administración de cocaína o salina en hembras adultas comenzó durante la fase proestro del ciclo estral, en torno a P90.

3.3 Evaluación de estereotipias durante el tratamiento con cocaína (de acuerdo a Ellinwood y Balster (1974))

Treinta minutos previos a la evaluación de estereotipias y a la administración del fármaco o solución salina, los animales se colocaron en las cajas experimentales para que se adaptaran a las condiciones del cuarto de observación. Las cajas experimentales fueron de plástico transparente, de 32 x 42 x 19 cm. La respuesta comportamental a la cocaína fue evaluada utilizando una escala de calificación comportamental de 9 puntos desarrollada por Ellinwood y Balster (157). A cada animal le fue dada una calificación 5 minutos previo a la inyección y luego a los minutos 0, 5, 10, 15, 20 y 25 post-inyección, de acuerdo al siguiente procedimiento: en cada intervalo, cada animal fue observado durante 20 segundos, asignándosele la calificación correspondiente entre los valores de 1 y 9. La

calificación se describe en la tabla 1. En los casos en que se identificó más de un tipo de comportamiento durante el período de observación, la calificación se basó en aquel que fue predominante. La calificación comportamental fue realizada de forma diaria durante los 10 días de tratamiento. Los datos se presentan como las medianas obtenidas a partir de la sumatoria de las calificaciones obtenidas en los minutos 5, 10, 15, 20 y 25 post-inyección para cada individuo.

Tabla 1. Escala de calificación para evaluar los efectos psicomotores de estimulantes en ratas.

Score	Definición
1	Dormida Acostada, ojos cerrados.
2	Inactiva Acostada, ojos abiertos.
3	Actividades en el lugar Aseo normal.
4	Normal, alerta, activa. Moviéndose alrededor de la caja, olfateando y haciendo <i>rearing</i> .
5	Hiperactiva Movimientos de correteo, caracterizados por cambios rápidos en la posición.
6	Patrones lentos Exploración repetitiva de la caja a niveles normales de actividad
7	Patrones rápidos Exploración repetitiva de la caja con hiperactividad.
8	Restringido Permaneciendo en el mismo lugar de la caja, con rápidos y repetitivos movimientos de la cabeza.
9	Reacciones discinéticas Saltando, convulsiones, manteniendo posturas anormales, movimientos disquinéticos.

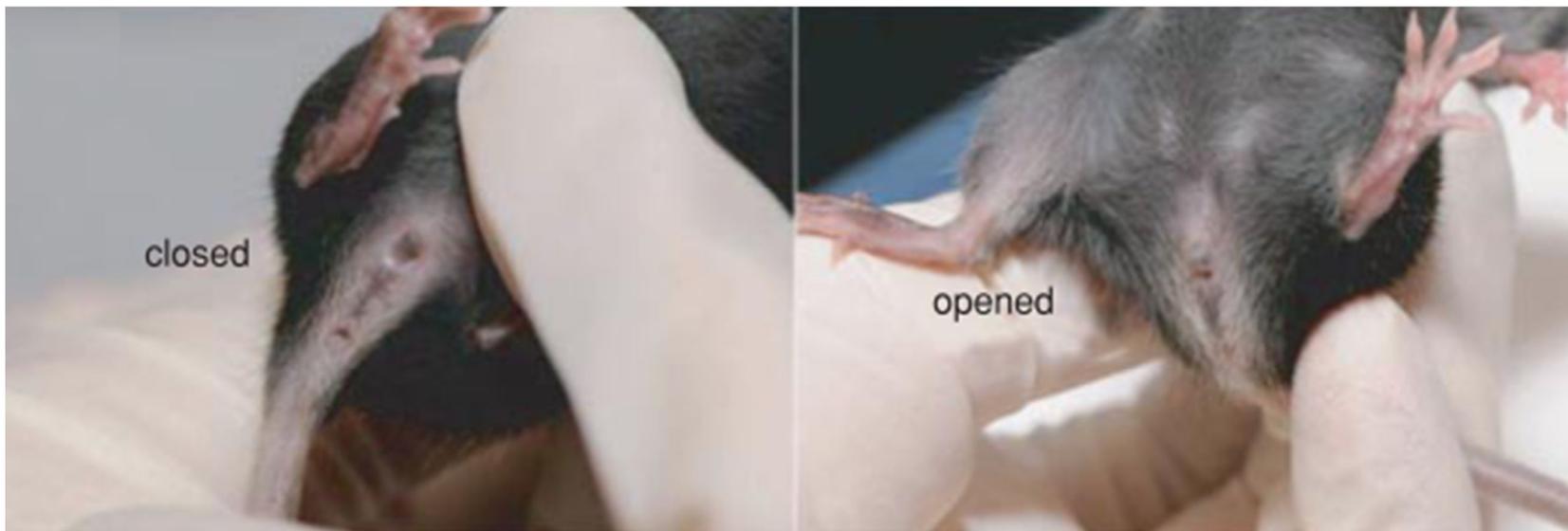


Figura 6. Apertura vaginal en ratones. Extraído de Caligioni (2009).

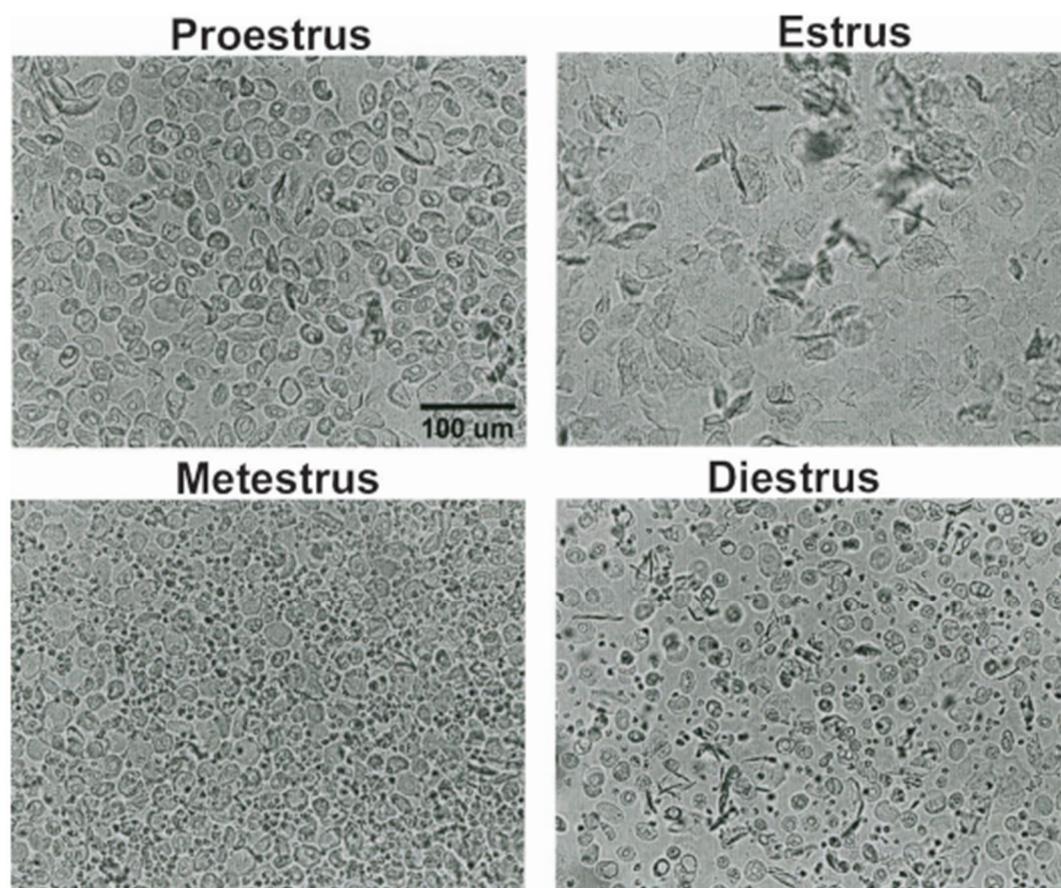


Figura 7. Citología vaginal en las distintas fases del ciclo estral en la rata. Extraído de Hubscher et al. (2005).

3.4 Prueba de actividad locomotora (de acuerdo a Zuluaga et al. (2005))

En los días 1 y 10 de tratamiento con cocaína o salina, inmediatamente después de la evaluación comportamental de estereotipias y habiendo transcurrido 30 minutos luego de la inyección, se realizó una prueba de actividad locomotora a las hembras para evaluar los posibles efectos locomotores ocasionados por la administración de cocaína. Esta prueba se realizó en una caja de 53 x 36 x 25 cm, que tiene su piso dividido en cuadrantes de 10 cm. Se registró el número de cruces, posturas erguidas y defecaciones exhibidas en 5 minutos.

3.5 Apareamiento y gestación

En el primer proestro tardío detectado entre los días 3 y 8 posteriores al tratamiento, las hembras se alojaron con un macho sexualmente activo. Se evaluó el valor de incentivo del macho para las hembras en la prueba de preferencia sexual, así como su comportamiento durante la interacción sexual en una prueba de comportamiento sexual (Tesis de grado en Ciencias Biológicas de la Lic. Luna Machado). La cópula fue verificada por la presencia de un tapón de esperma en la vagina. Las hembras permanecieron inalteradas con libre acceso a comida y agua durante la gestación y hasta el día 3 postparto, cuando comenzaron las evaluaciones comportamentales y el posterior estudio PET.

3.6 Evaluación de comportamiento maternal, agresión maternal y ansiedad experimental

Las pruebas comportamentales se realizaron en los días 3 o 4 postparto, durante la fase de luz del ciclo luz:oscuridad (1300 a 1600 hs).

3.6.1 Prueba de comportamiento maternal (de acuerdo a Agrati et al. (2008))

Se comparó el comportamiento maternal de hembras tratadas con cocaína (ADUCOCAÍNA, n=9) y con salina (ADUSALINA, n=8) durante la etapa adulta y de hembras tratadas con cocaína (ADOCOCAÍNA, n=10) y salina (ADOSALINA, n=10) durante la adolescencia. Previo al comienzo de la prueba, tanto las crías como la madre fueron retiradas de la caja y colocadas en dos cajas separadas. Transcurridos 15 minutos y al inicio

de la evaluación, la hembra fue reintroducida en la caja y las crías fueron colocadas de forma dispersa en el extremo opuesto al nido.

Se registró durante 30 minutos el número de:

- *Acarreos*: consiste en el transporte de las crías que realiza la madre de un sitio a otro, usualmente cargando crías desplazadas de nuevo hacia el nido.
- *Mouthing*: rearreglo de las crías, generalmente cerca o dentro del nido. La madre toma a la cría con la boca pero no la traslada como en el comportamiento de acarreo.
- *Construcción del nido*: involucra el traslado del material que se usará para el nido por parte de la hembra, ya sea utilizando la boca o empujándolo con las patas o el hocico.
- *Lamido de las crías*: puede ser dividido en dos categorías: lamido de la región anogenital de la cría y lamido del resto del cuerpo.

También se registró el tiempo en que las hembras permanecían en:

- *Hover over*: comprende el posicionamiento de la hembra sobre varias o todas las crías en el nido. En esta postura, la hembra suele encontrarse activa, pudiendo estar lamiendo a las crías, moviendo material hacia el nido o acicalándose. El comportamiento de *hovering over* permite a las crías la posibilidad de acceder a los pezones de la madre.

Postura de amamantamiento: se da cuando la madre se coloca sobre las crías, exponiendo su región mamaria y proveyendo leche a las crías. Es una postura inactiva o de reposo, típicamente inducida por la estimulación sensorial del área ventral de la madre por parte de las crías. Las posturas de amamantamiento son la quifosis alta, la baja y la postura supina.

A su vez, se registró el tiempo que la hembra permaneció en contacto con las crías (que incluyó *hovering over*), del intervalo entre cada acarreo, así como la latencia al primer acarreo, a la reunión de toda la camada en el nido, al primer *hovering over* y a la postura de amamantamiento. A aquellos animales que no mostraron ningún acarreo o que no alcanzaron a reunir a toda la camada en el curso de la prueba, les fue asignado un tiempo de latencia o de intervalo de 1800 segundos (30 minutos).

Finalmente, se registró el número de comportamientos exploratorios (*rearings* y olfateos al ambiente) y auto-acicalamientos. Además, se utilizó la suma de estos dos comportamientos con el objetivo de determinar la interferencia de comportamientos atípicos durante la secuenciación del comportamiento de acarreo.

3.6.2 Agresión maternal: prueba de intruso en caja nido (de acuerdo a Ferreira et al. (2002))

Se comparó la agresión maternal de hembras tratadas con cocaína (ADUCOCAÍNA, n=9) y con salina (ADUSALINA, n=8) durante la etapa adulta y de hembras tratadas con cocaína (ADOCOCAÍNA, n=9) y salina (ADOSALINA, n=9) durante la adolescencia. Habiéndose finalizado la prueba de comportamiento maternal, se introdujo un macho intruso adulto en la esquina opuesta al nido de la caja materna y se registraron durante 10 minutos el número de respuestas agresivas de la hembra y de posturas de sumisión del macho:

- Ataques: la hembra se lanza sobre el macho con un movimiento rápido, directamente hacia el cuello o la región dorsal.
- Posturas de ataque: la hembra se orienta hacia el macho en posición de ataque.
- Mordeduras: la hembra acerca su hocico al cuerpo del macho y éste en general emite vocalizaciones.
- Posturas laterales: la hembra se orienta hacia el macho con la parte lateral de su cuerpo y lo empuja.
- Patadas: la hembra golpea al macho con las patas traseras.
- Boxeos: ambas ratas se enfrentan paradas sobre las patas traseras y la hembra golpea al macho con las patas delanteras.
- Posturas de sumisión del macho: el macho se sienta sobre sus patas traseras y levanta sus delanteras permaneciendo inmóvil frente a los comportamientos agresivos de la hembra.

Adicionalmente, se midió la latencia a la primera respuesta agresiva de la madre y a la primera postura de sumisión del macho, así como la duración total de las posturas de sumisión.

3.6.3 Prueba de ansiedad experimental: laberinto elevado en cruz (de acuerdo a Pereira et al. (2005))

Se comparó la ansiedad experimental de hembras lactantes tratadas con cocaína o salina durante la etapa adulta (ADUCOCAÍNA, n=8; ADUSALINA, n=8) o durante la adolescencia (ADOCOCAÍNA, n=9; ADOSALINA, n=9). El modelo consiste en una estructura de madera en forma de cruz, elevada a 50 cm. del suelo, con dos brazos abiertos opuestos (10x40 cm) y perpendiculares a dos brazos cerrados también opuestos (10x40x40 cm). Los brazos están separados por un área central de 10x10 cm (Figura 8). Habiéndose finalizado la prueba de agresión maternal y al comienzo de la prueba en el laberinto elevado en cruz, cada animal se colocó en el área central, orientado hacia el brazo abierto opuesto a la posición del experimentador y se registró, durante 5 minutos, el número de entradas y el tiempo de permanencia del animal en los brazos abiertos (BA), el número de entradas a los brazos cerrados (BC), cruces totales, entradas totales, acicalamientos, posturas erguidas, *head dipping* (cuando el animal explora fuera del margen del brazo abierto y en dirección al suelo) y defecaciones. Los datos se expresan como el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($100 \times \text{tiempo total de permanencia en los brazos abiertos} / \text{tiempo total}$).



Figura 8. Laberinto elevado en cruz.

3.7 Adquisición, procesamiento y análisis de imágenes obtenidas en micro-PET

Entre los días 7 a 9 postparto, 30 minutos post-inyección de [¹⁸F]-FDG, las hembras fueron anestesiadas con isoflurano 4% en flujo de oxígeno 2.5L/min y posicionadas en la cámara trimodal para pequeños animales PET/SPECT/CT (Triumph™, TriFoil Imaging) con que cuenta el Área de I+D Biomédico del CUDIM (Figura 9). La anestesia fue mantenida a 2-2.5% de isoflurano durante el escaneo PET.

Las dosis administradas de [¹⁸F]-FDG fueron de 38.9±5.4 MBq, inyectados por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola. Se adquirieron imágenes estáticas durante 60 minutos a partir de los 30 minutos post-inyección (LabPET).

En todos los casos los estudios se complementaron con la adquisición inmediata de imágenes de tomografía computada (X-O MicroCT) en el mismo equipo para fusión de imágenes, que permite disponer de *reperes* anatómicos (estructuras que pueden ser localizadas y descritas mediante inspección visual) para la localización precisa de los cambios funcionales y su cuantificación. El protocolo experimental utilizado fue aprobado por CEUA del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Para el procesamiento de imágenes se utilizó el procedimiento iterativo MLEM (*Maximum Likelihood Expectation Maximization*) seleccionando 30 iteraciones. Para el procesamiento y cuantificación de las imágenes obtenidas se utilizó el programa PMOD (*PMOD Technologies, Zúrich*), así como plantillas patrón de MRI y el Atlas Paxinos de cerebro de rata (158) como referencias anatómicas.

La localización anatómica de las áreas de mayor y menor actividad metabólica se realizó a través del co-registro de cada imagen PET obtenida con su correspondiente estudio de CT. Los resultados del promedio de captación del radiofármaco en cada región de interés cerebral seleccionada volumétricamente ($VOI_{\text{región de interés}}$) fueron expresados a través de su normalización con respecto al valor respectivo medio de captación de todo el cerebro ($VOI_{\text{cerebro total}}$), técnica de normalización llamada “Cociente de Normalización” (CN).

$$CN = \frac{\text{Actividad Promedio KBq/cc } (VOI_{\text{región de interés}})}{\text{Actividad Promedio KBq/cc } (VOI_{\text{cerebro total}})}$$



Figura 9. Cámara trimodal para pequeños animales PET/SPECT/CT (Triumph™, TriFoil Imaging).

El diseño experimental se describe en la figura 10.

3.8 Análisis estadístico

3.8.1 Pruebas comportamentales

Debido a que los datos comportamentales no presentaron una distribución normal (test de Kolmogórov-Smirnov) las comparaciones post hoc entre los grupos se realizaron mediante pruebas no paramétricas (159).

Los datos comportamentales se expresan como medianas \pm RSIQ y se analizaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney en el caso de comparaciones entre grupos independientes o con el test de rangos de Wilcoxon en el caso de comparaciones entre grupos dependientes (159).

3.8.2 Análisis estadístico de imágenes obtenidas por micro-PET

Las comparaciones de la actividad en las áreas de interés se realizaron mediante un ANOVA de dos vías tomando como factores el tratamiento (dos niveles: salina y cocaína) y la etapa del desarrollo (dos niveles: P37 y P90). Las comparaciones entre grupos se realizaron con el test de Tukey.

Hembras adultas: ~P90.
Hembras adolescentes: ~P37.

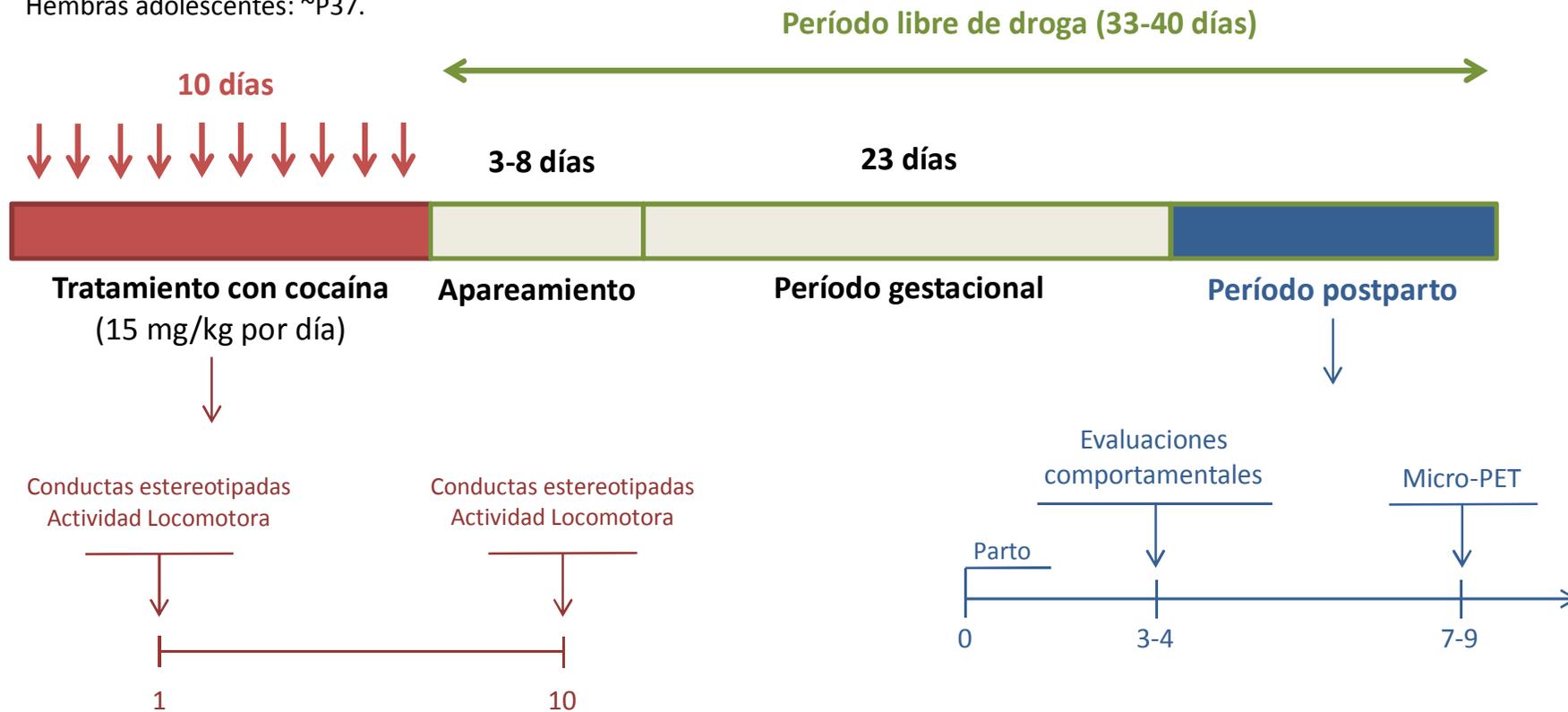


Figura 10. Esquema del diseño experimental basado en trabajos previos de Febo y sus colaboradores (1, 2).

4 RESULTADOS

4.1 Sensibilización comportamental inducida por la administración de cocaína

4.1.1 Estereotipias

Efecto del tratamiento

La figura 11 muestra que las calificaciones asignadas variaron entre las hembras luego de tratamiento con cocaína. El tratamiento con la droga provocó un aumento de conductas estereotipadas (caracterizadas por exploración de la caja de forma repetida y niveles altos de actividad o movimientos rápidos y repetidos de la cabeza en el mismo sitio) en las hembras ADU_{COCAÍNA} y en las ADO_{COCAÍNA} respecto a las tratadas con salina, tanto en el día 1 (ADU_{SALINA} vs ADU_{COCAÍNA}, U(13, 11)=9, p=0,0003; ADO_{SALINA} vs ADO_{COCAÍNA}, U(12, 11)=0, p=0,0001) como en el día 10 (ADU_{SALINA} vs ADU_{COCAÍNA}, U(13, 11)=0, p=0,00004; ADO_{COCAÍNA} vs ADO_{SALINA}, U(12, 11)=0, p=0,0001).

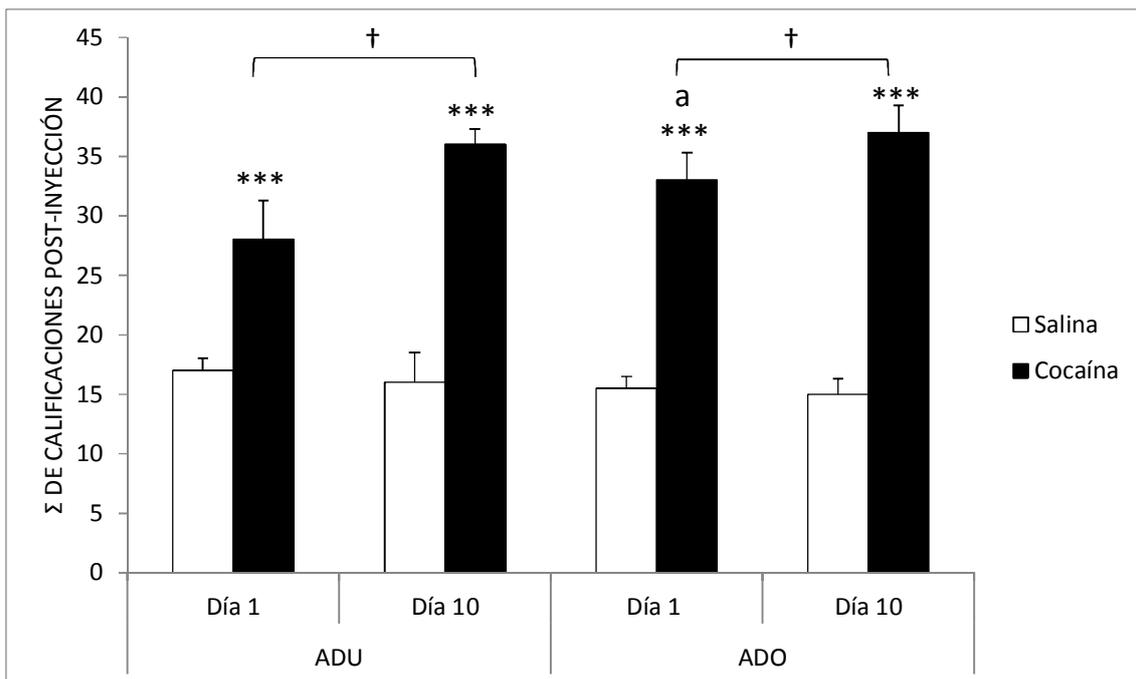


Figura 11. Medianas (RSIQ) (calculada a partir de la suma de las calificaciones obtenidas en los minutos 5, 10, 15, 20 y 25 para cada animal) de las estereotipias de las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=13; nADO=12) o cocaína (nADU=11, nADO=11) en el día 1 y en el día 10 de tratamiento, según la escala de Ellinwood y Balster (1974). ^ap<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA}, **p<0,005 y ***p<0,0005 vs. grupo control correspondiente, prueba U de Mann-Whitney, y †p<0,05, prueba pareada de Wilcoxon.

Efecto de la etapa del desarrollo

La edad a la que fue administrada la droga influyó en el grado de estereotipias. Mientras que los grupos tratados con salina no mostraron diferencias entre ellos en el día 1 (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA} , $U(13, 12)=44,5$, $p=0,12$) ni en el día 10 (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA} , $U(13, 12)=58$, $p=0,2$), las hembras que recibieron la droga en la adolescencia exhibieron un mayor nivel de estereotipias respecto a las tratadas cuando adultas en el día 1 ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(11, 11)=8$, $p=0,001$) (ver figura 11). Estas diferencias no se observaron en el día 10 de tratamiento ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(11, 11)=42$, $p=0,2$).

Efecto del día del tratamiento

De manera interesante, la cocaína aumentó las estereotipias en el día 10 de tratamiento respecto al día 1 tanto en las hembras tratadas durante la adultez (ADU) ($T(8)=0$, $p=0,01$) como en las hembras tratadas durante la adolescencia (ADO) ($T(10)=8$, $p=0,05$). En contraste, las hembras de ambos grupos tratadas con salina no mostraron diferencias en el nivel de estereotipias entre el día 1 y el día 10 de tratamiento (ADU ($T(8)=14$, $p=0,5$) y ADO ($T(9)=8$, $p=0,08$) (ver figura 11).

Secuencia temporal de estereotipias

La figura 12, panel A, muestra la secuencia temporal de la expresión de estereotipias luego de la administración de salina o cocaína. Así, las estereotipias de los animales ADU registradas en los 25 minutos luego de la inyección de salina no difirieron entre el día 1 y el 10 ($p=ns$ para todas las comparaciones). En tanto, los tratados con cocaína presentaron mayores estereotipias en el día 10 respecto al día 1 a partir del minuto 5 de observación ($p<0,05$ para las comparaciones en los minutos 5, 10, 15, 20 y 25).

De forma similar, en contraste con la ausencia de diferencias en las hembras ADO tratadas con salina en el día 1 y 10 en los 25 minutos de registro de estereotipias ($p=ns$ para todas las comparaciones), las tratadas con cocaína mostraron un aumento significativo de las estereotipias a partir del minuto 15 en el día 10 respecto al día 1 (ver figura 12, panel B).

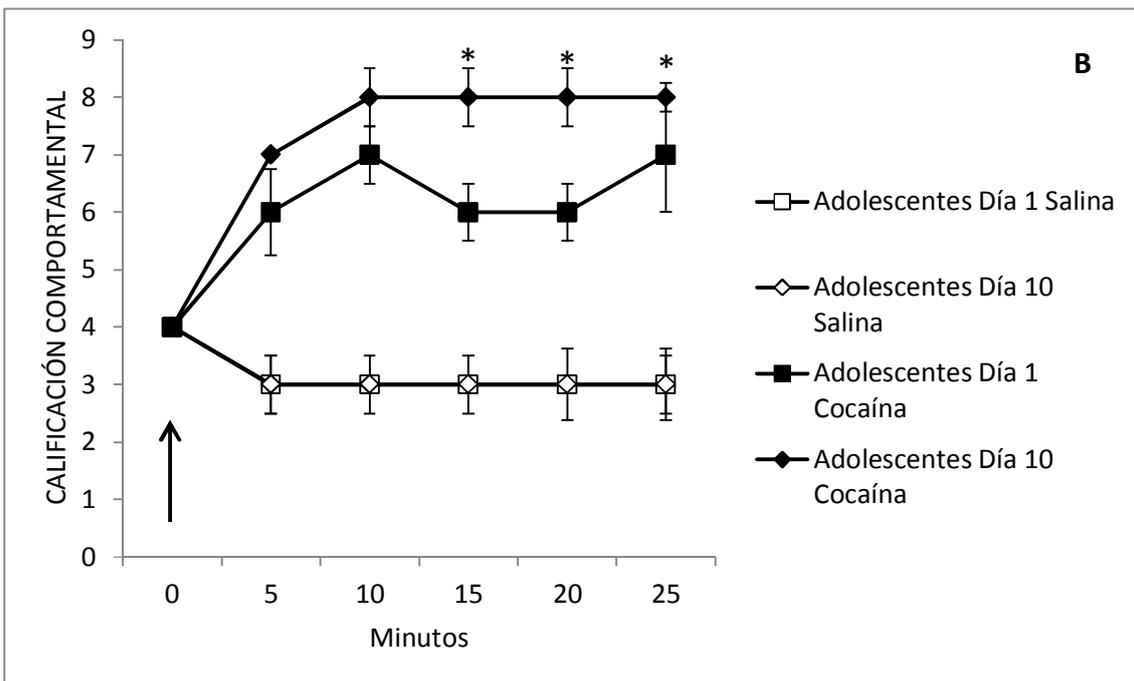
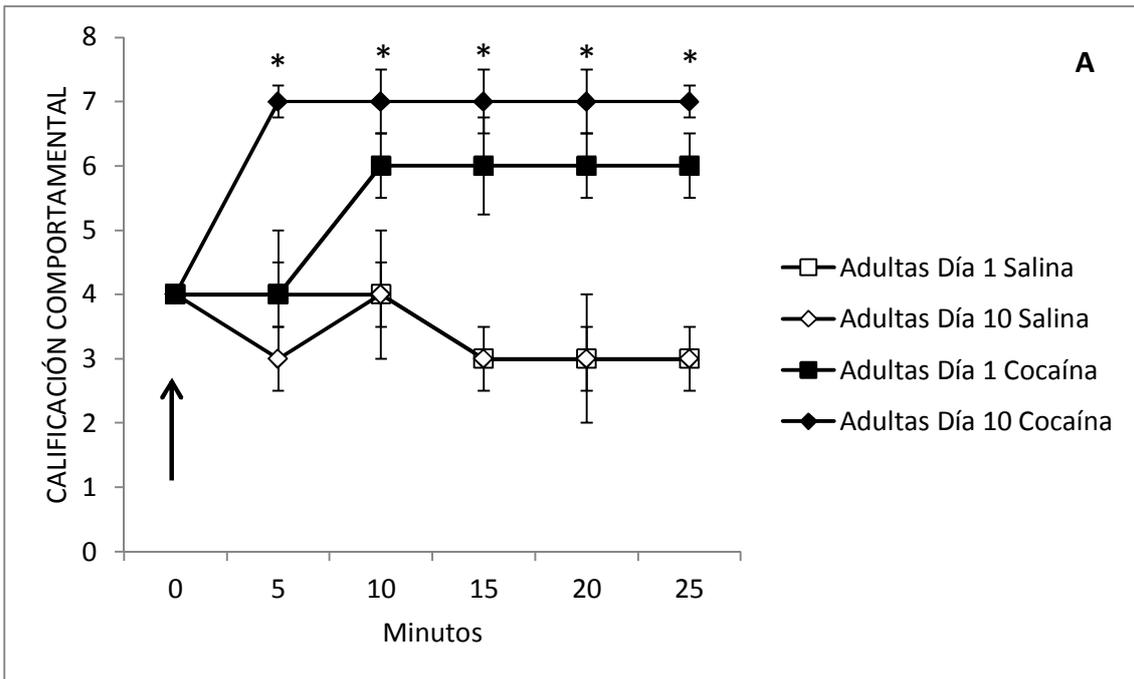


Figura 12. Calificaciones asignadas a las hembras adultas (A) y adolescentes (B) tratadas con salina (nADU=13; nADO=12) o cocaína (nADU=11, nADO=11), en los 25 minutos posteriores a la inyección, en el día 1 y en el día 10 de tratamiento según la escala de Ellinwood y Balster (1974). * $p < 0,05$ vs. ■, prueba pareada de Wilcoxon. La flecha indica el momento de la inyección de cocaína o salina.

4.1.2 Actividad Locomotora

Efecto del tratamiento

La cocaína aumentó el número total de cruzamientos realizados por las ratas de ambos grupos tratados tanto en el día 1 (ADU_{SALINA} vs $ADU_{COCAÍNA}$, $U(13, 12)=33,5$, $p=0,01$; ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(11, 11)=21$, $p=0,01$) como en el día 10 (ADU_{SALINA} vs $ADU_{COCAÍNA}$, $U(13, 12)=12$, $p=0,0004$; ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(11, 11)=3,5$, $p=0,0002$) (Figura 13). Además, se observó un incremento de los *rearings* en el día 10 en ambos grupos tratados con la droga (ADU_{SALINA} vs $ADU_{COCAÍNA}$, $U(13, 12)=32$, $p=0,01$; ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(11, 11)=12,5$, $p=0,002$) (tabla 2).

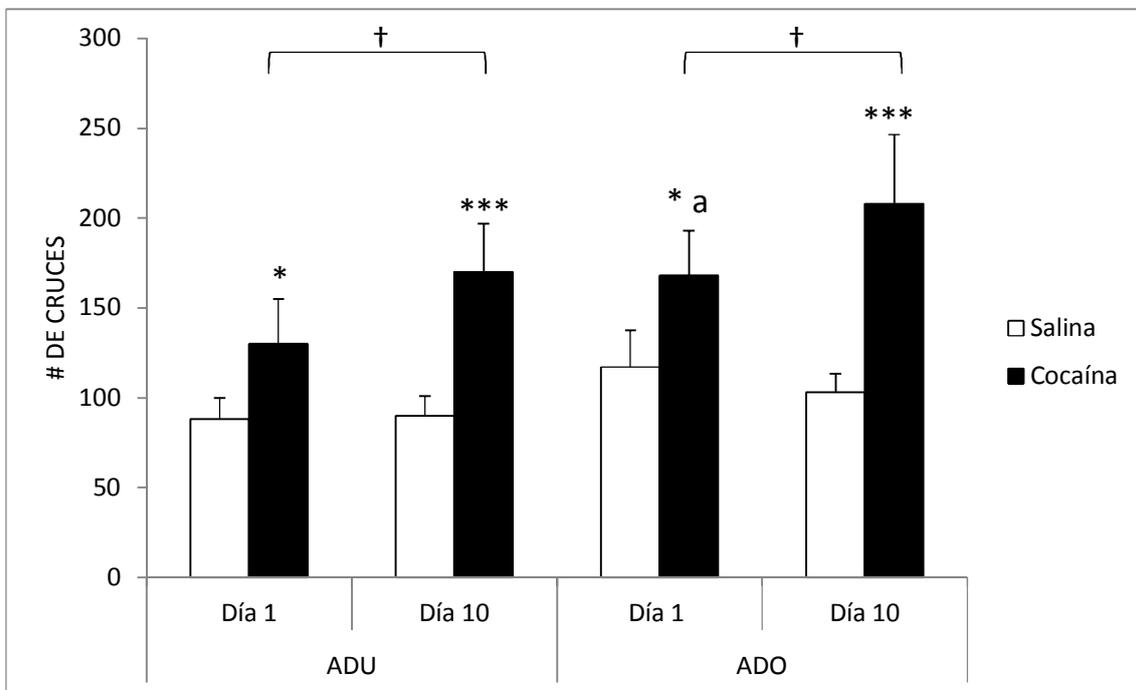


Figura 13. Número total de cruzamientos de cuadrantes durante los 10 minutos de prueba en las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina ($nADU=13$; $nADO=11$) o cocaína ($nADU=12$, $nADO=11$). Los datos se expresan en medianas (RSIQ). ^a $p<0,06$ vs. $ADU_{COCAÍNA}$, * $p<0,05$, ** $p<0,005$ y *** $p<0,0005$ vs. grupo control correspondiente, prueba U de Mann-Whitney, y † $p<0,05$, prueba pareada de Wilcoxon.

Tabla 2. Número de *rearings* y defecaciones de las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=13; nADO=11) o cocaína (nADU=12; nADO=11) en el transcurso de los 10 minutos que duró la evaluación de la actividad locomotora.

			<i>Rearings</i>	Defecaciones
Adultas	Día 1	Salina	27 (2)	0 (0)
		Cocaína	39 (9,3)	0 (0)
	Día 10	Salina	30 (4)	0 (0,8)
		Cocaína	42 (13,5) [*]	0 (0)
Adolescentes	Día 1	Salina	24 (7,3)	2 (1,8) ^b
		Cocaína	30 (6)	0 (0,6)
	Día 10	Salina	22 (7)	2 (1,3)
		Cocaína	48 (8) [*]	0 (0) [*]

Los datos se expresan en medianas (RSIQ). ^b $p < 0,05$ vs. ADU_{SALINA} y ^{*} $p < 0,05$, vs. grupo control salino correspondiente, prueba U de Mann-Whitney.

Efecto de la etapa del desarrollo

El número total de cruces de las hembras ADU y ADO tratadas con vehículo no mostró diferencias en el día 1 (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA}, $U(13, 11) = 44,5$, $p = 0,12$) ni en el día 10 (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA}, $U(13, 11) = 63,5$, $p = 0,6$). En contraste, el tratamiento con cocaína tendió a aumentar el número de cruces en las ADO respecto a las ADU en el día 1 (ADU_{COCAÍNA} vs ADO_{COCAÍNA}, $U(12, 11) = 35,5$, $p = 0,06$), pero no en el día 10 (ADU_{COCAÍNA} vs ADO_{COCAÍNA}, $U(12, 11) = 41$, $p = 0,13$) (ver figura 13).

Efecto del día del tratamiento

De igual modo a lo observado en las respuestas estereotipadas, mientras que no se detectaron diferencias luego del tratamiento con vehículo en el número de cruces entre el día 1 y el 10 en las hembras ADU ($T(13) = 38,5$, $p = 0,6$) ni en las ADO ($T(11) = 24$, $p = 0,4$), la droga incrementó significativamente este parámetro en el día 10 respecto al día 1 tanto en las hembras ADU ($T(12) = 0$, $p = 0,003$) como en las ADO ($T(11) = 9$, $p = 0,03$) (Figura 13).

4.2 Parámetros reproductivos

El tratamiento con cocaína no influyó en parámetros reproductivos de los animales. Diecisiete de 25 hembras tratadas con salina quedaron preñadas, mientras que el número de las tratadas con cocaína fue de 19 en 22 (prueba de χ^2 , $p=ns$). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos ADO y ADU tratados con salina o cocaína en el número de crías al momento del parto (que oscilaron entre 11 y 14 crías; datos no mostrados).

En el día del parto la camada se estandarizó a 4 hembras y 4 machos y no hubo un efecto significativo del tratamiento ni de la etapa del desarrollo en el peso de la camada al momento de la evaluación del comportamiento maternal (medias \pm SE en g, $ADU_{SALINA}=78,8\pm 17,7$. $ADU_{COCAÍNA}= 72,7\pm 3,2$ $ADO_{COCAÍNA}=77,6\pm 8,4$, $ADO_{SALINA}=83,8\pm 15,2$, test de t de Student, $p=ns$ para todas las comparaciones).

4.3 Comportamiento maternal

Comportamientos activos

Efecto del tratamiento

Como se muestra en la figura 14, el tratamiento con cocaína produjo una reducción significativa de los lamidos anogenitales en las hembras ADU (ADU_{SALINA} vs $ADU_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=13$, $p=0,03$) y de los lamidos corporales en las hembras ADO (ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(9, 10)=17$, $p=0,02$).

En tanto, si bien la administración de cocaína generó en ambos grupos un incremento en la latencia de reunión de la camada de crías en el nido respecto a sus grupos controles correspondientes, la diferencia alcanzó la significancia estadística solo en el grupo de hembras ADO (ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(9, 10)=20$, $p=0,04$) (ver tabla 3). En apoyo a estos datos, solo las hembras tratadas con cocaína en la adolescencia mostraron una mayor latencia de acarreo de la primera cría respecto a las tratadas con salina, con una probabilidad cercana a la significancia estadística (ADO_{SALINA} vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(9, 10)=23$, $p=0,08$) (ver tabla 2).

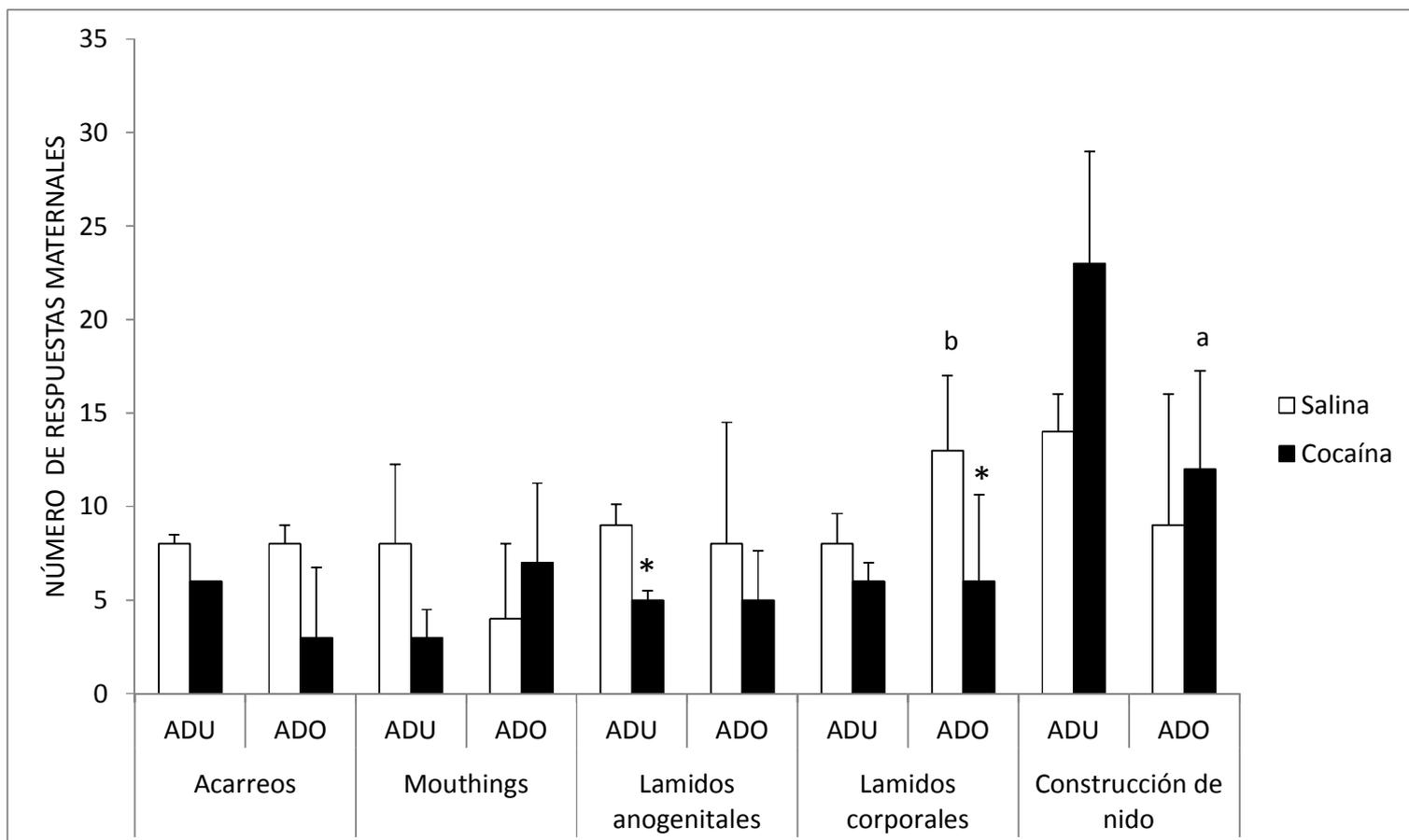


Figura 14. Número de diferentes respuestas maternas desplegadas por las hembras tratadas durante la etapa adolescente o adulta con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9, nADO=10) hacia las crías. Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^a $p < 0,05$ vs. ADU_{COCAÍNA}, ^b $p < 0,05$ vs. ADU_{SALINA} y * $p < 0,05$, vs. grupo control correspondiente.

Más aún, el hallazgo más significativo del experimento fue que más de la mitad de las hembras tratadas con cocaína durante la adolescencia no consiguió reunir a toda la camada en el nido, en contraste con lo observado en las hembras tratadas con salina (ADO_{SALINA} vs ADO_{COCAÍNA}, $\chi^2 = 5,3$, $p = 0,02$). Este déficit no se observó cuando el tratamiento se realizó en la etapa adulta (ADU_{SALINA} vs ADU_{COCAÍNA}, $\chi^2 = 2,01$, $p = 0,16$) (tabla 4).

Tabla 3. Latencias del comportamiento de acarreo de las crías de hembras ADU y ADO tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9; nADO=10).

	Latencia al primer acarreo	Latencia a la reunión de camada
ADU _{SALINA}	32 (28,6)	292 (158,5)
ADU _{COCAÍNA}	302 (158,0)	910 (328,0)
ADO _{SALINA}	69 (58,5)	636 (249,5)
ADO _{COCAÍNA}	796 (784,9) [#]	1800 (480,0)*

Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. *p<0,05 y #p=0,08, vs. grupo control correspondiente.

Tabla 4. Número de hembras ADU y ADO tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9; nADO=10) que reunieron la camada en el nido en los 30 minutos de evaluación.

	Reúnen camada	No reúnen camada
ADU _{SALINA}	8	0
ADU _{COCAÍNA}	7	2
ADO _{SALINA}	7	2
ADO _{COCAÍNA}	4 ^{a*}	6

Los datos fueron analizados mediante una prueba de chi-cuadrado (χ^2). ^ap<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA} y *p<0,05 vs. grupo control correspondiente.

En esta línea, como muestra la figura 15, el tiempo de los intervalos entre los acarreos de las hembras tratadas durante la adolescencia se vio significativamente incrementado en comparación a su control salino (ADO_{COCAÍNA} vs ADO_{SALINA}: 1^{er} intervalo, U(9, 9)=18, p=0,05; 2^{do} intervalo, U(9, 9)=20, p=0,07; 3^{er} intervalo, U(9, 9)=19, p=0,06; 4^{to} intervalo, U(9, 9)=17, p=0,04; 5^{to} intervalo, U(9, 9)=17, p=0,04), constituyendo un fenómeno que no se observó en el grupo de hembras tratadas con la droga durante la adultez (p=ns en todas las comparaciones).

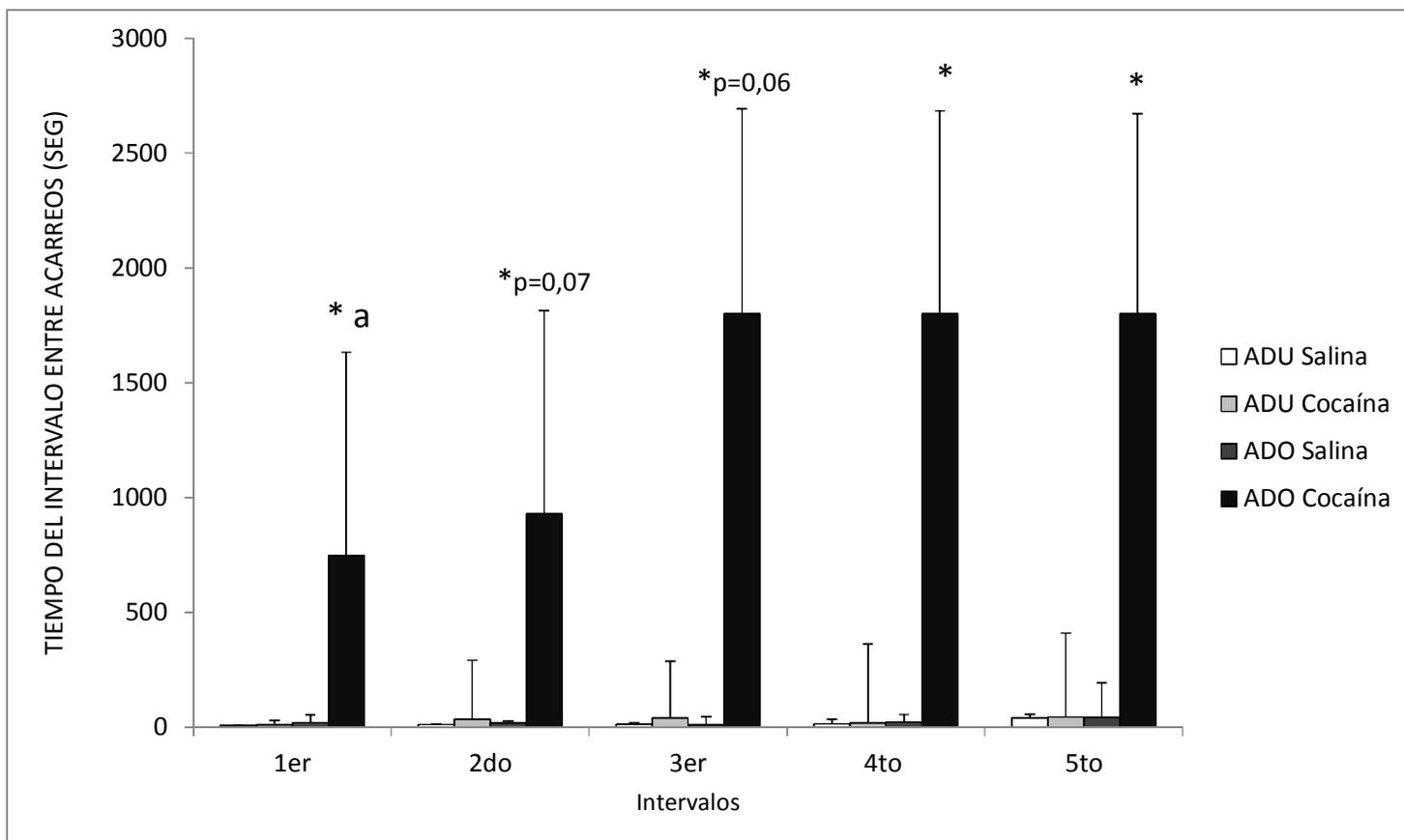


Figura 15. Tiempo transcurrido entre los acarreos de las hembras tratadas durante la etapa adolescente o adulta con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=8, nADO=9). 1er: intervalo entre el 1^{er} y 2^{do} acarreo; 2do: intervalo entre el 2^{do} y 3^{er} acarreo; 3er: intervalo entre el 3^{er} y 4^{to} acarreo; 4to: intervalo entre el 4^{to} y 5^{to} acarreo; 5to: intervalo entre el 5^{to} y el 6^{to} acarreo. Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^a p<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA} y *p<0,05, vs. grupo control correspondiente.

Comportamientos pasivos

Mientras que la administración de cocaína no alteró el tiempo de contacto con las crías en las hembras que recibieron la droga en la etapa adulta respecto al control salino, en aquellas tratadas durante la adolescencia lo redujo de forma significativa (ADO_{COCAÍNA} vs ADO_{SALINA}, U(10, 9)=10, p=0,05) (ver figura 16).

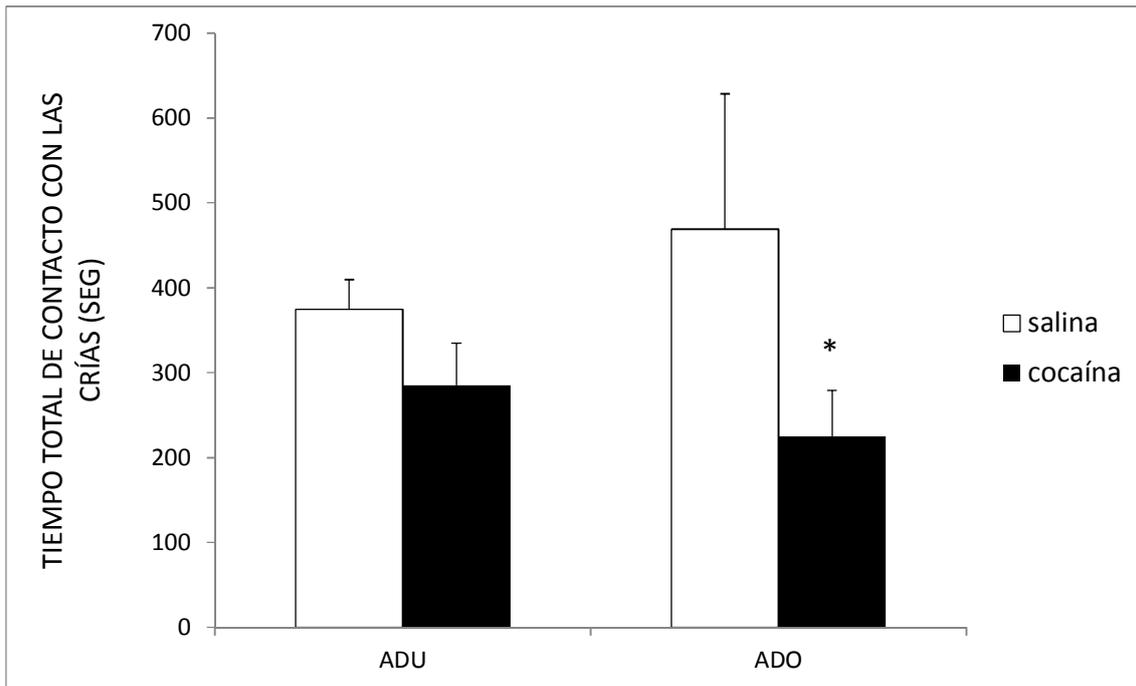


Figura 16. Tiempo total en que las hembras ADU y ADO tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9, nADO=10) permanecieron en contacto con las crías. Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$, vs. grupo control correspondiente.

En tanto, mientras que en las hembras ADU la droga generó un incremento en el número de *hover overs* ($ADU_{COCAÍNA}$ vs ADU_{SALINA} , $U(9, 8)=14$, $p=0,03$) y un descenso en su latencia ($ADU_{COCAÍNA}$ vs ADU_{SALINA} , $U(9, 8)=10$, $p=0,01$) (ver tabla 5) respecto al control salino, en las hembras ADO los disminuyó ($ADO_{COCAÍNA}$ vs ADO_{SALINA} , $U(10, 9)=19,5$, $p=0,04$).

Entre las hembras ADU, tan solo se observaron posturas de amamantamiento en una hembra por grupo ($p=ns$, datos no mostrados). Por su parte, no se documentaron posturas de amamantamiento entre las hembras ADO.

Tabla 5. Número y latencia del comportamiento de *hover over* de hembras ADU y ADO tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9; nADO=10) hacia las crías.

	Nº de <i>hover overs</i>	Latencia de <i>hover over</i>
ADU _{SALINA}	1 (0,1)	1401 (112,0)
ADU _{COCAÍNA}	3 (1,0) [*]	798 (116,0) [*]
ADO _{SALINA}	4 (2,0)	821 (380,0)
ADO _{COCAÍNA}	1 (0,5) ^{a*}	1037 (608,0)

Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^ap<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA}, *p<0,05 vs. grupo control correspondiente.

Efecto de la etapa del desarrollo

Comportamientos activos

En la comparación entre las hembras ADU y ADO tratadas con vehículo, no se observaron diferencias en el número de comportamientos activos, a excepción del mayor número de lamidos corporales que mostraron las hembras ADO en relación a las ADU (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA}, U= 14,5, p=0,04). En tanto, la comparación entre las hembras ADU y ADO tratadas con cocaína muestra que las hembras ADU realizaron un mayor número de comportamientos de construcción de nido (ADU_{COCAÍNA} vs ADO_{COCAÍNA}, U(9, 10)=16,5, p=0,02) (Figura 14), no observándose otras diferencias entre los grupos. Además, el intervalo transcurrido entre el primer y el segundo acarreo fue significativamente mayor en las hembras ADO respecto a las ADU tratadas con cocaína (p=ns). (ver figura 15).

Comportamientos pasivos

Las hembras ADU y ADO tratadas con salina no mostraron diferencias en el tiempo de contacto con crías (ver figura 16), en el número de *hover overs* ($p=ns$), ni en la latencia de *hover over* (ver tabla 5). En tanto, si bien las hembras ADU que recibieron cocaína no mostraron diferencias en el tiempo total de contacto con las crías respecto a las ADO (Figura 16), exhibieron un mayor número de *hover overs* ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(9, 10)=17$, $p=0,02$) sin cambios en su latencia (tabla 5).

Comportamientos exploratorios y acicalamientos no dirigidos a las crías

La suma de los comportamientos exploratorios (*rearings* y olfateos al ambiente) y auto-acicalamientos tuvo tendencia a ser mayor en las hembras ADO que en las ADU tratadas con vehículo (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA} , $U= 16$, $p=0,06$). El tratamiento con cocaína aumentó el número de estos comportamientos en las hembras ADO con respecto las ADU ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$: $U(9, 10)=19,5$, $p=0,04$) (Tabla 6).

Tabla 6. Suma de comportamientos exploratorios (*rearings* + olfateos al ambiente) y auto-acicalamientos de hembras ADU y ADO tratadas con salina ($nADU=8$; $nADO=9$) o cocaína ($nADU=9$; $nADO=10$).

	Comportamientos exploratorios + auto-acicalamientos
ADU_{SALINA}	49 (3,9)
$ADU_{COCAÍNA}$	48 (6,0)
ADO_{SALINA}	63 (11,0)
$ADO_{COCAÍNA}$	73 (12,8) ^a

Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^a $p<0,05$ vs. $ADU_{COCAÍNA}$.

4.4 Agresión maternal

Efecto del tratamiento

Como se observa en la figura 17, ninguno de los dos grupos expuestos a cocaína exhibió cambios en el nivel de agresión en relación a su correspondiente grupo control. Conforme esto último, tampoco se observaron diferencias en el número de respuestas de sumisión de los machos entre los grupos (tabla 6), en sus latencias ni en el tiempo total (tabla 7).

Efecto de la etapa del desarrollo

La comparación entre los animales tratados con salina muestra que si bien las hembras ADO exhibieron un mayor número de posturas laterales (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA} , $U(9, 9)=15$, $p=0,04$) (tabla 6), ni la suma de respuestas agresivas ofensivas (Figura 17) ni las respuestas de sumisión de los machos (tabla 6 y 7) difirieron entre los grupos.

Por otro parte, las hembras que recibieron cocaína en la adolescencia mostraron más comportamientos agresivos en comparación a las tratadas cuando adultas ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(9, 9)=17$, $p=0,04$) (ver figura 17). No obstante, los mayores niveles de agresión no fueron acompañados por un descenso en su latencia ni por un número mayor de respuestas de sumisión por parte de los animales intrusos (tabla 6 y 7).

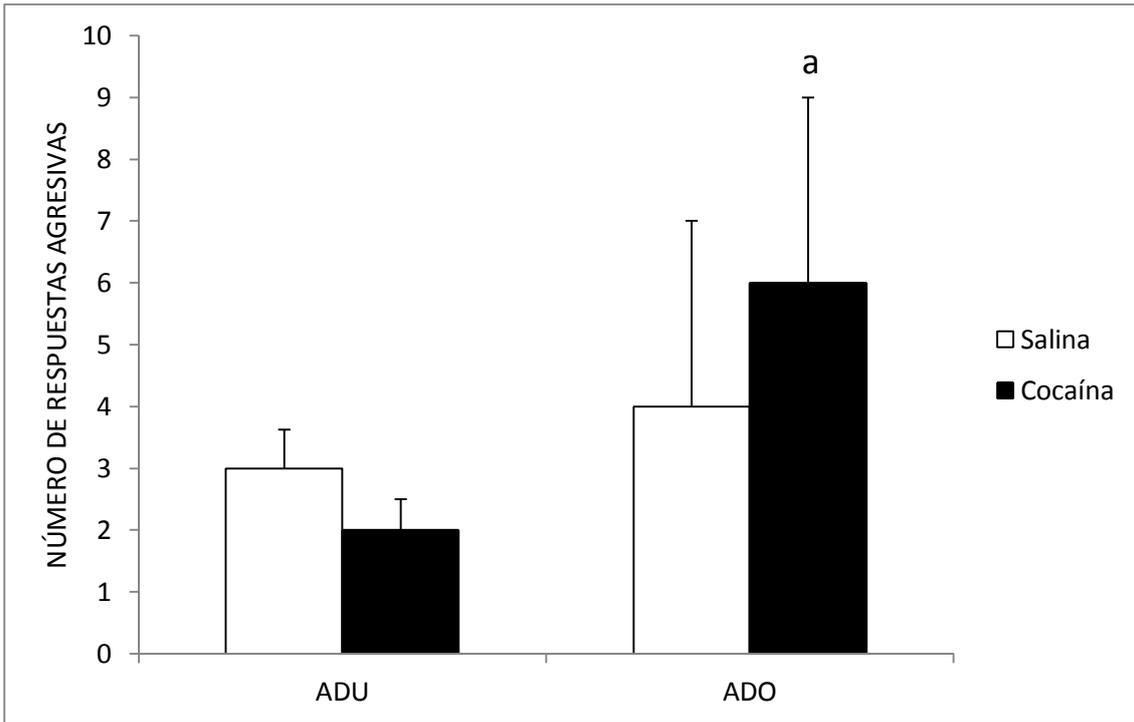


Figura 17. Número de respuestas agresivas (suma de ataques, posturas laterales y mordidas) desplegadas por las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9, nADO=9) hacia los machos intrusos. Los datos se expresan en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^ap<0,05 vs. hembras ADU_{COCAÍNA}.

Tabla 6. Número de algunas respuestas agresivas de las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9; nADO=9) durante la prueba de 10 minutos, así como de las respuestas de sumisión de los machos intrusos.

	Ataques	Posturas laterales	Mordidas	Patadas	Respuestas de sumisión de machos
ADU _{SALINA}	2 (0,6)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (0,0)	3 (0,8)
ADU _{COCAÍNA}	2 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,0)
ADO _{SALINA}	2 (1,0)	2 (2,0) ^b	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,5)
ADO _{COCAÍNA}	3 (1,5) ^a	1 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,0)	3 (0,5)

Los datos se expresan en medianas (RSIQ). Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. ^ap<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA}, ^bp<0,05 vs. ADU_{SALINA}

Tabla 7. Latencia de respuestas agresivas de las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=9; nADO=9) durante la prueba de 10 minutos, así como de la sumisión de los machos intrusos, y el tiempo total de sumisión de los mismos.

	Latencia de agresión de la hembra	Latencia de sumisión del macho	Tiempo total de sumisión del macho
ADU _{SALINA}	125 (22,8)	125 (23,1)	243 (108,5)
ADU _{COCAÍNA}	103 (19,5)	116 (15,5)	204 (118,3)
ADO _{SALINA}	194 (146,0)	195 (210,5)	107 (115,5)
ADO _{COCAÍNA}	113 (52,5)	150 (49,0)	224 (138)

Los datos se expresan en medianas (RSIQ). Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

4.5 Ansiedad experimental

Efecto del tratamiento

La administración crónica de cocaína afectó de forma diferencial los niveles de ansiedad experimental en las hembras ADU y ADO (ver figura 18). Mientras que el tratamiento con cocaína ocasionó un descenso significativo en el porcentaje de tiempo que las hembras tratadas durante la etapa adulta pasaron en los brazos abiertos ($ADU_{COCAÍNA}$ vs ADU_{SALINA} , $U(8, 8)=7,5$, $p=0,01$), así como en la cantidad de cruces entre los brazos abiertos ($ADU_{COCAÍNA}$ vs ADU_{SALINA} , $U(8, 8)=12$, $p=0,04$) (tabla 8), en las hembras tratadas durante la adolescencia el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos ($ADO_{COCAÍNA}$ vs ADO_{SALINA} , $U(9, 9)=15$, $p=0,02$) (Figura 18) y el número de cruzamientos entre los brazos abiertos (tabla 8) se incrementaron significativamente. No se encontraron diferencias significativas en el número de cruzamientos totales ($p=ns$), acicalamientos, *rearings* y defecaciones en los grupos tratados en comparación a sus controles correspondientes (tabla 8).

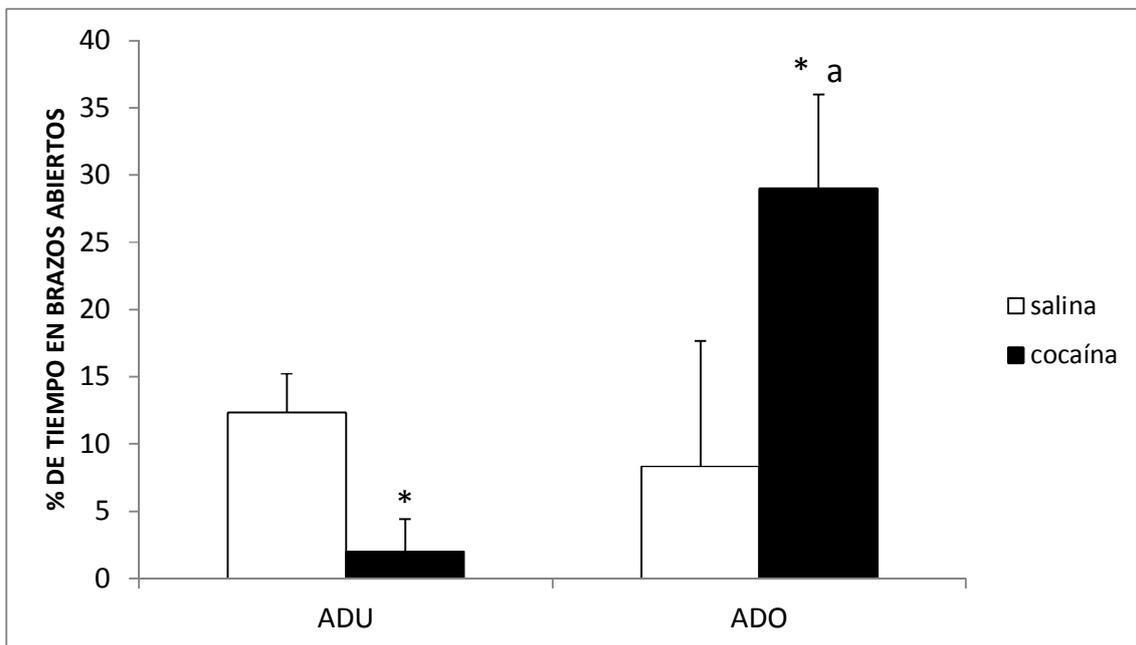


Figura 18. Porcentaje de tiempo que las hembras ADU_{SALINA} ($n=8$), $ADU_{COCAÍNA}$ ($n=8$), ADO_{SALINA} ($n=9$) y $ADO_{COCAÍNA}$ ($n=9$) pasaron en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz. Los datos son expresados en medianas (RSIQ) y fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p<0,05$ vs. grupo control correspondiente, ^a $p<0,05$ vs. $ADU_{COCAÍNA}$.

Tabla 8. Número de distintas respuestas comportamentales de las hembras adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=8; nADO=9) o cocaína (nADU=8, nADO=9) en el laberinto elevado en cruz.

	Entrada a brazos abiertos	Entrada a brazos cerrados	<i>Rearings</i>	Auto-acicalamiento	<i>Head dipping</i>	Defecaciones	Cruces abiertos	Cruces cerrados
ADU _{SALINA}	2 (0,6)	3 (1)	14 (2,4)	4 (0,5)	3 (0,9)	0 (0,3)	1 (0,5)	7 (0,9)
ADU _{COCAÍNA}	1 (0,6)	2 (0,5)	17 (2,9)	4 (0,6)	1 (1,1)	0 (0)	0 (0) [*]	9 (2)
ADO _{SALINA}	3 (2,5)	2 (1,5)	17 (4,5)	2 (1) ^b	3 (3)	2 (1,5)	1 (0,5)	10 (2)
ADO _{COCAÍNA}	3 (2) ^a	4 (1) ^a	17 (3,5)	4 (2)	7 (2) ^a	0 (1,5)	2 (0,5) ^a	8 (1)

Los datos se expresan en medianas (RSIQ). Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. *p<0.05. ^ap<0,05 vs. ADU_{COCAÍNA}, ^bp<0,05 vs. ADU_{SALINA} y *p<0.05 vs. grupo control correspondiente.

Efecto de la etapa del desarrollo

No se encontraron diferencias en el porcentaje del tiempo en brazos abiertos (Figura 18) ni en otros comportamientos observados en el laberinto elevado en cruz (tabla 8) entre las hembras ADU y ADO tratadas con salina a excepción del acicalamiento que fue mayor en las hembras ADU (ADU_{SALINA} vs ADO_{SALINA} , $U(8, 9)= 10,5$, $p=0,02$).

En contraste, el tratamiento con cocaína aumentó el porcentaje de tiempo que las hembras ADO permanecieron en los brazos abiertos ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=2$, $p=0,001$) (Figura 18), así como el número de entradas a los brazos abiertos ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=5$, $p=0,003$) y a los brazos cerrados ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=4$, $p=0,002$), el número de cruces entre brazos abiertos ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=8$, $p=0,008$) y de *head dipping* ($ADU_{COCAÍNA}$ vs $ADO_{COCAÍNA}$, $U(8, 9)=7,5$, $p=0,007$) en comparación a las hembras ADU expuestas a la droga (tabla 8). No se observaron diferencias significativas en el número de cruzamientos totales ($p=ns$).

4.6 Tasa metabólica cerebral regional

En la CPFm, el análisis de varianza de dos vías realizado muestra que no hubo un efecto significativo del tratamiento ($F(1, 27)=0.91$, $p=0.34$) ni de la etapa reproductiva (F etapa (1, 27)=3.01, $p=0.095$) en la tasa metabólica cerebral (TMC), aunque el efecto de la interacción entre el tratamiento y la etapa reproductiva (F interacción (1, 27)=7.06, $p=0.013$) indica que los grupos fueron diferentes significativamente. El análisis post-hoc, mediante el test de Tukey, muestra que los animales tratados con cocaína en la etapa adulta presentaron una tendencia casi significativa ($p=0.08$) a un hipermetabolismo en la CPFm respecto a los tratados con salina, fenómeno que no se observó entre las hembras adolescentes tratadas con salina o con cocaína. Además, la comparación mediante el test de Tukey mostró una mayor actividad metabólica en las hembras ADU respecto a las ADO tratadas con cocaína que alcanzó la significancia estadística ($p=0.023$) (ver figura 19), mientras que no se detectaron diferencias entre los dos grupos tratados con salina ($p=ns$).

Por otro lado, el tálamo presentó un leve hipometabolismo en ambos grupos de hembras tratadas con la droga (F tratamiento (1,27)=3,28, $p=0,08$) indicando una tendencia del efecto de la cocaína en ambos grupos tratados. No obstante, no se evidenció un efecto según la etapa del desarrollo (F etapa (1,27)=0,28, $p=0,6$), y tampoco un efecto

significativo de la interacción entre el tratamiento y la etapa del desarrollo (F interacción (1,27)=1,55, $p=0,22$).

Finalmente, el análisis de la TMC de la corteza orbitofrontal (COF) muestra que no hubo diferencias de acuerdo al tratamiento (F tratamiento (1, 27)=0,02, $p=0,89$), pero el efecto de la etapa del desarrollo indica la existencia de diferencias significativas (F etapa (1, 27)=5,98, $p=0,02$) entre animales tratados en la etapa adulta versus adolescente. No obstante, la interacción entre el tratamiento y la etapa reproductiva indica que los grupos no se diferenciaron significativamente (F interacción (1, 27)=0,02, $p=0,89$) (Figura 19).

No se detectaron diferencias significativas en la TMC del NAc, AMY, estriado, corteza cingulada, ATV, hipocampo e hipotálamo ($p=ns$ para todas las comparaciones, datos no mostrados).

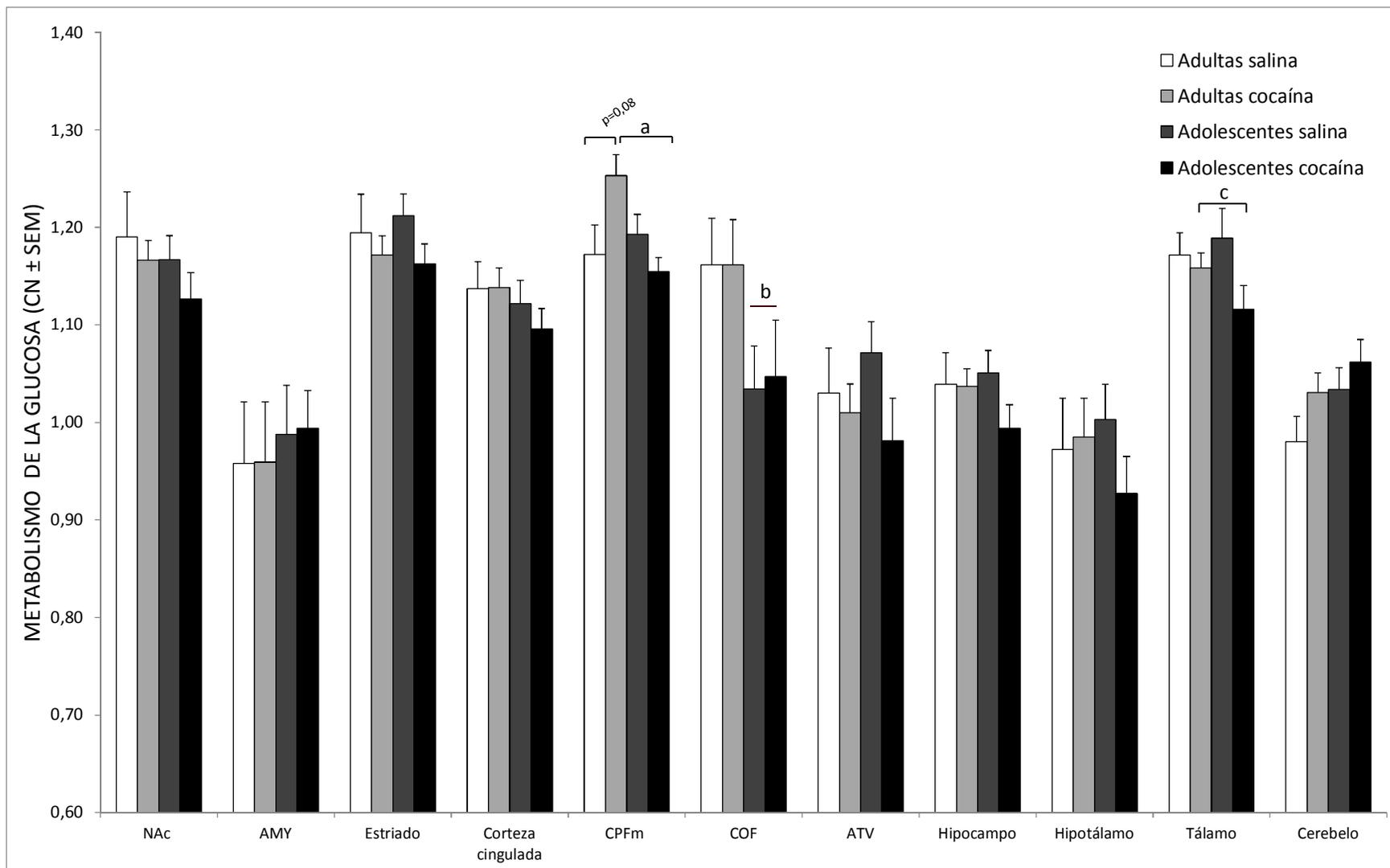


Figura 19. Cambios en el metabolismo de la glucosa en áreas del cerebro calculado como cociente de normalización (CN) en ratas adultas y adolescentes tratadas con salina (nADU=7; nADO=7) o cocaína (nADU=7, nADO=7). Los datos son expresados en medias (SEM) y fueron comparados mediante ANOVA de dos vías, seguido de un análisis post hoc (Tukey test). ^ap<0,05 ADO_{COCAÍNA} vs. ADU_{COCAÍNA}, ^bp<0,05 ADO vs ADU (efecto de la etapa del desarrollo), ^cp=0,08 ADO y ADU cocaína vs. ADO y ADU salina (efecto del tratamiento) Abreviaturas: NAc, núcleo accumbens; CPFm, corteza prefrontal medial; COF, corteza orbitofrontal; ATV, área tegmental ventral.

5 DISCUSIÓN

En el presente estudio brindamos evidencia de que las hembras adolescentes fueron más sensibles que las adultas a los efectos motores de la administración crónica de cocaína. En el mismo sentido documentamos que el tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia ocasionó efectos deletéreos más pronunciados en el comportamiento maternal de las hembras lactantes, en comparación a los observados en las tratadas durante la etapa adulta. En tanto, mientras que no encontramos diferencias en la agresión maternal entre las hembras expuestas a cocaína y sus respectivos controles salinos, la droga redujo la ansiedad experimental de las hembras tratadas en la adolescencia y aumentó la de las tratadas cuando adultas.

Los estudios PET mostraron una tendencia al hipermetabolismo en la CPFm de las hembras tratadas con la droga durante la adultez, resultado que no se observó en la CPFm de las hembras tratadas durante la adolescencia. Además, se observó una diferencia significativa en la CPFm de ambos grupos tratados con la droga, sugiriendo un efecto diferencial de la cocaína de acuerdo a la etapa del desarrollo.

Las alteraciones en la respuesta maternal, en la ansiedad experimental y en la TMC estuvieron presentes aproximadamente 35 días después de la última inyección de cocaína, indicando que la exposición repetida a la droga provocó cambios duraderos probablemente a través de su efecto en regiones del cerebro implicadas en el control del comportamiento y de la ansiedad maternales.

Vale señalar que este trabajo es el primero en evaluar los efectos a largo plazo de la administración pregestacional y crónica de cocaína durante la etapa adolescente en el comportamiento maternal, la afectividad y el metabolismo cerebral durante la adultez, y en compararlos con los efectos de la exposición a la droga durante la etapa adulta.

5.1 Efecto de la cocaína en las conductas estereotipadas y en la actividad locomotora de hembras adultas y adolescentes

El incremento de las conductas estereotipadas y de la respuesta locomotora observado en el día 10 en comparación al día 1 de administración de cocaína, tanto en las hembras adolescentes como adultas, constituyó un indicador de desarrollo de sensibilización comportamental. En tanto, la mayor sensibilidad a la cocaína de las hembras adolescentes

respecto a la de las adultas en el día 1, evidenciada tanto por el aumento de las respuestas estereotipadas como de la actividad locomotora, se encuentra en línea con estudios que han mostrado que las ratas adolescentes presentan una respuesta comportamental aumentada frente a la administración aguda de cocaína (160-162). Tomando en consideración que el efecto locomotor de la cocaína está mediado en parte por el sistema DAérgico (163), una posible explicación a la hiperactividad observada en las hembras adolescentes en comparación a la presentada por las adultas es que este sistema no está completamente desarrollado en la adolescencia, lo cual supone diferencias en su respuesta a la sustancia (164). La diferencia en la sensibilidad a la droga podría deberse al pico transitorio en la expresión de receptores DAérgicos y a diferencias en la expresión de DATs durante la adolescencia en comparación con la etapa adulta (137). No obstante, esta explicación sobre la posible influencia de asimetrías en la expresión de receptores DAérgicos o DATs en el efecto de la droga debe tomarse con precaución, debido a que las diferencias en la concentración de receptores DAérgicos y DATs entre hembras adolescentes y adultas no son tan marcadas como sí lo son en machos (131).

Por otra parte, debemos agregar que existe evidencia acumulada de que la acción de la cocaína en el sistema mesocorticolímbico es sensible a la influencia de las hormonas esteroideas gonadales (165, 166). En este sentido, si bien nuestro diseño experimental incorporó elementos para controlar esta variable y disminuir su incidencia en el sistema durante el período de administración de la droga (para igualar las condiciones endócrinas ambos grupos comenzaron el tratamiento en proestro), no es posible descartar que dada la irregularidad en la ciclicidad de la hembra durante la adolescencia, factores endócrinos puedan haber jugado un rol en la mayor sensibilidad a la cocaína que exhibieron las hembras durante la adolescencia y los posteriores efectos a nivel comportamental e imagenológico.

Vale mencionar que la literatura es contradictoria, ya que también se pueden encontrar reportes que dan cuenta de una hiposensibilidad en ratas adolescentes en respuesta a cocaína o anfetamina (167-171). También se han encontrado resultados conflictivos utilizando otras drogas como nicotina o alcohol (172). Las diferencias de estos estudios con respecto al nuestro podrían basarse en los distintos protocolos de administración de la droga utilizados (ej. número de días de tratamiento y dosis), en la variabilidad del período escogido como adolescencia en el cual se inyectó la cocaína, así como en el sexo de los animales experimentales.

5.2 Efecto de la cocaína en el comportamiento maternal de hembras tratadas en la etapa adulta o en la adolescente

La administración crónica de cocaína tuvo efectos a largo plazo en la respuesta maternal de ambos grupos de hembras, en coincidencia con los estudios de Febo y Ferris (2007) y Nephew y Febo (2010), que documentaron efectos duraderos de la droga como consecuencia del tratamiento pregestacional durante la etapa adulta.

Mientras que en las hembras tratadas con la droga durante la etapa adulta solo se observó una reducción en el número de lamidos en relación a su control salino correspondiente, el repertorio maternal de las hembras lactantes expuestas a la droga durante la adolescencia se vio severamente comprometido.

En relación a las hembras tratadas con la droga durante la etapa adulta, conforme el lamido de las crías es un componente del comportamiento maternal dependiente del estado motivacional de la hembra (33) y que el correcto funcionamiento del sistema DAérgico es clave en el control de los aspectos motivacionales de la respuesta maternal (58, 111, 173), podríamos sugerir que la acción crónica de la cocaína sobre el cerebro ya maduro habría afectado mecanismos implicados en la regulación de la motivación maternal. Si bien no se realizó ningún experimento que permita afirmar esta posibilidad, un indicio de ello podría ser el incremento en la actividad metabólica basal de la CPFm que generó la cocaína en relación al control salino como resultado de la sensibilización comportamental, el cual es indicador de posibles cambios en el circuito mesocorticolímbico (174). Brevemente, se ha establecido que la administración crónica de cocaína altera la transmisión sináptica excitatoria desde la CPFm al NAc, desencadenando procesos de potenciación en las sinapsis glutamatérgicas de las neuronas espinosas mediales del NAc durante la abstinencia prolongada (175, 176) (Figura 20). La ocurrencia de mecanismos de potenciación sináptica en la vía glutamatérgica CPFm-NAc podría haber interferido con la reducción de los *outputs* GABAérgicos del NA al PV, mediada por las proyecciones DAérgicas del ATV. De acuerdo al modelo de Numan (37, 56), la reducción de la actividad de las neuronas espinosas GABAérgicas, que proyectan al PV, lo liberarían de su inhibición permitiendo su estimulación a partir de *inputs* glutamatérgicos provenientes de áreas límbicas implicadas en el análisis sensorial de los estímulos de las crías. En línea con este modelo podríamos especular que el aumento de actividad de las neuronas espinosas GABAérgicas que proyectan al PV disminuye el impacto de las crías y su valor motivacional.

Cabe señalar que la reducción del número de lamidos de las hembras tratadas con la droga durante la etapa adulta, documentada en nuestro trabajo, contrasta con los únicos dos reportes que han evaluado los efectos de la cocaína administrada pregestacionalmente (1, 2), que encuentran un descenso en la latencia de acarreo de las crías y un mayor número de lamidos y sugieren un incremento del valor de incentivo de las crías. La razón de estas diferencias es desconocida, sin embargo es necesario aclarar que en los estudios de Febo (2007) y Nephew (2010) solo encontraron una reducción en el lamido en el día 2 postparto, mas no en el día 9 ni en el 16, y nuestro estudio se realizó en el día 3-4 postparto.

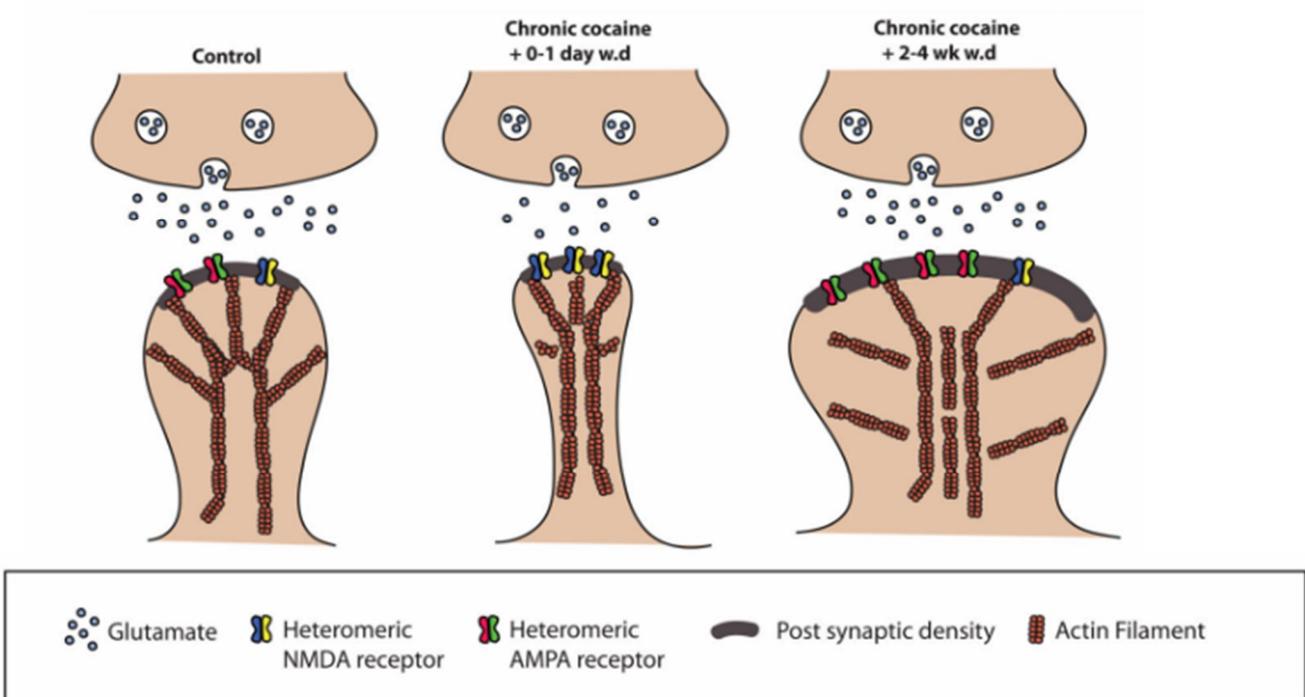


Figura 20. Modelo de los eventos de plasticidad sináptica relacionados a la adicción. La exposición crónica a cocaína induce una reorganización tiempo-dependiente de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA en las sinapsis de las neuronas mediales espinales del núcleo accumbens (NAc), así como cambios estructurales en sus espinas que están asociados a distintas formas de plasticidad sináptica. La administración crónica de cocaína resulta en la expresión de receptores NMDA, sinapsis silenciosas y depresión a largo plazo en la abstinencia temprana. Durante tiempos más prolongados de abstinencia, estos cambios se revierten dando lugar a un incremento en la expresión de receptores AMPA y a potenciación a largo plazo. Tomado y modificado de Russo et al. (2010).

El efecto de la droga sobre el comportamiento maternal fue notoriamente diferente en las hembras tratadas durante la adolescencia. En este caso, sufrieron profundos trastornos en su capacidad de agrupar a las crías en el nido, incluyendo un incremento en las

latencias del primer acarreo y de la reunión de la camada, mostraron un descenso en el número de lamidos y en el número de *hover overs* y permanecieron menos tiempo en contacto con las crías durante el curso de la prueba con respecto a su control salino correspondiente. Es interesante destacar que las hembras no mostraron una reducción en el número de acarreos, lo que podría sugerir que los déficits se relacionaron principalmente a aspectos cognitivos de este comportamiento más que a una pérdida de interés por las crías o a una incapacidad motora para ejecutar los distintos componentes de esta conducta.

En referencia a la secuencia del comportamiento de acarreo, a las hembras tratadas con salina en la adolescencia les tomó entre 30 y 100 segundos recoger a la primera cría y depositarla nuevamente en el nido y, en concordancia con la secuencia típica de la respuesta maternal, una vez que realizaron el primer acarreo, se produjeron sucesiva y rápidamente los siguientes acarreos hasta alcanzar la reunión de la camada entera. Es por ello que el intervalo de tiempo entre cada acarreo fue corto, siendo inusual que las hembras mostraran otros comportamientos -a excepción del olfateo a las crías o *mouthing*-. Recién cuando todas las crías estuvieron en el nido, las hembras comenzaron a mostrar comportamientos exploratorios y auto-acicalamientos (observación del experimentador). La diferencia cercana a la significancia estadística observada en la suma de comportamientos exploratorios y auto-acicalamientos entre las hembras de ambos grupos tratadas con vehículo podría estar reflejando un efecto de la edad en la expresión de estos comportamientos. Pese a que al momento de la evaluación maternal las hembras ADO_{SALINA} se encontraban entre P66 y P71, es probable que el cerebro aún no hubiese alcanzado el estado de madurez adulto. En efecto, en el estudio de micro-PET se evidenció un efecto de la edad en el metabolismo de la COF que podría estar vinculado con el elevado número de comportamientos exploratorios y de búsqueda de novedad observado en las hembras ADO_{SALINA}, cuyos mayores niveles son característicos del período adolescente (117) (ver sección 5.5).

En contraparte, el repertorio comportamental de las hembras expuestas a la droga durante la adolescencia fue totalmente atípico y carente de secuencia en comparación a las tratadas con salina, a pesar de que mostraron todos los componentes de la conducta maternal. Así, las hembras tratadas con cocaína mostraron un incremento en la latencia del acarreo de la primera cría. Más aún, en aquellas hembras que depositaron la primera cría en el nido, las subsecuentes y típicas aproximaciones a las crías que se dieron una vez

comenzada la secuencia rara vez fueron acompañadas de acarreo inmediatos. Estas hembras mostraron un elevado número de olfateos al ambiente, *rearings* y acicalamientos entre cada acarreo (observación del experimentador), lo cual podría explicar el aumento del tiempo de los intervalos entre acarreo y la interferencia en la correcta ejecución y secuenciación del patrón típico del comportamiento maternal. La desorganización del comportamiento de acarreo determinó la observación más significativa de nuestro estudio: tan solo cuatro de las diez hembras tratadas con cocaína durante la adolescencia lograron reunir a la camada de crías en el nido durante el curso de la prueba de treinta minutos. Ello derivó en la afectación de los posteriores comportamientos de contacto.

Considerando que: (i) las hembras ejecutaron todos los comportamientos maternales en un número que no se diferenció de las tratadas cuando adultas, (ii) que la distorsión documentada se relaciona con la correcta ejecución de la secuencia del comportamiento maternal, y (iii) que en el estudio PET la actividad metabólica de la CPFm de estas hembras mostró una respuesta diferente al tratamiento en comparación a la exhibida por aquellas tratadas cuando adultas, una interpretación posible es que el efecto de la droga durante este período sensible haya afectado la trayectoria del desarrollo de regiones relacionadas al control de procesos cognitivos que participan en el procesamiento de los estímulos provenientes tanto de las crías como del ambiente (144, 145, 177, 178), mientras que otros aspectos relacionados al comportamiento maternal se hayan preservado.

De forma interesante, los resultados comportamentales que obtuvimos, en particular la distorsión en el comportamiento de acarreo de las crías, concuerdan con observaciones realizadas en el comportamiento maternal de ratas con lesiones en la CPFm. Hace unos años, el equipo de Fleming mostró que lesiones excitotóxicas de la CPFm alteran particularmente la ejecución y secuenciación del comportamiento de acarreo y reducen el número de los lamidos (77). Debe notarse que al lesionar la CPFm, Afonso et al. (2007) encontraron una correlación entre la desorganización de la secuencia del comportamiento de acarreo y una disminución en la respuesta de las hembras en la prueba de PPI (por sus siglas en inglés: *Prepulse inhibition*). El paradigma de PPI es comúnmente utilizado para evaluar el filtrado sensoriomotor y los procesos atencionales involucrados en el procesamiento selectivo de la información. Así, en su trabajo sugieren que una forma en la cual la lesión de la CPFm podría haber afectado el comportamiento maternal es a través de la alteración de su capacidad de filtrar estímulos irrelevantes, que explicaría el incremento en la expresión de comportamientos atípicos durante la ejecución normal del patrón de

acarreo. Por su parte, Febo y sus colaboradores (2010) también reportaron que la inactivación o inhibición de la CPFm altera de forma significativa el comportamiento de acarreo de las crías. En este estudio, la inactivación de la CPFm, mediante la administración de tetrodotoxina, abolió el comportamiento de acarreo, al punto que tan solo una de trece hembras evaluadas acarreo a las crías. Incluso, y de modo similar a lo observado en nuestro estudio, las hembras exhibieron el resto de los comportamientos maternos (78).

Por otra parte, es de interés también mencionar otro modelo que contempla las consecuencias a largo plazo, en el comportamiento materno y en aspectos cognitivos, de la disrupción de la CPF en etapas tempranas de la vida. En la última década, Fleming y sus colaboradores (79, 80) demostraron que las experiencias tempranas de separación de la madre y la cría artificial de los hijos afectan el desarrollo de circuitos que participan en la regulación de la conducta materno generando consecuencias en el comportamiento que persisten en etapas avanzadas de la vida. En las evaluaciones del comportamiento materno durante la etapa adulta, si bien estas hembras mostraban todo el repertorio de respuestas maternos, tendían a exhibir conductas erráticas y a distraerse con estímulos del ambiente durante la ejecución de los acarreos, lamían menos a sus crías y pasaban menor tiempo en contacto con ellas (79, 80). En la búsqueda de las causas que pudiesen explicar las alteraciones del comportamiento materno, inicialmente descartaron un posible rol hormonal para luego centrarse en la exploración de funciones cognitivas. Primero mostraron que las hembras criadas artificialmente exhibían una menor calificación en la prueba PPI (79). Después documentaron que estas hembras presentaban déficits atencionales mediante la utilización del ASST (por sus siglas en inglés: *attentional set shifting task*), en el cual se evalúa la capacidad de los animales de cambiar el foco atencional de estímulos relevantes a irrelevantes (79). Finalmente evidenciaron mayores niveles de impulsividad mediante el test DRL (por sus siglas en inglés: *differential reinforcement of low-rate schedule*) (80). Estos cambios en la función cognitiva de las hembras que han sufrido privación materno temprana se reflejan en el comportamiento materno, durante el cual las hembras se ven atraídas por estímulos irrelevantes del ambiente y actúan de forma impulsiva hacia ellos, desatendiendo el cuidado de los hijos. Estos autores sostienen que uno de los principales mecanismos que subyace a los cambios comportamentales de estas hembras es la disfunción en el proceso de maduración del sistema DAérgico, que afectaría a su vez el normal desarrollo de la CPF (79, 80).

En nuestro estudio, conforme la cocaína indujo sensibilización en las hembras tratadas durante la adolescencia, es presumible que la sobreactivación repetida de la vía DAérgica mesocortical -aún en etapa de desarrollo- haya desencadenado eventos neuroplásticos en circuitos que integran regiones de la CPFm, afectando la coordinación de la ejecución secuencial del comportamiento de acarreo (70, 71, 179). En efecto, el uso crónico de cocaína ha sido asociado con déficits en la función DAérgica de la CPF (97), y la sensibilización comportamental inducida por la cocaína en roedores ha sido asociada con una atenuación de las concentraciones extracelulares de DA en la CPFm (174) y con la aparición de alteraciones a nivel cognitivo (163, 180, 181).

No debe descartarse que la cocaína haya afectado otros sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico o el noradrenérgico (182-184). Por ejemplo, se ha documentado que la administración crónica de cocaína provoca alteraciones regionales específicas en la captación de 5-HT y NA (183, 185), así como un descenso del volumen de 5-HT en la corteza frontal (186). Si bien por un lado la evidencia disponible permite trazar un vínculo todavía frágil y poco específico entre la función del sistema serotoninérgico y el comportamiento maternal (142, 187, 188) que obstaculiza el análisis de nuestros resultados, por otro, el descenso en la actividad de la función serotoninérgica ha sido asociado con la expresión de comportamientos impulsivos (186, 189-191), hecho que podría haber contribuido con las fallas observadas en la secuencia del acarreo de las crías.

Debe señalarse que la CPF continúa exhibiendo un refinamiento tardío en su funcionalidad durante la adolescencia caracterizado por un descenso en su volumen (192), así como por un incremento en su conectividad con regiones subcorticales, que resulta clave para el perfeccionamiento de los procesos atencionales, de inhibición de respuestas, y otras funciones cognitivas avanzadas, tanto en humanos como en roedores (121, 125, 193). Los procesos que subyacen a la remodelación del cerebro ponen de manifiesto que las trayectorias de desarrollo de los mecanismos prefrontales de control cognitivo son extremadamente delicadas y complejas, exponiendo a los animales adolescentes a una mayor vulnerabilidad frente a agentes perturbadores tales como las drogas de abuso. Más aún, la función de la CPF está determinada por la interacción de neuronas de distinto tipo y por la modulación que distintas aferencias ejercen sobre ellas. Las neuronas piramidales constituyen la primera salida de la CPF, siendo su disparo regulado por interneuronas inhibitorias y por proyecciones excitatorias de otras células piramidales. Se ha establecido que un apropiado balance excitatorio-inhibitorio es necesario para la correcta expresión

de los procesos prefrontocorticales (194); balance que se perfecciona durante la adolescencia, donde los eventos de *pruning* sináptico guían el refinamiento de la conectividad cortical (144). De relevancia para nuestro trabajo, uno de los neuromoduladores en el control fisiológico del ajuste de los disparos de las sinapsis excitatorias e inhibitorias es la DA (194). La DA juega un rol crítico en el control cognitivo y la comprensión de su efecto modulador resulta en extremo compleja. Se ha sugerido que la relación entre la DA y la performance cognitiva no es lineal, sino que adopta una forma de U-invertida, determinando que tanto niveles insuficientes o excesivos desencadenen déficits (195).

Se ha observado que la administración crónica de cocaína en roedores ocasiona anomalías y malformaciones en las dendritas de neuronas piramidales de la capa V de la CPF, que pueden persistir al menos hasta 25 días de discontinuado el tratamiento, modificando la interacción entre la neurotransmisión DAérgica y glutamatérgica en los circuitos prefrontales provocando su disfunción (196, 197). Aunque en nuestro trabajo no probamos una conexión directa entre la emergencia de déficits en la función cognitiva durante el desarrollo y las alteraciones en el comportamiento maternal, a partir de la desorganización de la secuencia del comportamiento de acarreo, observada en las hembras adultas expuestas a la droga durante la adolescencia, resulta razonable sugerir que la perturbación de las sinapsis DAérgicas ejercida por la cocaína en un sistema todavía inmaduro haya alterado el rango óptimo de excitación-inhibición necesario para el correcto funcionamiento de la CPFm. De hecho, ya se ha visto que la cocaína genera modificaciones maladaptativas duraderas en la transmisión GABAérgica de la CPFm cuando es administrada durante la adolescencia (198).

Esta posibilidad además es apoyada por estudios que han documentado los efectos a largo plazo de la exposición a cocaína durante la adolescencia en la CPFm. Ha sido demostrado que la administración repetida de 10 o 20 mg/kg de cocaína a ratas macho en la preadolescencia (P26 a P33), y transcurrido un período de 10 días de abstinencia, provoca déficits en la memoria espacial y en la memoria a largo plazo (199). De modo similar, ratas macho tratadas con diferentes dosis de cocaína (5 a 15 mg/kg) desde P35 a P46 y habiendo transitado un período de 10 o 24 días libres de droga, muestran fallas en el procesamiento atencional (200). Incluso, en una afirmación más radical, es posible que la acción de la cocaína en el medio sináptico en momentos de intensa reorganización del sistema haya redireccionado la trayectoria normal del desarrollo de la CPFm. Esta

alternativa se sostiene por los estudios de Susan Andersen, quien ha propuesto que los sistemas inmaduros no reaccionan a las perturbaciones del entorno mediante mecanismos compensatorios, sino que lo hacen a través de la incorporación de los cambios en la estructura y función cerebral (144).

La remodelación y recableado del circuito mesocorticolímbico durante el desarrollo parece posicionarse, cada vez más, como un proceso trascendental en el alcance del patrón de conectividad maduro que sustentará la expresión normal de las funciones cognitivas superiores y la coordinación de los comportamientos motivados y afectivos. Nuestros resultados se suman al conjunto de evidencia previa, reforzando la idea de que la acción de la cocaína durante la adolescencia es capaz de afectar el neurodesarrollo y los procesos cognitivos que durante la maternidad sustentan la capacidad de la madre de percibir e interpretar el significado de los estímulos provenientes de las crías, y de responder a esas señales de forma adecuada.

5.3 Efecto de la exposición a cocaína sobre la agresión maternal

En nuestro trabajo no observamos diferencias significativas en la agresión maternal de los grupos tratados con cocaína en relación a sus correspondientes controles salinos. No obstante, debe señalarse que la suma de los comportamientos agresivos fue significativamente mayor en las hembras tratadas con la droga durante la adolescencia respecto a las tratadas cuando adultas. Aunque este resultado debe tomarse con cautela, puesto que los grupos experimentales no difirieron significativamente de sus controles, resulta interesante vincular estas observaciones con los resultados obtenidos en la prueba de ansiedad experimental. En efecto, los mayores niveles de agresión de las hembras expuestas a la cocaína durante la adolescencia fueron acompañados por una reducción de la ansiedad (ver en apartado 5.4), mientras que en las hembras tratadas durante la etapa adulta se observó el patrón inverso. Esta relación va en línea con la hipótesis propuesta por Hansen (26) acerca de la relación inversa entre la ansiedad y la agresión en la lactancia (aunque existen controversias; ver (27)).

5.4 Efecto de la exposición crónica a cocaína sobre la ansiedad

La ansiedad experimental fue evaluada en el laberinto elevado en cruz, un modelo validado que se nutre del conflicto entre la tendencia innata de la rata a explorar áreas novedosas y de su aversión a las alturas y los espacios abiertos (201). La exposición crónica a cocaína previa a la gestación indujo efectos a largo plazo en el perfil de la ansiedad de ambos grupos tratados. Sorpresivamente, mientras que las hembras tratadas con cocaína durante la etapa adulta mostraron una respuesta ansiogénica, las hembras tratadas durante la adolescencia experimentaron una respuesta ansiolítica. Este efecto diferencial observado en los dos grupos de hembras tratadas pone de manifiesto la relevancia de la etapa del desarrollo en la cual se administró la droga en las consecuencias sobre la ansiedad comportamental a largo plazo.

En primer término, es fundamental destacar la ausencia de diferencias significativas en el número total de cruzamientos entre los grupos tratados y sus respectivos controles salinos, que permite descartar que las diferencias observadas en nuestro estudio se deban a un incremento en la actividad locomotora de los animales. El laberinto elevado en cruz es un modelo comportamental en el cual un aumento en la locomoción puede repercutir en la exploración del modelo y generar falsos positivos, y esta posibilidad debe considerarse especialmente cuando se trabaja con una droga psicoestimulante que induce hiperlocomoción.

En relación a las hembras expuestas a cocaína durante la etapa adulta, la respuesta observada es consistente con numerosos reportes preclínicos que han documentado las propiedades ansiogénicas en este período, cuando la droga es administrada en forma aguda (89) o crónica (90, 91). Incluso concuerda con trabajos que han evaluado los niveles de ansiedad posteriores a la exposición a cocaína, tanto en etapas tempranas (202) como prolongadas de abstinencia (203). Se ha especulado con que el incremento en el nivel basal del factor liberador de corticotropina (CRF, del inglés *corticotropin releasing factor*) en la AMY está estrechamente asociado al estado de elevada ansiedad que se observa en la abstinencia a cocaína en ratas adultas (204). También se ha sugerido que la desregulación del sistema noradrenérgico causada por la exposición crónica a cocaína podría contribuir en la ansiogénesis. Asimismo, aunque el rol de la DA en la modulación de la ansiedad durante la abstinencia aún no ha sido esclarecido, hay evidencia que relaciona la reducción de la función DAérgica con la ansiedad (204).

Por su parte, el mayor porcentaje de tiempo que las hembras tratadas con la droga durante la adolescencia pasaron en los brazos abiertos es generalmente aceptado como un indicador válido de una reducción en la ansiedad (19). El hecho de que estas hembras hayan exhibido una respuesta ansiolítica en comparación a su respectivo control salino, habiendo transcurrido más de cuatro semanas de abstinencia, insinúa la ocurrencia de neuroadaptaciones duraderas en circuitos que participan en la modulación de la ansiedad.

Debe notarse que este descenso en el nivel de ansiedad se documentó durante el postparto, período en el cual la hembra experimenta una disminución natural de la ansiedad y del miedo (25). Este cambio en el estado afectivo de la hembra, observado en varios modelos animales de miedo y ansiedad, permite a la hembra continuar cuidando a sus crías en situaciones de riesgo y asumir formas más ofensivas de defensa de los hijos (22, 27). Además, el desarrollo de la conducta maternal en hembras postparturientas y en hembras sensibilizadas podría asociarse a una pérdida del miedo o aversión a olores de las crías promoviendo el contacto con las crías y el desarrollo de la motivación maternal (15, 205). Dado que en nuestro estudio el comportamiento maternal se observó en la caja nido, en ausencia de cualquier evento estresante, y que la conducta ya estaba instalada en el momento de la prueba (día 3-4 posparto), no podemos hacer una asociación entre la reducción de la ansiedad y estos posibles efectos positivos en el comportamiento maternal de las ratas que recibieron cocaína en la adolescencia.

Otros reportes sugieren, sin embargo, que ratas seleccionadas por sus niveles de ansiedad bajos muestran déficits la respuesta maternal (206-208). El grupo de Oliver Bosch ha ideado un modelo animal genético para estudiar diferencias en la emocionalidad innata, desarrollando líneas de animales con mayores (HAB, del inglés *high anxiety-related behavior*) y menores (LHB, del inglés *low anxiety-related behavior*) niveles de ansiedad. En distintos trabajos han documentado que las hembras pertenecientes a la línea HAB expresan más comportamientos maternales que las hembras de la línea LHB (207-210). Si bien cabe la posibilidad de que los déficits en el comportamiento maternal de las ratas que recibieron cocaína en la adolescencia puedan deberse a los bajos niveles de ansiedad, esta relación debe tomarse con medida, dado que nuestros resultados muestran fundamentalmente déficits en la secuencia del acarreo de las crías, fenómeno que no ha sido reportado en los trabajos de Bosch y colaboradores.

En otro orden, en la literatura se puede observar un interés reciente sobre los efectos a largo plazo de la cocaína en el cerebro adolescente y sus consecuencias en el

comportamiento ansioso. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son similares a los obtenidos por Sullivan y sus colegas (211), quienes encontraron que la administración de cocaína entre P35 y P46 decrece significativamente los niveles de ansiedad en P70. Estos cambios también fueron acompañados por modificaciones en la expresión génica y en la expresión de proteínas sinápticas en la AMY, a lo cual los autores apuntan como una reorganización de la estructura sináptica y dendrítica inducida por la cocaína, en parte responsable de los efectos a largo plazo observados. La AMY forma un circuito con la CPF y el hipocampo que es responsable de la discriminación entre estímulos peligrosos e inofensivos (211).

De manera interesante, la mayoría de los estudios que han investigado el efecto de lesiones en la CPFm en el laberinto elevado en cruz han encontrado efectos ansiolíticos (212-216). Este hecho, junto a nuestras observaciones en el laberinto elevado en cruz, sustentan la posibilidad de que la exposición a la cocaína durante la fase final crítica del desarrollo cerebral adolescente haya desencadenado modificaciones maladaptativas y persistentes en la CPFm, afectando mecanismos neurales prefrontosubcorticales que median los comportamientos relacionados a la ansiedad y al miedo.

Otra alternativa es que la respuesta observada en las hembras tratadas durante la adolescencia se deba a la presencia de dificultades en la integración de información sensorial, reflejando fallas en la evaluación de riesgos y un incremento de la conducta exploratoria e impulsiva. De hecho se ha especulado con la existencia de una relación entre los comportamientos relacionados a la ansiedad y la conducta exploratoria e impulsiva (217), y hay evidencia de que ésta también es indicada por el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (217). Otro indicador que se relaciona con la conducta exploratoria e impulsiva es el número de *head dipping* en los brazos abiertos (217). De modo llamativo, pese a que las hembras tratadas con cocaína durante la adolescencia pasaron más tiempo en los brazos abiertos en relación a su control, sugiriendo mayores niveles de impulsividad, no se documentó una diferencia significativa en el número de *head dipping* entre estos grupos.

Por último, debe mencionarse que nuestros hallazgos se incorporan a un conjunto de resultados conflictivos con otros reportes, lo cual puede deberse a los diferentes protocolos de administración de la droga utilizados o al tiempo de abstinencia transcurrido hasta el día en el cual se llevó a cabo la prueba comportamental (218-220).

5.5 Efecto de la administración de cocaína en el metabolismo cerebral de la glucosa mediante micro-PET

Nuestro trabajo es el primero en determinar las consecuencias a largo plazo de la exposición crónica a cocaína durante la adolescencia y la adultez en la TMCr mediante el uso de micro-PET con [¹⁸F]-FDG.

La tendencia al hipermetabolismo en la CPFm observada en el grupo de hembras expuesto a cocaína durante la etapa adulta en comparación a su grupo control es consistente con reportes previos que han evaluado cambios en la TMC durante la abstinencia. Aunque el rol de la DA en el control del metabolismo de la glucosa es aún poco entendido, existe evidencia de que el hipermetabolismo en regiones frontales observado en usuarios de cocaína en la etapa temprana de desintoxicación es una respuesta típicamente compensatoria, que conforme a distintos trabajos que apoyan el rol inhibitorio de la DA en la CPFm (221-223), guarda relación con un descenso en la actividad DAérgica (224, 225). Si bien en humanos el hipermetabolismo suele descender entre las 2 y 4 semanas posteriores al abandono del consumo, la persistencia durante la abstinencia prolongada en nuestro estudio se encuentra en línea con el resultado de Febo y sus colegas (2007), quienes documentaron un descenso en la concentración basal extracelular de DA en la CPFm de hembras tratadas con cocaína pregestacionalmente durante la adultez, luego de haber utilizado el esquema de administración en el cual se basa nuestro trabajo y dando lugar al mismo período de abstinencia (1). La CPFm se proyecta hacia estructuras como el APOM, NAc y ATV y juega un rol importante en la modulación de la motivación maternal (74, 75, 179). Así, el hipermetabolismo prefrontal apoya la posibilidad de que la acción de la cocaína haya desencadenado eventos neuroplásticos en estructuras límbicas que puedan estar afectando aspectos de la motivación maternal susceptibles de explicar el descenso en el número de lamidos observado en las hembras tratadas durante la etapa adulta. Además, conforme se ha hipotetizado con que el descenso de la actividad DAérgica en la CPF se encuentra ligado al incremento de la ansiedad (204), el hipermetabolismo guardaría relación con la respuesta ansiogénica observada en las hembras adultas.

De forma llamativa, no se encontraron diferencias significativas en la TMC de la CPFm ni de otras estructuras que integran el sistema mesocorticolímbico entre el grupo de hembras expuestas pregestacionalmente a cocaína durante la adolescencia y su respectivo control salino. No obstante, de la ausencia de cambios en el metabolismo cerebral basal

de la CPFm no debe desprenderse que no hayan ocurrido trastornos en su función. Existe evidencia acumulada de que el circuito mesocorticolímbico es particularmente sensible a los cambios del sistema DAérgico durante la adolescencia, y en consecuencia muy vulnerable a los efectos disruptivos de la exposición crónica a cocaína (117, 127, 193). En esta línea, la tendencia observada del efecto del tratamiento en el metabolismo talámico, sugiere una posible afectación de los circuitos prefrontosubcorticales en ambos grupos tratados (99). Conforme la cocaína indujo sensibilización comportamental en las hembras lactantes expuestas durante la adolescencia, y se documentaron efectos severos tanto en el comportamiento maternal como ansioso que guardan estrecha similitud con aquellos observados en hembras con lesiones de la CPFm (77, 78, 212-216), consideramos la posibilidad de que las alteraciones funcionales puedan no estar viéndose reflejadas en cambios de la TMC de esta región.

Si bien esta alternativa puede resultar *a priori* intrincada, la ausencia de diferencias respecto al grupo control en la actividad metabólica de la CPFm, que se documentó luego de la administración repetida de cocaína, es un hallazgo de por sí relevante. La elevada plasticidad del cerebro adolescente y su hipotética condición de ser susceptible de incorporar la información del ambiente a su fisiología en las ventanas sensibles del neurodesarrollo (144), le podrían otorgar la flexibilidad de adaptarse a las nuevas condiciones de sobreactivación de las vías DAérgicas durante el tratamiento, sin que ello necesariamente acarree cambios en el metabolismo global de la glucosa, en una forma que escapa a la respuesta compensatoria habitualmente observada en el cerebro maduro, y que aún está lejos de ser caracterizada y comprendida en su complejidad. Es desde esta perspectiva que los eventos de plasticidad que persisten hasta la adultez se podrían configurar como cambios maladaptativos.

Por otra parte, debe valorarse que la ausencia de diferencias entre el grupo tratado y el control en las hembras adolescentes se deba a una limitación de la técnica. Es posible que estudios de microdiálisis, capaces de monitorizar la actividad DAérgica *in vivo* durante la evaluación del comportamiento maternal, permitan detectar cambios en áreas del circuito mesocorticolímbico. En esta línea, considerando que el descenso en la disponibilidad de receptores D2 en el estriado es un fiel indicador de la disfunción del sistema DAérgico, sería de interés realizar una medición *in vivo* de la unión de [¹¹C]-raclopride, un antagonista selectivo de los receptores D2, en el estriado mediante micro-PET.

La diferencia significativa en la TMC de la CPFm entre los grupos expuestos a cocaína en distintas etapas del desarrollo también constituyó un hallazgo importante. Este resultado permite suponer la ocurrencia de un perfil diferente de neuroadaptaciones en el circuito mesocorticolímbico, apoyando la posibilidad de que las hembras tratadas durante la adolescencia hayan sufrido un desvío en la trayectoria normal del neurodesarrollo.

Por su parte, la menor TMC en la COF de las tratadas durante la etapa adolescente en comparación a las tratadas cuando adultas, independientemente al tratamiento con cocaína o vehículo, podría explicar el elevado número de conductas exploratorias que mostraron las hembras ADO_{SALINA} en la evaluación de la conducta maternal (sección 5.2). Las ratas adolescentes exhiben mayores niveles de búsqueda de novedades e impulsividad y presentan preferencia por las recompensas inmediatas en comparación a las adultas (226), comportamientos en los cuales la COF ha mostrado jugar un rol modulador (227).

6 LIMITACIONES

Debe atenderse que la administración sistémica de la cocaína impide determinar con exactitud qué regiones del cerebro se vieron afectadas y mediaron las alteraciones en el comportamiento y en la función cerebral observadas como consecuencia del tratamiento. De manera que la lectura de las interpretaciones vertidas en la presente tesis debe realizarse a la luz de esta limitante.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que si bien el efecto reforzador de la cocaína y el proceso de desarrollo de dependencia han sido asociados particularmente a su acción en la neurotransmisión DAérgica (97, 103, 104, 154), la cocaína es una droga inespecífica que también actúa en otros sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico (105) y el noradrenérgico (103), y que además posee propiedades anestésicas mediadas por su capacidad de bloquear los canales de sodio. Más allá de que los efectos de su administración crónica en los transportadores de 5-HT y NA han recibido menor atención que los efectos en los DATs, los efectos a largo plazo observados en los animales expuestos a la droga posiblemente también tengan raíz en la alteración de mecanismos no descritos y que están fuera del alcance de este estudio.

Un punto a considerar en la discusión de los resultados obtenidos mediante micro-PET es que dada la necesidad de mantener al animal inmóvil dentro de la cámara, la técnica demanda la administración de anestesia. Pese a ser escasos los estudios que han evaluado los posibles efectos de la administración de anestésicos en el metabolismo cerebral, y que

aún no existen fundamentos sólidos que permitan juzgar la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante micro-PET, sí existe evidencia de que anestésicos generales, incluyendo el isoflurano, el propofol o la ketamina reducen el metabolismo cerebral (228). Es así que en el caso de los estudios de micro-PET que buscan evaluar la TMCr mediante el uso de [¹⁸F]-FDG, el estado de la actividad cerebral del animal anestesiado se toma habitualmente como la línea de base farmacológica sobre la cual se miden potenciales cambios en la actividad metabólica (228). Si bien podríamos señalar que en nuestro estudio el hipotético efecto de la administración de isoflurano se distribuyó en todos los grupos, éste debe ser considerado a la hora de realizar comparaciones con estudios PET en humanos, ya que generalmente se realizan sin anestesia.

7 PERSPECTIVAS

Existe un conjunto de experimentos que podrían ser realizados en aras de disminuir la brecha especulativa que tensiona la interpretación de los resultados.

La relación entre la DA y el desempeño cognitivo encierra una gran complejidad. La evidencia sugiere que la transmisión DAérgica ocurre dentro de una pequeña ventana de funcionamiento óptimo, donde tanto niveles excesivos o deficientes de DA afectan el desempeño comportamental (194, 195). De manera que la posibilidad de llevar adelante experimentos de microdiálisis para determinar la existencia de desvíos en la concentración extracelular basal y normal de DA en la CPFm de hembras lactantes tratadas con cocaína durante la adolescencia, se posiciona como un camino atractivo y necesario. En esta línea, también se podrían dirigir esfuerzos a identificar el curso temporal y la persistencia de las neuroadaptaciones a distintos tiempos de abstinencia que emergen como consecuencia de la administración de la droga. Particularmente, sería prioritario analizar la expresión de receptores DAérgicos en distintas regiones del circuito mesocorticolímbico, así como posibles eventos plásticos en las sinapsis glutamatérgicas.

Otra de las rutas a tomar para afirmar o desestimar las proposiciones aquí planteadas comprende la realización de pruebas cognitivas durante la maternidad de animales tratados cuando adolescentes dirigidas a evaluar el estado de los procesos atencionales, la memoria de trabajo y la expresión de comportamientos impulsivos. Paradigmas como el PPI, ASST y DRL mencionados anteriormente permitirían acceder a información relevante. Además, en aras de vincular posibles déficits en la cognición con fallas en el

comportamiento maternal, estas pruebas podrían ser acompañadas por un análisis secuencial del comportamiento de acarreo.

En último término, se prevé la realización del análisis estadístico de las imágenes obtenidas mediante micro-PET utilizando el software *Statistical Parametric Mapping* (SPM) de cara a la publicación de nuestro trabajo en una revista especializada. SPM es un software que permite la construcción y evaluación de análisis estadísticos extendidos al espacio para testear hipótesis vóxel a vóxel en neuroimagen con PET. Este método de análisis permitirá hilar más fino en la identificación de asimetrías en la TMCr.

8 CONCLUSIONES

En la presente tesis buscamos determinar los efectos a largo plazo en el comportamiento maternal, agresión maternal, ansiedad experimental y en la función cerebral de hembras lactantes adultas ocasionados por la exposición crónica a cocaína durante la adolescencia y la adultez. Los experimentos realizados nos permiten concluir que:

- Las hembras adolescentes mostraron mayor sensibilidad a la cocaína en comparación a las adultas, aunque ambos grupos desarrollaron sensibilización comportamental en respuesta al tratamiento.
- La exposición crónica a cocaína durante la adolescencia y previo a la gestación generó déficits en la respuesta maternal evaluada en la etapa adulta. Las alteraciones documentadas fueron notoriamente más severas con respecto a las observadas en hembras lactantes expuestas a la droga durante la adultez.
- El tratamiento con cocaína no provocó cambios significativos en la agresión maternal de los grupos tratados en relación a sus respectivos controles salinos.
- La administración de cocaína durante la adolescencia tuvo un efecto ansiolítico en las hembras durante la etapa adulta, a diferencia del efecto ansiogénico que generó cuando fue administrada repetidamente durante la etapa adulta.
- Las hembras que recibieron cocaína en la etapa adulta mostraron una tendencia al incremento de la TMC de la CPFm, fenómeno que no se evidenció en las hembras tratadas durante el período adolescente. Además, se observó una respuesta diferencial en la TMC de la CPFm entre los grupos expuestos a la droga.

Las diferencias en las respuestas comportamentales y metabolismo cerebral documentadas en ratas expuestas a cocaína durante la adolescencia y adultez estuvieron presentes a más de 33-40 días de haber finalizado el tratamiento, sugiriendo la ocurrencia de neuroadaptaciones duraderas.

En conjunto estos resultados indican que los efectos de la droga en la respuesta maternal, ansiedad y en la función cerebral difieren de acuerdo a la etapa del desarrollo en que se administra, y se integran a un cúmulo de hallazgos que sostienen que la exposición repetida a cocaína tanto en hembras adolescentes como adultas tiene efectos a largo plazo (1, 2, 7, 83, 211).

Aunque la relación entre la exposición a drogas en etapas tempranas de la vida y la posterior emergencia de trastornos en la función cerebral y en el comportamiento está lejos de ser entendida, se ha sugerido que durante el tránsito de etapas sensibles del neurodesarrollo los animales son capaces de incorporar los cambios neurobiológicos que agentes perturbadores desencadenan en forma de modificaciones maladaptativas duraderas en la estructura y función cerebral (144). A pesar de que los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis no posibilitan la identificación de los mecanismos neurobiológicos específicos que podrían estar viéndose alterados por el tratamiento con cocaína, podría especularse con que las asimetrías en las alteraciones observadas en la respuesta maternal, ansiedad y metabolismo cerebral de la CPFm de hembras tratadas durante la adultez y adolescencia serían resultado de una respuesta diferencial a la droga en ambos grupos. De acuerdo al estado de madurez del sistema mesocorticolímbico al momento de la administración de la droga estimamos que la señalización DAérgica y eventualmente de otros sistemas de neurotransmisión, mediada por la cocaína en la etapa adolescente, podría haber afectado procesos del desarrollo que moldean la conectividad de este sistema.

9 COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

Congresos internacionales

- Annabel Ferreira, **Hernán Delgado**, Daniella Agrati, Cecilia Scorza. Cocaine treatment during adolescence reduces maternal behavior in the rat. Internacional Social Brain Conference. FENS. Copenhagen, Dinamarca, 2014.
- **Hernán Delgado**, Cecilia Scorza, Daniella Agrati, Luna Machado, Annabel Ferreira. Effects of pre-pregnancy chronic cocaine administration on the maternal behavior of adolescent and adult rats. Brazilian Symposium of Neuropsychopharmacology. Ribeirao Preto, Brasil, 2014.

Congresos nacionales

- Luna Machado, Daniella Agrati, **Hernán Delgado**, Cecilia Scorza, Annabel Ferreira. Motivación y comportamiento sexual de ratas hembras adolescentes y adultas. Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay, 2015.
- **Hernán Delgado**, Annabel Ferreira, Luna Machado, Daniella Agrati, Andrea Paolino, Laura Reyes, Patricia Oliver. Efectos comportamentales e imagenológicos de la exposición crónica a cocaína en el comportamiento maternal de la rata. XV Jornadas de la SUB. Uruguay, 2014.
- Luna Machado, **Hernán Delgado**, Daniella Agrati, Cecilia Scorza, Annabel Ferreira. Efecto de la administración crónica de cocaína en la motivación sexual de ratas adolescentes y adultas. XV Jornadas de la SUB. Uruguay, 2014.

10 FINANCIACIÓN

- Beca de maestría otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación.
- Proyecto CSIC iniciación a la investigación.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Febo M & Ferris C (2007) Development of cocaine sensitization before pregnancy affects subsequent maternal retrieval of pups and prefrontal cortical activity during nursing. *Neuroscience* 148(2):400-412.
2. Nephew B & Febo M (2010) Effect of cocaine sensitization prior to pregnancy on maternal care and aggression in the rat. *Psychopharmacology* 209(1):127-135.
3. Leckman JF & Mayes LC (1999) Preoccupations and behaviors associated with romantic and parental love. Perspectives on the origin of obsessive-compulsive disorder. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America* 8(3):635-665.
4. Mayes LC, Feldman R, Granger RH, Haynes OM, Bornstein MH, & Schottenfeld R (1997) The effects of polydrug use with and without cocaine on mother-infant interaction at 3 and 6 months. *Infant Behavior and Development* 20(4):489-502.
5. Johns J, Elliott DL, Hofler VE, Joyner PW, McMurray MS, Jarrett TM, Haslup AM, Middleton CL, Elliott JC, & Walker CH (2005) Cocaine treatment and prenatal environment interact to disrupt intergenerational maternal behavior in rats. *Behavioral neuroscience* 119(6):1605-1618.
6. Johns J, Nelson CJ, Meter KE, Lubin DA, Couch CD, Ayers A, & Walker CH (1998) Dose-dependent effects of multiple acute cocaine injections on maternal behavior and aggression in Sprague-Dawley rats. *Developmental neuroscience* 20(6):525-532.
7. Johns JM NL, Zimmerman LI, Li L, & Pedersen CA (1994) Effects of chronic and acute cocaine treatment on the onset of maternal behavior and aggression in Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience* 108(1):107-112.
8. Hawley TL, Halle TG, Drasin RE, & Thomas NG (1995) Children of addicted mothers: Effects of the "crack epidemic" on the caregiving environment and the development of preschoolers. *American Journal of Orthopsychiatry* 65(3):364.
9. Tyler R, Howard J, Espinosa M, & Doakes SS (1997) Placement with substance-abusing mothers vs. placement with other relatives: Infant outcomes. *Child abuse & neglect* 21(4):337-349.
10. Wasserman DR & Leventhal JM (1993) Maltreatment of children born to cocaine-dependent mothers. *American Journal of Diseases of Children* 147(12):1324-1328.
11. Burns K, Chethik L, Burns WJ, & Clark R (1991) Dyadic disturbances in cocaine-abusing mothers and their infants. *Journal of Clinical Psychology*.
12. Cash SJ & Wilke DJ (2003) An ecological model of maternal substance abuse and child neglect: issues, analyses, and recommendations. *The American journal of orthopsychiatry* 73(4):392-404.
13. Numan M, Fleming A, & Levy F (1994) Maternal behavior. *The physiology of reproduction* 2:221-302.
14. Newman SW (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior a node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877(1):242-257.
15. Numan M & Insel TR (2003) *The neurobiology of parental behavior* (Springer Science & Business Media).

16. Pereira M & Ferreira A (2015) Affective, Cognitive, and Motivational Processes of Maternal Care. *Perinatal Programming of Neurodevelopment*, (Springer), pp 199-217.
17. Erskine MS, Denenberg VH, & Goldman BD (1978) Aggression in the lactating rat: effects of intruder age and test arena. *Behavioral biology* 23(1):52-66.
18. Ferreira A & Hansen S (1986) Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology* 100(2):173.
19. Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, & Fernández-Guasti A (2002) Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology & behavior* 77(2-3):197-204.
20. Haney M, Debold JF, & Miczek KA (1989) Maternal aggression in mice and rats towards male and female conspecifics. *Aggressive Behavior* 15(6):443-453.
21. Hård E & Hansen S (1985) Reduced fearfulness in the lactating rat. *Physiology & behavior* 35(4):641-643.
22. Ferreira A, Hansen S, Nielsen M, Archer T, & Minor BG (1989) Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behavioral neuroscience* 103(1):193.
23. Lonstein JS (2005) Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Hormones and behavior* 47(3):241-255.
24. Pereira M, Uriarte N, Agrati D, Zuluaga MJ, & Ferreira A (2005) Motivational aspects of maternal anxiety in lactating rats. *Psychopharmacology* 180(2):241-248.
25. Fleming AS & Luebke C (1981) Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiology & behavior* 27(5):863-868.
26. Hansen S, Ferreira A, & Selart M (1985) Behavioural similarities between mother rats and benzodiazepine-treated non-maternal animals. *Psychopharmacology* 86(3):344-347.
27. Lonstein JS & Gammie SC (2002) Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26(8):869-888.
28. Olivier B, Mos J, & Van Oorschot R (1985) Maternal aggression in rats: effects of chlordiazepoxide and fluprazine. *Psychopharmacology* 86(1-2):68-76.
29. Pereira M & Ferreira A (2016) Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Hormones and behavior* 77:72-85.
30. Pereira M, Seip K, Morrell J, & Bridges R (2008) Maternal motivation and its neural substrate across the postpartum period. *Neurobiology of the Parental Brain*:39-60.
31. Pereira M & Ferreira A (2006) Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural brain research* 175(1):139-148.
32. Olazábal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, Lévy F, Lucion AB, Morrell JI, Numan M, & Uriarte N (2013) Flexibility and adaptation of the

neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 37(8):1875-1892.

33. Olazábal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, Lévy F, Lucion AB, Morrell JI, Numan M, & Uriarte N (2013) New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37(8):1860-1874.
34. Reisbick S, Rosenblatt JS, & Mayer AD (1975) Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 89(7):722.
35. Numan M, Rosenblatt JS, & Komisaruk BR (1977) Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91(1):146.
36. Numan M (1974) Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 87(4):746.
37. Numan M & Stolzenberg D (2009) Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in neuroendocrinology* 30(1):46-64.
38. Numan M (2012) Maternal behavior: Neural circuits, stimulus valence, and motivational processes. *Parenting* 12(2-3):105-114.
39. Arrati PG, Carmona C, Dominguez G, Beyer C, & Rosenblatt JS (2006) GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiology & behavior* 87(1):51-65.
40. Cohn J & Gerall AA (1989) Pre-and postpuberal medial preoptic area lesions and maternal behavior in the rat. *Physiology & behavior* 46(2):333-336.
41. Gray P & Brooks PJ (1984) Effect of lesion location within the medial preoptic-anterior hypothalamic continuum on maternal and male sexual behaviors in female rats. *Behavioral neuroscience* 98(4):703.
42. Numan M, Corodimas KP, Numan MJ, Factor EM, & Piers WD (1988) Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behavioral neuroscience* 102(3):381.
43. Fleming AS & Rosenblatt JS (1974) Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 86(5):957.
44. Pereira M & Morrell J (2009) The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behavioural brain research* 205(1):238-248.
45. Fleming AS, Corter C, Franks P, Surbey M, Schneider B, Steiner M (1993) Postpartum factors related to mother's attraction to newborn infant odors. *Developmental psychobiology* 26(2):115-132.
46. Lee A, Li M, Watchus J, & Fleming AS (1999) Neuroanatomical basis of maternal memory in postpartum rats: selective role for the nucleus accumbens. *Behavioral neuroscience* 113(3):523.
47. Swain JE, Lorberbaum JP, Kose S, & Strathearn L (2007) Brain basis of early parent-infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging

- studies. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 48(3-4):262-287.
48. Barrett J & Fleming AS (2011) Annual research review: All mothers are not created equal: Neural and psychobiological perspectives on mothering and the importance of individual differences. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 52(4):368-397.
 49. Atzil S, Hendler T, & Feldman R (2011) Specifying the neurobiological basis of human attachment: brain, hormones, and behavior in synchronous and intrusive mothers. *Neuropsychopharmacology* 36(13):2603-2615.
 50. Numan M & Numan M (1996) A lesion and neuroanatomical tract-tracing analysis of the role of the bed nucleus of the stria terminalis in retrieval behavior and other aspects of maternal responsiveness in rats. *Developmental psychobiology* 29(1):23-51.
 51. Bridges RS, Numan M, & Ronsheim PM (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proceedings of the ...*
 52. Bridges RS (2015) Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in neuroendocrinology* 36:178-196.
 53. Pedersen CA, Caldwell JD, Walker C, Ayers G, & Mason GA (1994) Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behavioral neuroscience* 108(6):1163.
 54. Mogenson GJ, Jones DL, & Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology* 14(2):69-97.
 55. Berridge KC (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & behavior* 81(2):179-209.
 56. Numan M (2007) Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental psychobiology* 49(1):12-21.
 57. Hansen S, Harthorn C, Wallin E, Löfberg L, & Svensson K (1991) The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in the ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 39(1):71-77.
 58. Stern JM & Keer SE (1999) Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. *Behavioural brain research* 99(2):231-239.
 59. Geisler S & Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *Journal of Comparative Neurology* 490(3):270-294.
 60. Seip KM & Morrell JI (2009) Transient inactivation of the ventral tegmental area selectively disrupts the expression of conditioned place preference for pup-but not cocaine-paired contexts. *Behavioral neuroscience* 123(6):1325.
 61. Numan M & Numan MJ (1997) Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 9(5):369-384.
 62. Numan M, Stolzenberg DS, Dellevigne AA, Correnti CM, & Numan MJ (2009) Temporary inactivation of ventral tegmental area neurons with either muscimol or

- baclofen reversibly disrupts maternal behavior in rats through different underlying mechanisms. *Behavioral neuroscience* 123(4):740.
63. De Almeida RMM, Ferreira A, & Agrati D (2014) Sensory, hormonal, and neural basis of maternal aggression in rodents. *Neuroscience of Aggression*, (Springer), pp 111-130.
 64. Hansen S (1989) Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. *Behavioral neuroscience* 103(5):1035.
 65. Ferreira A, Dahlöf L-G, & Hansen S (1987) Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behavioral neuroscience* 101(5):709.
 66. Factor EM, Mayer AD, & Rosenblatt JS (1993) Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behavioral neuroscience* 107(1):166.
 67. Hansen S & Ferreira A (1986) Effects of bicuculline infusions in the ventromedial hypothalamus and amygdaloid complex on food intake and affective behavior in mother rats. *Behavioral neuroscience* 100(3):410.
 68. Pereira M & Morrell JI (2011) Functional Mapping of the Neural Circuitry of Rat Maternal Motivation: Effects of Site-Specific Transient Neural Inactivation. *Journal of Neuroendocrinology* 23(11):1020-1035.
 69. Hansen S & Ferreira A (1986) Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behavioral neuroscience* 100(1):64.
 70. Beach Jr FA (1937) The neural basis of innate behavior. I. Effects of cortical lesions upon the maternal behavior pattern in the rat. *Journal of Comparative Psychology* 24(3):393.
 71. Stone CP (1938) Effects of cortical destruction on reproductive behavior and maze learning in albino rats. *Journal of Comparative Psychology* 26(2):217.
 72. Slotnick BM (1967) Disturbances of maternal behavior in the rat following lesions of the cingulate cortex. *Behaviour* 29(2):204-235.
 73. Slotnick BM & Nigrosh BJ (1975) Maternal behavior of mice with cingulate cortical, amygdala, or septal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 88(1):118.
 74. Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, & Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of comparative neurology* 492(2):145-177.
 75. Hoover WB & Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain structure & function* 212(2):149-179.
 76. Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, & Bandler R (2001) Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *The Journal of comparative neurology* 432(3):307-328.

77. Afonso VM, Sison M, Lovic V, & Fleming AS (2007) Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behavioral neuroscience* 121(3):515-526.
78. Febo M, Felix-Ortiz AC, & Johnson TR (2010) Inactivation or inhibition of neuronal activity in the medial prefrontal cortex largely reduces pup retrieval and grouping in maternal rats. *Brain research* 1325:77-88.
79. Lovic V & Fleming AS (2004) Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task--reversal of effects with maternal-like licking stimulation. *Behavioural brain research* 148(1-2):209-219.
80. Lovic V, Palombo DJ, & Fleming AS (2011) Impulsive rats are less maternal. *Developmental psychobiology* 53(1):13-22.
81. Johns J, Noonan L, Zimmerman L, Li L, & Pedersen C (1997) Effects of short-and long-term withdrawal from gestational cocaine treatment on maternal behavior and aggression in Sprague-Dawley rats. *Developmental neuroscience* 19(4):368-374.
82. Johns JM, Noonan LR, Zimmerman LI, McMillen BA, Means LW, Walker CH, Lubin DA, Meter KE, Nelson CJ, Pedersen CA, Mason GA, Lauder JM (1998) Chronic Cocaine Treatment Alters Social/Aggressive Behavior in Sprague-Dawley Rat Dams and in Their Prenatally Exposed Offspring. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
83. Kinsley C, Turco D, Bauer A, Beverly M, Wellman J, Graham AL (1994) Cocaine alters the onset and maintenance of maternal behavior in lactating rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 47(4):857-864.
84. Zimmerberg B & Gray M (1992) The effects of cocaine on maternal behaviors in the rat. *Physiology & behavior*.
85. Vernotica EM RJ, Morrell JI (1999) Microinfusion of cocaine into the medial preoptic area or nucleus accumbens transiently impairs maternal behavior in the rat. *Behavioral Neuroscience* 113(2):377-390.
86. Vernotica EM, Lisciotto CA, Rosenblatt JS, & Morrell JI (1996) Cocaine transiently impairs maternal behavior in the rat. *Behavioral Neuroscience* 110(2):315-323.
87. Heyser CJ, Molina VA, & Spear LP (1992) A fostering study of the effects of prenatal cocaine exposure: I. Maternal behaviors. *Neurotoxicology and teratology* 14(6):415-421.
88. Quiñones-Jenab V, Batel P, Schlussman S, Ho A, & Kreek M (1997) Cocaine impairs maternal nest building in pregnant rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 58(4):1009-1013.
89. Rogerio R & Takahashi RN (1992) Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43(2):631-633.
90. Yang XM, Gorman AL, Dunn AJ, & Goeders NE (1992) Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 41(3):643-650.
91. Hayase T, Yamamoto Y, & Yamamoto K (2005) Persistent anxiogenic effects of a single or repeated doses of cocaine and methamphetamine: interactions with

- endogenous cannabinoid receptor ligands. *Behavioural pharmacology* 16(5-6):395-404.
92. Morrell JI, Basso JC, & Pereira M (2011) Both high and low doses of cocaine derail normal maternal caregiving - lessons from the laboratory rat. *Frontiers in psychiatry* 2:30.
 93. Coyer SM (2001) Mothers Recovering From Cocaine Addiction: Factors Affecting Parenting Skills. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*. 30(1):71-79.
 94. Coyer SM (2003) Women in Recovery Discuss Parenting While Addicted to Cocaine. *MCN, American Journal of Maternal Child Nursing*. 28(1):45-49.
 95. Johnson AL, Morrow CE, Accornero VH, Xue L, Anthony JC, & Bandstra ES (2002) Maternal cocaine use: estimated effects on mother-child play interactions in the preschool period. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP* 23(4):191.
 96. Fiorino DF & Phillips AG (1999) Facilitation of sexual behavior in male rats following d-amphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology* 142(2):200-208.
 97. Koob GF & Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35(1):217-238.
 98. Goldstein RZ, Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, & Rajaram S (2001) Addiction changes orbitofrontal gyrus function: involvement in response inhibition. *Neuroreport* 12(11):2595.
 99. Goldstein RZ & Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry* 159(10):1642-1652.
 100. Volkow ND & Fowler JS (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex* 10(3):318-325.
 101. Camí J & Farré M (2003) Drug addiction. *The New England journal of medicine* 349(10):975-986.
 102. Di Chiara G & Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(14):5274-5278.
 103. Moore K, Chiueh C, & Zeldes G (1977) Release of neurotransmitters from the brain in vivo by amphetamine, methylphenidate and cocaine. *Cocaine and other stimulants*, (Springer), pp 143-160.
 104. Jayanthi LD & Ramamoorthy S (2005) Regulation of monoamine transporters: Influence of psychostimulants and therapeutic antidepressants. *The AAPS Journal* 7(3).
 105. Ross S & Renyi A (1968) Inhibition of the uptake of tritiated catecholamines by antidepressant and related agents. *European journal of pharmacology* 2(3):181-186.
 106. Kuczkowski KM (2004) The cocaine abusing parturient: a review of anesthetic considerations. *Canadian Journal of Anesthesia* 51(2):145-154.

107. Robinson TE & Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain research. Brain research reviews* 18(3):247-291.
108. Robinson TE & Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction (Abingdon, England)* 96(1):103-114.
109. Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews. Neuroscience* 2(2):119-128.
110. Numan M & Smith HG (1984) Maternal behavior in rats: Evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behavioral neuroscience* 98(4):712.
111. Hansen S (1994) Maternal behavior of female rats with 6-OHDA lesions in the ventral striatum: characterization of the pup retrieval deficit. *Physiology & behavior* 55(4):615-620.
112. Byrnes EM, Riger BA, & Bridges RS (2002) Dopamine antagonists during parturition disrupt maternal care and the retention of maternal behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73(4):869-875.
113. Rutherford H, Williams S, Moy S, Mayes L, & Johns J (2011) Disruption of maternal parenting circuitry by addictive process: rewiring of reward and stress systems. *Frontiers in psychiatry* 2, 37.
114. Spear L & Varlinskaya EI (2005) Adolescence. Alcohol sensitivity, tolerance, and intake. *Recent developments in alcoholism : an official publication of the American Medical Society on Alcoholism, the Research Society on Alcoholism, and the National Council on Alcoholism* 17:143-159.
115. Slotkin TA (2002) Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicology and teratology* 24(3):369-384.
116. Dahl RE (2004) Adolescent Brain Development: A Period of Vulnerabilities and Opportunities. Keynote Address. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021(1):1-22.
117. Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 24(4):417-463.
118. Steinberg L (2010) A dual systems model of adolescent risk-taking. *Developmental psychobiology* 52(3):216-224.
119. Spear L (2013) Adolescent neurodevelopment. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine* 52(2 Suppl 2):13.
120. Hashizume K & Ōhashi K (1984) Timing of sexual receptivity and the release of gonadotrophins during puberty in female rats. *Journal of reproduction and fertility* 72(1):87-91.
121. Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021:77-85.
122. Brenhouse HC & Andersen SL (2011) Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35(8):1687-1703.

123. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, & Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(21):8174-8179.
124. Blakemore S-JJ & Choudhury S (2006) Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 47(3-4):296-312.
125. Wahlstrom D, White T, & Luciana M (2010) Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34(5):631-648.
126. Schneider M (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell and tissue research* 354(1):99-106.
127. Wahlstrom D, Collins P, White T, & Luciana M (2010) Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment. *Brain and cognition* 72(1):146-159.
128. Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, & Uylings HBM (1988) Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 269(1):58-72.
129. Berger B, Verney C, Febvret A, Vigny A, & Helle KB (1985) Postnatal ontogenesis of the dopaminergic innervation in the rat anterior cingulate cortex (area 24). Immunocytochemical and catecholamine fluorescence histochemical analysis. *Brain research* 353(1):31-47.
130. Andersen SL, Dumont NL, & Teicher MH (1997) Developmental differences in dopamine synthesis inhibition by (\pm)-7-OH-DPAT. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 356(2):173-181.
131. Andersen SL, Rutstein M, Benzo JM, Hostetter JC, & Teicher MH (1997) Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *Neuroreport* 8(6):1495-1497.
132. Tarazi FI, Tomasini EC, & Baldessarini R (1999) Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat cortical and striatolimbic brain regions: an autoradiographic study. *Developmental neuroscience* 21(1):43-49.
133. Teicher MH, Andersen SL, & Hostetter JC (1995) Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Developmental Brain Research* 89(2):167-172.
134. Leslie CA, Robertson MW, Cutler AJ, & Bennett JP (1991) Postnatal development of D 1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex, striatum and nucleus accumbens of normal and neonatal 6-hydroxydopamine treated rats: a quantitative autoradiographic analysis. *Developmental Brain Research* 62(1):109-114.
135. Tarazi FI & Baldessarini RJ (2000) Comparative postnatal development of dopamine D1, D2 and D4 receptors in rat forebrain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18(1):29-37.

136. Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, & Teicher MH (2000) Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 37(2):167-169.
137. Andersen SL & Teicher MH (2000) Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24(1):137-141.
138. Coulter CL, Happe HK, & Murrin LC (1996) Postnatal development of the dopamine transporter: a quantitative autoradiographic study. *Developmental Brain Research* 92(2):172-181.
139. Tarazi FI, Tomasini EC, & Baldessarini RJ (1998) Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neuroscience letters* 254(1):21-24.
140. Dinopoulos A, Dori I, & Parnavelas JG (1997) The serotonin innervation of the basal forebrain shows a transient phase during development. *Developmental Brain Research* 99(1):38-52.
141. Teicher M & Andersen S (1999) Limbic serotonin turnover plunges during puberty. *Poster presented at the meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, FL.*
142. Olazábal DE, Abercrombie E, Rosenblatt JS, & Morrell JI (2004) The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. *Brain research bulletin* 63(4):259-268.
143. Morilak D & Ciaranello R (1993) Ontogeny of 5-hydroxytryptamine₂ receptor immunoreactivity in the developing rat brain. *Neuroscience* 55(3):869-880.
144. Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27(1-2):3-18.
145. Andersen SL & Navalta CP (2004) Altering the course of neurodevelopment: a framework for understanding the enduring effects of psychotropic drugs. *Int J Devl Neuroscience* 22:423-440.
146. Delgado HI (2011) Alteraciones del flujo sanguíneo cerebral en consumidores activos de pasta base y clorhidrato de cocaína. Tesis de Grado (Universidad de la República del Uruguay, <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15620.pdf>).
147. Catafau AM (2001) Brain SPECT in Clinical Practice. Part I: Perfusion*. *Journal of Nuclear Medicine* 42(2):259-271.
148. Wintermark M (2005) Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. *Stroke* 36(9):e83-e99.
149. Newberg AB & Alavi A (2005) The role of PET imaging in the management of patients with central nervous system disorders. *Radiologic Clinics of North America* 43(1):49-65.
150. Herschman HR (2003) Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Current Opinion in Immunology* 15(4):378-384.
151. Koba W, Jelicks LA, & Fine EJ (2012) MicroPET/SPECT/CT imaging of small animal models of disease. *The American journal of pathology* 182(2):319-324.
152. Bell K, Milne N, & Lyons K (1994) Regional cerebral blood flow and cocaine abuse. *Western Journal of Medicine* 161(4):412.

153. Volkow ND, Mullani N, Gould KL, Adler S, & Krajewski K (1988) Cerebral blood flow in chronic cocaine users: a study with positron emission tomography. *The British Journal of Psychiatry* 152(5):641-648.
154. Volkow N, Fowler J, & Wang G-J (2004) The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:3-13.
155. Xiao L & Becker JB (1994) Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neuroscience letters* 180(2):155-158.
156. Monies G & Luque E (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Cells Tissues Organs* 133(3):192-199.
157. Ellinwood E & Balster R (1974) Rating the behavioral effects of amphetamine. *European journal of pharmacology*.
158. Paxinos GW (C.(2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Burlington MA Elsevier Inc*.
159. Siegel S (1956) Nonparametric statistics for the behavioral sciences.
160. Caster JM, Walker DQ, & Kuhn CM (2005) Enhanced behavioral response to repeated-dose cocaine in adolescent rats. *Psychopharmacology* 183(2):218-225.
161. Badanich KA, Maldonado AM, & Kirstein CL (2008) Early adolescents show enhanced acute cocaine-induced locomotor activity in comparison to late adolescent and adult rats. *Developmental psychobiology* 50(2):127-133.
162. Catlow BJ & Kirstein CL (2005) Heightened cocaine-induced locomotor activity in adolescent compared to adult female rats. *Journal of Psychopharmacology*, 19(5), 443-447.
163. Vanderschuren LJ & Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151(2-3):99-120.
164. Zakharova E, Wade D, & Izenwasser S (2009) Sensitivity to cocaine conditioned reward depends on sex and age. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 92(1):131-134.
165. Becker JB & Hu M (2008) Sex differences in drug abuse. *Frontiers in neuroendocrinology* 29(1):36-47.
166. Carroll ME & Anker JJ (2010) Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. *Hormones and behavior* 58(1):44-56.
167. Bolanos CA, Glatt SJ, & Jackson D (1998) Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Developmental Brain Research* 111(1):25-33.
168. Lanier LP & Isaacson RL (1977) Early developmental changes in the locomotor response to amphetamine and their relation to hippocampal function. *Brain research* 126(3):567-575.

169. Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, & Spear LP (1995) Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275(1):345-357.
170. Spear LP & Brake SC (1983) Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Developmental psychobiology* 16(2):83-109.
171. Frantz KJ, O'Dell LE, & Parsons LH (2007) Behavioral and neurochemical responses to cocaine in periadolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 32(3):625-637.
172. Schramm-Sapyta NL, Walker QD, Caster JM, Levin ED, & Kuhn CM (2009) Are adolescents more vulnerable to drug addiction than adults? Evidence from animal models. *Psychopharmacology* 206(1):1-21.
173. Numan M, Numan MJ, Pliakou N, Stolzenberg DS, Mullins OJ, Murphy JM, & Smith CD (2005) The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behavioral neuroscience* 119(6):1588.
174. Sorg BA, Davidson DL, Kalivas PW, & Prasad BM (1997) Repeated daily cocaine alters subsequent cocaine-induced increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281(1):54-61.
175. Robinson TE & Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47:33-46.
176. Suto N, Tanabe LM, Austin JD, Creekmore E, Pham CT, & Vezina P (2004) Previous exposure to psychostimulants enhances the reinstatement of cocaine seeking by nucleus accumbens AMPA. *Neuropsychopharmacology* 29(12).
177. Andersen SL (2004) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:3-18.
178. Andersen SL (2005) Stimulants and the developing brain. *Trends in pharmacological sciences* 26(5):237-243.
179. Pereira M & Morrell JI (2011) Functional Mapping of the Neural Circuitry of Rat Maternal Motivation: Effects of Site-Specific Transient Neural Inactivation. *Journal of Neuroendocrinology* 23(11).
180. Robinson TE & Berridge KC (2008) Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363(1507):3137-3146.
181. Logue AW, Tobin H, Chelonis JJ, Wang RY, Geary N, & Schachter S (1992) Cocaine decreases self-control in rats: a preliminary report. *Psychopharmacology* 109(1-2):245-247.
182. Macey DJ, Smith HR, Nader MA, & Porrino LJ (2003) Chronic cocaine self-administration upregulates the norepinephrine transporter and alters functional activity in the bed nucleus of the stria terminalis of the rhesus monkey. *The Journal of Neuroscience* 23(1):12-16.

183. Belej T, Manji D, Sioutis S, Barros HM, & Nobrega J (1996) Changes in serotonin and norepinephrine uptake sites after chronic cocaine: pre-vs. post-withdrawal effects. *Brain research* 736(1):287-296.
184. Johnson RG, Fiorella D, & Rabin RA (1993) Effects of chronic cocaine administration on the serotonergic system in the rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 46(2):289-293.
185. Cunningham KA, Paris JM, & Goeders NE (1992) Chronic cocaine enhances serotonin autoregulation and serotonin uptake binding. *Synapse* 11(2):112-123.
186. Dworkin SI, Co C, & Smith JE (1995) Rat brain neurotransmitter turnover rates altered during withdrawal from chronic cocaine administration. *Brain research* 682(1):116-126.
187. Barofsky AL, Taylor J, Tizabi Y, Kumar R, & Jones-Quartey K (1983) Specific Neurotoxin Lesions of Median Raphe Serotonergic Neurons Disrupt Maternal Behavior in the Lactating Rat*. *Endocrinology* 113(5):1884-1893.
188. Ferreira A, Picazo O, Uriarte N, Pereira M, & Fernandez-Guasti A (2000) Inhibitory effect of buspirone and diazepam, but not of 8-OH-DPAT, on maternal behavior and aggression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66(2):389-396.
189. Adriani W & Laviola G (2004) Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural pharmacology* 15(5-6):341-352.
190. Bizot J-C, Le Bihan C, Puech AJ, Hamon M, & Thiébot M-H (1999) Serotonin and tolerance to delay of reward in rats. *Psychopharmacology* 146(4):400-412.
191. Soubrie P (1986) Reconciling the role of central serotonin neurons in human and animal behavior. *Behavioral and Brain Sciences* 9(02):319-335.
192. Van Eden C, Kros J, & Uylings H (1990) The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas.
193. Casey BJ & Jones RM (2010) Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 49(12):1189.
194. Cools R & D'Esposito M (2011) Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. *Biological psychiatry* 69(12):25.
195. Seamans JK & Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in neurobiology* 74(1):1-58.
196. Robinson TE & Kolb B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(21):8491-8497.
197. Robinson TE & Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *The European journal of neuroscience* 11(5):1598-1604.

198. Cass DK, Thomases DR, Caballero A, & Tseng KY (2013) Developmental Disruption of Gamma-Aminobutyric Acid Function in the Medial Prefrontal Cortex by Noncontingent Cocaine Exposure During Early Adolescence. *Biological psychiatry* 74(7):490-501.
199. Santucci AC, Capodilupo S, Bernstein J, Gomez-Ramirez M, Milefsky R, & Mitchell H (2004) Cocaine in adolescent rats produces residual memory impairments that are reversible with time. *Neurotoxicology and teratology* 26(5):651-661.
200. Black YD, Maclaren FR, Naydenov AV, Carlezon WA, Baxter MG, & Konradi C (2006) Altered Attention and Prefrontal Cortex Gene Expression in Rats after Binge-Like Exposure to Cocaine during Adolescence. *The Journal of Neuroscience* 26(38):9656-9665.
201. Rodgers R & Cole J (1994) The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. *Ethology and psychopharmacology* 1994:9-43.
202. Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu CA, Schroeder JA, & Unterwald EM (2008) Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology* 54(2):355-364.
203. Salas-Ramirez KY, Frankfurt M, Alexander A, Luine VN, & Friedman E (2010) Prenatal cocaine exposure increases anxiety, impairs cognitive function and increases dendritic spine density in adult rats: influence of sex. *Neuroscience* 169(3):1287-1295.
204. Erb S (2010) Evaluation of the relationship between anxiety during withdrawal and stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34(5):798-807.
205. Fleming AS & Rosenblatt JS (1974) Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 86:221-232.
206. Bosch OJ (2011) Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin. *Hormones and behavior* 59(2):202-212.
207. Bosch OJ & Neumann ID (2008) Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(44):17139-17144.
208. Neumann I, Wigger A, Kromer S, Frank E, Landgraf R, & Bosch OJ (2005) Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in a rat model of extremes in trait anxiety. *Neuroscience* 132(3):867-877.
209. Neumann ID, Krömer SA, & Bosch OJ (2005) Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology* 30(8):791-806.
210. Ragan C & Lonstein J (2014) Differential postpartum sensitivity to the anxiety-modulating effects of offspring contact is associated with innate anxiety and brainstem levels of dopamine beta-hydroxylase in female laboratory rats. *Neuroscience* 256:433-444.

211. Sullivan SE, Black YD, Naydenov AV, Vassoler FR, Hanlin RP, & Konradi C (2011) Binge Cocaine Administration in Adolescent Rats Affects Amygdalar Gene Expression Patterns and Alters Anxiety-Related Behavior in Adulthood. *Biological psychiatry* 70(6):583-592.
212. Maaswinkel H, Gispen W-H, & Spruijt BM (1996) Effects of an electrolytic lesion of the prelimbic area on anxiety-related and cognitive tasks in the rat. *Behavioural brain research* 79(1):51-59.
213. Lacroix L, Spinelli S, Heidbreder CA, & Feldon J (2000) Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behavioral neuroscience* 114(6):1119.
214. Sullivan RM & Gratton A (2002) Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain research* 927(1):69-79.
215. Shah AA & Treit D (2003) Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain research* 969(1-2):183-194.
216. Resstel LBM, Souza RF, & Guimarães FS (2007) Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiology & behavior* 93(1-2):200-205.
217. Pawlak CR, Karrenbauer BD, Schneider P, & Ho YJ (2012) The Elevated Plus-Maze Test: Differential Psychopharmacology of Anxiety-Related Behavior. *Emotion Review* 4(1):98-115.
218. Valzachi MC, Teodorov E, Marcourakis T, Bailey A, & Camarini R (2013) Enhancement of behavioral sensitization, anxiety-like behavior, and hippocampal and frontal cortical CREB levels following cocaine abstinence in mice exposed to cocaine during adolescence. *PloS one* 8(10):e78317.
219. Alves CJ, Magalhães A, Melo P, de Sousa L, Tavares MA, Monteiro PRR, & Summavielle T (2014) Long-term effects of chronic cocaine exposure throughout adolescence on anxiety and stress responsivity in a Wistar rat model. *Neuroscience* 277:343-355.
220. Zhu W, Mao Z, Zhu C, Li M, Cao C, Guan Y, Yuan J, Xie G, & Guan X (2016) Adolescent exposure to cocaine increases anxiety-like behavior and induces morphologic and neurochemical changes in the hippocampus of adult rats. *Neuroscience* 313:174-183.
221. Pycock C, Carter C, & Kerwin R (1980) Effect of 6-Hydroxydopamine Lesions of the Medial Prefrontal Cortex on Neurotransmitter Systems in Subcortical Sites in the Rat. *Journal of neurochemistry* 34(1):91-99.
222. King D, Zigmond MJ, & Finlay JM (1997) Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on the stress-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 77(1):141-153.
223. Peterson SL, Olsta SA, & Matthews RT (1990) Cocaine enhances medial prefrontal cortex neuron response to ventral tegmental area activation. *Brain research bulletin* 24(2):267-273.

224. Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Hitzemann R, Dewey S, Bendriem B, Alpert R, & Hoff A (1991) Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal. *The American journal of psychiatry* 148(5):621-626.
225. Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey S, Logan J, Bendriem B, Christman D, Hitzemann R, & Henn F (1990) Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *The American journal of psychiatry* 147(6):719-724.
226. Doremus-Fitzwater TL, Barreto M, & Spear LP (2012) Age-related differences in impulsivity among adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral neuroscience* 126(5):735.
227. Winstanley CA (2007) The orbitofrontal cortex, impulsivity, and addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1121(1):639-655.
228. Alstrup A & Smith DF (2013) Anaesthesia for positron emission tomography scanning of animal brains. *Laboratory animals* 47(1):12-18.
229. Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, & Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends in neurosciences* 33(6):267-276.
230. Kauer JA & Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews neuroscience* 8(11):844-858.
231. Lancelot S & Zimmer L (2010) Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 31(9):411-417.
232. Caligioni CS (2009) Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*:A. 4l. 1-A. 4l. 8.
233. Hubscher C, Brooks D, & Johnson J (2005) A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 80(2):79-87.
234. Zuluaga M, Agrati D, Pereira M, Uriarte N, Fernandez-Guasti A, & Ferreira A (2005) Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiology & behavior* 84(2):279-286.
235. Agrati D, Zuluaga M, Fernandez-Guasti A, Meikle A, & Ferreira A (2008) Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and behavior* 53(1):232-240.
236. Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, & Fernández-Guasti A (2002) Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology & behavior* 77(2-3):197-204.