

TREBALL DE FI DE GRAU

Facultat de Farmàcia

Universitat de Barcelona

El Procés de Neurogènesi en el mamífer adult

Efecte del consum de mefedrona

Àmbit principal: Farmacologia

Àmbits secundaris: Toxicologia i Fisiologia

Leticia Duart Castells

Juny 2015



Aquesta obra està subjecta a una [llicència Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

ÍNDEX

Resum / Summary	1
Justificació d'integració dels diferents àmbits	2
1. Introducció	3
2. Objectius	6
3. Materials i mètodes	6
3.1 Part bibliogràfica	6
3.2 Part experimental	7
4. Resultats i discussió	10
4.1 Concepte i tipus de neurogènesi	10
4.2 On es duu a terme la neurogènesi en el mamífer adult?	11
4.3 Caracterització del procés de neurogènesi en el mamífer adult	13
4.3.1 Neurogènesi en la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp	15
4.3.2 Neurogènesi en la zona subventricular dels ventricles laterals	18
4.3.3 Neurogènesi en el cervell adult humà	20
4.4 Regulació del procés de neurogènesi en el mamífer adult	21
4.5 Funcions del procés de neurogènesi en el mamífer adult	27
4.6 Paper del procés de neurogènesi en el camp de les malalties neurodegeneratives.....	31
4.7 Afectació del procés de neurogènesi pel consum de drogues d'abús	33
4.8 Resultats experimentals: efecte del consum de mefedrona	34
5. Conclusions	38
6. Bibliografia	39
ANNEX I	47

RESUM

Fins fa unes dècades predominava el dogma universal sobre la incapacitat del sistema nerviós central de regenerar-se després del naixement, establint així, la no-formació de noves neurones durant l'etapa adulta. Recentment, s'ha demostrat el contrari, el cervell adult és capaç de regenerar-se i crear noves neurones madures funcionals, i ho fa al llarg de tota la vida. L'objectiu principal del present treball és, per tant, descriure i caracteritzar el procés de neurogènesi del cervell d'un mamífer adult a partir de la recerca de bibliografia científica que ens permeti abordar i resoldre els aspectes més importants del procés: què és, on i com es dona, quina és la seva funció, com es troba regulat i quina implicació i relació té amb les malalties neurodegeneratives i el consum de drogues d'abús. Hi ha un gran nombre d'estudis que palesen la inhibició del procés de neurogènesi degut al consum de substàncies com ara l'alcohol, la cocaïna o els opioïdes. En el present treball s'ha volgut determinar també l'efecte de la mefedrona (sola i en combinació amb etanol) sobre la neurogènesi en l'hipocamp de ratolins adolescents. Per avaluar-ho, s'ha administrat als animals una solució de BrdU com a marcardor de cèl·lules noves i, 28 dies després, s'han sacrificat i s'ha fet una immunohistoquímica en portaobjectes per BrdU i NeuN amb els talls coronals de cervell. Amb tot, s'ha pogut observar un descens en la taxa de neurogènesi en els animals tractats amb mefedrona, i encara més, en els tractats concomitantment amb alcohol. Aquest fet, per tant, podria relacionar-se amb una alteració de la funcionalitat del sistema nerviós central.

SUMMARY

Until a few decades ago a universal dogma existed with regards to the inability of the central nervous system to regenerate after birth, impeding the formation of new neurons during adulthood. Recently, the opposite has been demonstrated. The adult brain is able to regenerate and create new functional neurons; this occurs during the whole lifespan. The main aim of the present work is to describe and characterize the process of neurogenesis in the adult mammalian brain through scientific literature search allowing us to address the most important aspects of the process: what it is, where and how it occurs, what its function is, how it is regulated and what involvement it has in neurodegenerative diseases and the use of drugs of abuse. There are a lot of studies that show the inhibition of the process of neurogenesis due to the intake of drugs of abuse like ethanol, cocaine or opioids. In this project we also wanted to determine the effect of mephedrone (alone and in combination with ethanol) on hippocampal neurogenesis in adolescent mice. To assess this, we administered animals with a solution of BrdU as a new cell marker and, 28 days later, the animals were sacrificed and an immunohistochemistry on slides for BrdU and NeuN was performed on coronal brain slices. A decrease in the neurogenesis rate of animals treated with mephedrone was observed; this effect was further enhanced in the mephedrone plus alcohol group. This phenomenon may be explained by an altered functionality of the central nervous system.

JUSTIFICACIÓ D'INTEGRACIÓ DELS DIFERENTS ÀMBITS

El present Treball de Final de Grau pretén integrar coneixements pertanyents a tres àmbits cursats durant el Grau de Farmàcia: Farmacologia, Fisiologia i Toxicologia.

D'una banda, la **Fisiologia** està present en tant que un dels objectius del treball és descriure un procés fisiològic: la generació de noves neurones en el cervell adult. Per tant, s'estudia una funció dels organismes vius, en aquest cas, dels mamífers. Gràcies a això, podem comprendre tots els elements i trets característics del procés funcional: com es dona, on, amb quina finalitat, com es troba regulat i quina implicació pot tenir en altres processos com ara en estats patològics.

D'altra banda, aquest tema també té una gran implicació en el camp de la **Toxicologia** ja que incorpora un apartat descriptiu del conjunt d'efectes nocius i indesitjables que generen un conjunt de substàncies no terapèutiques, en aquest cas, les drogues d'abús, sobre el procés de neurogènesi. A la vegada que també es pretén estudiar a través de quins mecanismes es produeixen aquests efectes.

Tot i així, l'àmbit principal és la **Farmacologia**, ciència que estudia com interacciona una substància activa amb l'organisme, els seus efectes i propietats. Un cop descrit el procés de neurogènesi, un dels objectius del treball és determinar l'efecte d'una substància activa, en aquest cas la mefedrona, sobre el procés de neurogènesi, així com determinar el mecanisme pel qual aquesta és capaç de modificar el procés fisiològic generant efectes indesitjables. Amb tot això, aquests coneixements ens poden permetre deduir eines per combatre-ho o bé utilitzar aquesta modificació generada per a una aplicació determinada.

1. INTRODUCCIÓ

El procés de neurogènesi (NG), tal i com indica la mateixa etimologia de la paraula: <neuro> que vol dir “relatiu als nervis, neurones” i <gènesi> que vol dir “formació, creació”, fa referència al procés de desenvolupament i generació de noves neurones funcionals a partir de cèl·lules mare neurals i progenitores. Aquest procés és el més actiu durant el desenvolupament embrionari i és el responsable de la formació de les neurones en el cervell humà, parlem llavors, de **neurogènesi embrionària** (1).

Fins fa unes dècades, hi havia una presumpció centenària de “no hi ha generació de noves neurones després del naixement” suportada per científics neuroanatomistes com ara **Ramon i Cajal** (2), que consideraven el sistema nerviós adult com un sistema fix incapaç de regenerar-se. Tot i així, aquesta teoria va quedar obsoleta quan, l’any 1965, **Joseph Altman** va demostrar la primera evidència de neurogènesi en el gir dentat de l’hipocamp d’un rosegador adult (3,4).

Aquests descobriments, malgrat tot, van ésser ignorats per la comunitat científica fins la dècada del 1980, quan investigadors interessats en el tema van reprendre la recerca demostrant la integració sinàptica i funcional de noves neurones en el sistema nerviós central (SNC) adult d’aus cantores (5). Posteriorment, es va evidenciar l’existència de cèl·lules mare neurals multipotents derivades del cervell adult de mamífers (6,7) i, amb tot, hi ha hagut manifestacions contínues de **neurogènesi adulta** en tots els mamífers estudiats fins al moment, incloent també als éssers humans (8).

El cervell mamífer adult és una estructura plàstica capaç de remodelar-se i adaptar-se dinàmicament a nivell cel·lular i molecular en resposta a les interaccions de l’individu amb el seu entorn més proper. El procés de neurogènesi en l’adult n’és un clar exemple d’aquesta **plasticitat estructural**, segons el qual, al llarg de la vida, van naixent noves neurones que s’integren en els circuits neuronals ja existents (9). Malgrat tot, en condicions fisiològiques, aquest procés està restringit espacialment en dues regions privilegiades del cervell mamífer que alberguen cèl·lules mare neurals i precursors, i que són l’excepció a la regla de que la neurogènesi es dona exclusivament durant el desenvolupament: la **zona subgranular (ZSG)** del gir dentat de l’hipocamp i la **zona subventricular (ZSV)**, adjacent als ventricles laterals (1). En aquest cas les cèl·lules precursors migren des de la ZSV i s’integren al bulb olfatori on es diferencien en neurones madures (1,10,11). Estudis recents, però, estan posant de manifest que en els humans, i a diferència de la resta de mamífers, aquests precursors no migren cap al bulb, sinó que ho fan cap a regions pròximes a la ZSV com ara el còrtex prefrontal i/o l’estriat (12,13). Es creu que, en general, la neurogènesi en altres regions del SNC adult és molt limitada en condicions fisiològiques normals, però que podria ser induïda després d’una lesió (14).

Si es tractés d'un procés estàtic, merament reparador, la neurogènesi adulta no es podria considerar com un mecanisme de plasticitat cerebral. Aquest fet suggereix doncs, que el cervell adult ha de ser capaç d'adaptar la producció de noves neurones d'acord amb la demanda de l'entorn i per això, és d'esperar que existeixin **factores de regulació** positius i negatius del procés que determinin la seva taxa. Així doncs, tots i cadascun dels aspectes en la producció de noves cèl·lules neuronals estan estretament regulats i modulats tant per factors **intrínsecs** (gens, factors de creixement, factors intracel·lulars, neurotransmissors, hormones, l'edat i factors patològics) com per factors **extrínsecs** (tals com factors ambientals, substàncies farmacològiques i drogues d'abús) a l'individu (1,15,16,17).

Es tracta, doncs, d'un procés dinàmic perfectament ajustat i regulat del qual, fins al moment, es desconeix exactament la seva funció més enllà de proporcionar plasticitat neuronal. Tenint en compte les estructures on es dona el procés - hipocamp i bulb olfatori- les investigacions han anat dirigides a determinar la importància i repercussió de la neurogènesi en les funcions més rellevants que es desenvolupen en ambdues estructures: **aprenentatge/consolidació de la memòria i l'olfacció**, respectivament. Tot i així, hi ha grans controvèrsies i discrepàncies en els resultats que són un indicatiu de que es requereix més investigació (1,16,18).

Des de fa anys, la investigació ha estat orientada també a estudiar el procés de neurogènesi en el camp de les **malalties neurodegeneratives**. Tant el procés de generació de noves neurones com el de mort cel·lular tenen un paper crític en el desenvolupament i manteniment del cervell adult. I, precisament, aquests processos s'han vist alterats en malalties cròniques neurodegeneratives tals com l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington. És més, la simptomatologia inicial de tots tres trastorns és comuna i es caracteritza per depressions, ansietat i dèficits cognitius/olfactoris, funcions bàsiques de les dues regions neurogèniques del cervell (19,20). La inducció del procés, podria ser, per tant, una possible estratègia terapèutica? S'estan concentrant esforços per resoldre les qüestions plantejades malgrat que, fins al moment, els resultats en molts casos resulten ser contradictoris.

Donada la importància d'aquest procés en el camp de les malalties neurodegeneratives, com també en l'estudi de les cèl·lules mare, la neurobiologia del desenvolupament i la plasticitat estructural, resultava no sols interessant, sinó imprescindible aprofundir en el coneixement de dit procés. La dècada del 1990 ja va ésser testimoni d'un progrés significatiu en la resolució de les qüestions relacionades amb gairebé tots els aspectes de la neurogènesi adulta en el cervell de mamífer. Aquest gran salt en el coneixement va ésser possible gràcies a la introducció d'una nova tècnica per l'estudi del procés. Es tracta de la **5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)** (21), un anàleg de nucleòtid que s'incorpora en les cadenes de DNA de les cèl·lules que s'estan dividint, i que per tant, permet fer un seguiment dels diferents estadis de desenvolupament neuronal.

Aquesta mateixa tècnica s'ha utilitzat àmpliament per estudiar l'efecte de les diferents **drogues d'abús** (alcohol (22), amfetamines (23), MDMA (24)...) sobre el procés de NG, tot i així poc és sabut fins al moment de l'efecte de les noves catinones sintètiques tals com la mefedrona.

La **mefedrona** (4-metilmetcatinona) (**Fig 1**) és una substància d'abús derivada de la catinona, un actiu i potent alcaloide natural amb propietats psicoestimulants (25). La seva aparició en el mercat va venir donada per l'elevat control i la restricció en el consum d'altres substàncies d'abús com ara el MDMA (3,4-metilendioximetamfetamina, èxtasi), conjuntament amb el descens en la qualitat i la puresa de la cocaïna, fet que va impulsar l'aparició de noves alternatives legals anomenades catinones sintètiques, una nova família de derivats amfetamínic (beta-ceto-amfetamines) (26, 27).

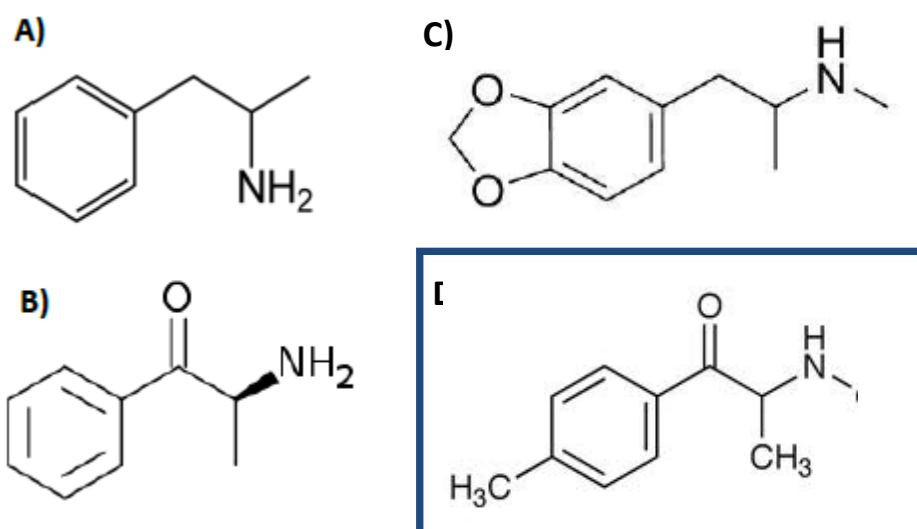


Fig 1: Estructura química de l'amfetamina (A), catinona (B), MDMA (C) i mefedrona (D)

Aquestes noves drogues d'abús, abans comercialitzades com sals de bany, provoquen efectes similars als d'altres substàncies psicoestimulants com ara el MDMA i la cocaïna (28,29), amb les quals presenten un grau de similitud estructural. Entre les catinones, la mefedrona és una de les més demandades (30), de fet, el seu potencial d'abús entre adolescents i adults joves és comparable al del MDMA i cocaïna degut a que resulta més fàcil d'aconseguir i és més econòmica que les més clàssiques (31).

Amb tot això, resulta evident la necessitat de determinar la possible afectació del procés de neurogènesi degut al consum de mefedrona, i és per això, que un dels objectius del present treball ha estat determinar els efectes sobre la neurogènesi en l'hipocamp de ratolins adolescents tractats prèviament amb la droga.

En conclusió, tenint en compte els darrers avenços i amb l'ajuda de les noves tecnologies emergents, és d'esperar que el camp de la neurogènesi adulta estigui

apunt de donar un altre gran salt en la pròxima dècada. I aquest avenç és necessari no sols per resoldre les principals qüestions relacionades amb el procés, sinó també per poder descobrir nous coneixements sobre les funcions de l'hipocamp i del bulb, així com per establir noves estratègies terapèutiques pel tractament de trastorns neurològics i psiquiàtrics dins del camp de la medicina regenerativa.

2. OBJECTIUS

2.1 Conèixer i descriure els trets principals del procés de neurogènesi del cervell d'un mamífer adult mitjançant la consulta de bibliografia científica:

- Què és
- On es dona
- Descripció dels diferents estadis de desenvolupament del procés
- Factors que regulen el procés
- Quina és la seva funció
- Implicació en el camp de les malalties neurodegeneratives i possibles aplicacions terapèutiques
- Repercussió del consum de drogues d'abús sobre el procés

2.2 Determinar experimentalment l'efecte de l'administració de mefedrona, sola i en combinació amb etanol, sobre la neurogènesi en l'hipocamp de ratolí adolescent

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Part bibliogràfica: descripció del procés de neurogènesi en el cervell d'un mamífer adult

Per tal d'assolir l'objectiu general de descriure el procés de neurogènesi a partir de la resolució dels objectius específics esmentats en l'apartat 2, la metodologia s'ha basat en fer una recerca exhaustiva i una posterior síntesi de la informació d'interès provinent de fonts primàries (articles científics) i secundàries (articles de revisió) de la bibliografia científica present en diferents bases de dades.

Per tal de dur-ho a terme ha estat imprescindible, primerament, conèixer quines fonts d'informació tinc a l'abast, així com aprendre l'ús dels recursos tecnològics per la cerca d'informació. Un cop après, m'he pogut documentar sobre el tema a tractar

identificant aquella informació més important i així planificar i redactar el treball de final de grau d'acord amb els requisits de forma i contingut establerts.

Les bases de dades consultades han estat:

- **PubMed:** base de dades d'informació biomèdica produïda pel *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Plataforma a partir de la qual es pot tenir accés a bases de dades Medline, Cochrane (revisions sistemàtiques) i a revistes completes. Accés via Internet des de la pàgina web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **Scopus:** base de dades bibliogràfica que inclou totes les revistes indexades a Medline i moltes més addicionals. Accés via Internet des de la pàgina web <http://www-scopus-com.sire.ub.edu/>

Els articles d'interès s'han trobat en aquestes bases de dades introduint al cercador paraules clau com ADULT NEUROGENESIS, NEUROGENESIS HIPPOCAMPUS, ADULT NEUROGENESIS NEURODEGENERATIVE DISEASES, entre altres.

En tots els casos, s'han intentat buscar els articles científics i *reviews* més recents per tal d'aportar la informació més actualitzada possible.

3.2 Part experimental: determinació de l'efecte de l'administració de mefedrona (sola i en combinació amb etanol) sobre la neurogènesi en l'hipocamp de ratolí adolescent

3.2.1 Tampons i solucions

PBS 0.1 M (*phosphate buffered saline*) pH 7.35, PBS 0.1 M - TRITÓ (0.2% i 0.5%), PBS 0.1 M - GELATINA (0.2%), HCl 2N i Àcid Bòric 0.1 M. (*Veure Annex I.B*)

3.2.2 Drogues i reactius

Mefedrona racèmica pura (4-metilmetcatinona), en forma d'hidroclorur, sintetitzada prèviament al laboratori de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia, amb el permís de la Universitat de Barcelona, segons el procediment posat a prova en el grup de recerca (32). Les solucions per a injecció de la mefedrona es van preparar amb solució salina estèril (0.9% NaCl) just abans de l'administració.

La solució per a injecció de BrdU es va preparar d'acord amb el procediment descrit prèviament (33) amb solució salina estèril (0.9% NaCl), just abans de l'administració.

Els anticossos primaris vers BrdU i NeuN els obtenim de la companyia Merck Millipore (Darmstadt, Alemanya) i els secundaris, Alexa-Fluor 488 i Alexa-Fluor 594 de Life

Technologies. La solució de Fluoromount-G d'Electron Microscopy Sciences (Hatfield, England). Finalment, la resta de reactius els obtenim de la companyia Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2.3 Animals d'experimentació

Ratolins mascles Swiss-CD-1 adolescents, de 5 setmanes de vida amb un pes de 35g aproximadament. Estabulades a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sota un cicle de llum/fosc de 12h, i amb lliure accés a menjar i aigua (dieta estàndard del laboratori, Panlab SL, Barcelona).

El protocol experimental referent al tractament dels animals en aquest estudi compleix amb les directrius del Consell de la Comunitat Europea (86/609/CEE). A més, ha estat aprovat pel Comitè Animal Ètic de la Universitat de Barcelona, sota la supervisió del Govern Autòmic de Catalunya.

3.2.4 Tractament dels animals

Preparem una solució d'hidroclorur de mefedrona de concentració 2.5 mg/ml. Un dels objectius d'aquest estudi és determinar si l'etanol és capaç d'incrementar els efectes neurotòxics d'un règim de tractament amb mefedrona amb efectes neurotòxics mínims. D'acord amb estudis previs (34), el règim de tractament a seguir per assolir el nostre objectiu és de quatre dosis de 25 mg/kg. Així doncs, administrem via subcutània un volum de 10 ml/kg a cadascun dels ratolins cada 2h. El interval entre dosis es va escollir d'acord amb el temps de semivida de la mefedrona (35).

Per tal de simular la ingesta recreativa d'etanol es va buscar un règim d'administració que causés una concentració d'etanol en sang de 1.5 g/L durant tota la durada del tractament. Donada la diferència entre les cinètiques de la mefedrona i de l'etanol (35,36), es van administrar diferents dosis d'etanol via subcutània simultàniament amb la mefedrona per tal de disminuir el dolor dels animals i simplificar l'execució.

Per determinar les dosis d'etanol a administrar, es van extreure mostres de 50 µl de sang dels animals via jugular una hora després de cada administració. Les mostres es van recollir en tubs amb EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic) com anticoagulant, i es va determinar la concentració d'etanol mitjançant cromatografia de gasos, utilitzant el metanol com a patró intern. Finalment les dosis d'etanol escollides per ser administrades cada 2h van ser: 2, 1.5, 1.5, 1 g/kg.

Es van fer quatre grups: control (sèrum fisiològic), mefedrona, etanol i mefedrona + etanol, amb 6-8 animals per grup. Durant el tractament, els animals estaven en una cambra a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ per simular les condicions en què es troben els consumidors quan prenen mefedrona.

Posteriorment, 12h i 24h després de l'última administració de mefedrona, es va administrar a cada animal 5ml/kg via intraperitoneal de solució de BrdU a una dosi de 50 mg/kg. La BrdU (5'-bromo-2'-desoxiuridina) és un anàleg nucleotídic que s'incorpora a les cadenes de DNA naixents i ens permet analitzar la síntesi de DNA que té lloc en un determinat període.

3.2.5 Immunohistoquímica en portaobjectes

Tècnica histoquímica basada en una reacció antígen - anticòs que permet identificar un determinat tipus cel·lular en un teixit concret. Es basa en la unió específica d'un anticòs primari a un antígen determinat (en aquest cas, la BrdU), al qual se li unirà posteriorment un anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom el qual, a l'excitar-se amb una determinada longitud d'ona, emetrà una radiació a una altra longitud d'ona que permetrà visualitzar l'estructura al microscopi de fluorescència i confocal.

Obtenció de les mostres de teixit

Els diferents talls de cervell provenen del sacrifici dels ratolins 28 dies després de la primera injecció de BrdU. El procediment a seguir és:

1. Anestesiàr els animals amb pentobarbital sòdic (1g/kg)
2. Sacrifici dels animals per perfusió transcardial amb 30 ml de PBS 0.1 M i, posteriorment, amb 60-100 ml de paraformaldehid al 4% en PBS 0.1 M.
3. Diseccionar el crani i extreure l'encèfal sencer. El fixem *overnight* en la mateixa solució de paraformaldehid al 4% en PBS i ho equilibrem amb una solució de sacarosa al 30% en PBS fins que el cervell no suri en la solució.
4. Seccionament: obtenció de seccions coronals seriades dels cervells de 30 µm de gruix amb un criòstat. Recollir-los i emmagatzemar-los *free-floating* amb solució crioprotectora (30% sacarosa, 30% PEG en PBS) a -20°C fins al seu ús en l'anàlisi immunohistoquímic.

Desnaturalització del DNA

La desnaturalització del DNA és necessària per permetre l'accés i la unió de l'anticòs primari anti-BrdU al nucleòtid. Per fer-ho, es van seleccionar les seccions d'interès i es van rentar amb PBS 0.1 M amb 0.2% de tritó per tal de permeabilitzar la membrana. Llavors, per tal de desnaturalitzar el DNA, es van incubar els talls 30 min amb HCl 0.2N a 37°C i un cop transcorregut el temps, es van rentar amb PBS i es van incubar 10 min amb àcid bòric 0.1 M a 37°C. Finalment, es van rentar amb PBS i es van incubar 1h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig (PBS amb 0.2% de gelatina, 0.2 M de glicina, 10% de sèrum boví fetal (FBS) i 0.3% de Tritó X-100).

Incubació amb l'anticòs primari BrDU

Les seccions de teixit es renten i s'incuben *overnight* amb els següents anticossos primaris: *mouse anti-BrdU* (dilució 1:250) i *rabbit monoclonal anti-NeuN* (dilució 1:500); diluïts en solució de bloqueig, amb agitació contínua i a temperatura de refrigeració 4°C.

Incubació amb l'anticòs secundari

Incubar els talls amb els anticossos secundaris corresponents diluïts en PBS amb Tritó X-100 al 0,2%, durant 2h a temperatura ambient sota agitació contínua. L'anticòs secundari emprat per BrdU va ser *Alexa-Fluor 488 donkey anti-mouse IgG* (1:500) i per NeuN, *Alexa-Fluor 594 goat anti-rabbit IgG* (1:500).

Finalment, es van rentar els talls amb PBS i es van disposar en portaobjectes emprant com a medi de muntatge *Fluoromount-G*.

Quantificació

Mitjançant un microscopi confocal *TCS SP2 Leica* es va avaluar la neurogènesi mitjançant el recompte manual del número de cèl·lules que presentaven doble marcatge (BrdU i NeuN) i que per tant, correspon amb el fenotip de neurona madura.

El recompte el va realitzar un observador cec, i es va fer de sis seccions coronals per cervell d'animal. Per tal d'estimar el total de cèl·lules marcades per gir dentat, es va normalitzar pel volum del gir dentat. Això es va fer multiplicant el nombre total obtingut de les 6 seccions coronals seleccionades per l'índex de volum (relació entre el volum total combinat de les seccions seleccionades i el volum del gir dentat). Per calcular l'índex de volum es va delimitar l'àrea del gir dentat de cada mostra gràcies a la tinció NeuN i el programa informàtic *Image J*.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Concepte i tipus de neurogènesi

El terme *neurogènesi* (NG) fa referència al procés de generació de neurones madures funcionals en el cervell a partir de cèl·lules mare neurals i precursors. Durant el desenvolupament perinatal és quan el procés es troba més actiu, ja que és el responsable de poblar el cervell de neurones. És el que es coneix amb el nom de *neurogènesi embrional* (1).

No va ésser fins l'any 1965, quan Joseph Altman i els seus col·laboradors van demostrar per primera vegada l'existència d'aquest procés també en el cervell

mamífer adult (3,4), derogant per complet el dogma universal sobre la incapacitat del cervell adult de regenerar-se i crear noves neurones després del naixement.

Així doncs, parlem de **neurogènesi adulta** per referir-nos al procés que es dona al llarg de tota la vida, a partir del qual cèl·lules mare neurals i cèl·lules precursoras neuronals donen lloc a noves neurones funcionals madures que s'integren en els circuits preexistents del cervell de l'individu. Aquest procés està evolutivament conservat des de crustacis (37) fins a vertebrats, incloent ocells (38), rosegadors (3,39), primats (40) i humans (8). Però s'ha vist que el grau de neurogènesi decreix amb la complexitat cerebral i es creu que depèn dels beneficis que suposa la generació de noves neurones enfront els problemes que generen als circuits neuronals on s'integren (41).

Aquestes noves cèl·lules presenten totes les característiques pròpies de les neurones madures del sistema nerviós central (SNC): són no mitòtiques i polaritzades, presenten dendrites i axons en la seva estructura, formen sinapsis eficientment, són actives elèctricament, generen potencials d'acció en resposta a estímuls sinàptics excitatoris i inhibitoris i són capaces d'alliberar neurotransmissors en resposta a potencials d'acció (42).

Això no obstant, cal tenir en compte que la neurogènesi adulta difereix en dos aspectes fonamentals de la neurogènesi embrional (43):

1. La neurogènesi adulta, a diferència de l'embrional, es dona en regions del cervell que no han estat necessàriament programades per promoure la neurogènesi, ja que el propi desenvolupament cerebral ha cessat anys enrere en l'etapa perinatal. És per aquest motiu que el procés necessita d'un microambient permissiu amb protecció enfront factors anti-neurogènics del teixit cerebral circumdant.
2. El procés de neurogènesi adult no sembla ser de progressió tant organitzat i massiu amb les diferents etapes succeint en paral·lel. Això vol dir que, per exemple, en l'hipocamp adult podem trobar en qualsevol moment les neurones en tots i cadascun dels diferents estadis de desenvolupament, des de la cèl·lula mare fins la neurona madura. Així doncs, parlem d'un procés individualitzat, no d'un esdeveniment poblacional com és el cas de la neurogènesi intrauterina. Tot i així, amb el terme *neurogènesi* ens referim a tot el procés, la successió de tots els múltiples passos del desenvolupament, no ens referim a la divisió d'una cèl·lula progenitora aïllada.

4.2 On es duu a terme la neurogènesi en el mamífer adult?

La neurogènesi en l'adult és possible en regions determinades del cervell que presenten un microambient particular amb uns constituents i unes característiques

que resulten favorables i permissives per a què es desencadeni el procés. A aquest microambient favorable se'l coneix com *neurogenic niche* (nínxol neurogènic) o *neural stem cell niche* (nínxol de cèl·lules mare neurals). Aquest inclou diversos tipus cel·lulars i components tissulars tals com: les cèl·lules mare neurals i progenitores amb els seus descendents, astròcits, oligodendroglia, microglia, cèl·lules endotelials, cèl·lules immunitàries i vasculatura (44) (la qual té un rol molt important en la regulació de la proliferació dels precursors neuronals) (45).

Tenint en compte això, la neurogènesi adulta en condicions fisiològiques normals està restringida espacialment a dues regions definides del cervell mamífer adult (**Fig 2**) (1,11,16,46,47):

- La **zona subgranular (ZSG)** del gir dentat (GD) de l'hipocamp: una petita banda de teixit situada entre la capa granular i el hilus. El procés s'origina a partir dels precursors que resideixen en la ZSG i dona lloc a noves neurones que s'integran en la capa granular del gir dentat.
- La **zona subventricular (ZSV)** que revesteix els ventricles laterals. Els mateixos precursors de la ZSV es van desenvolupant i migren per la via rostral migratòria (*rostral migratory stream*) cap al bulb olfatori, on acaben esdevenint interneurons granulars o periglomerulars que s'incorporen en les xarxes neuronals preexistents.

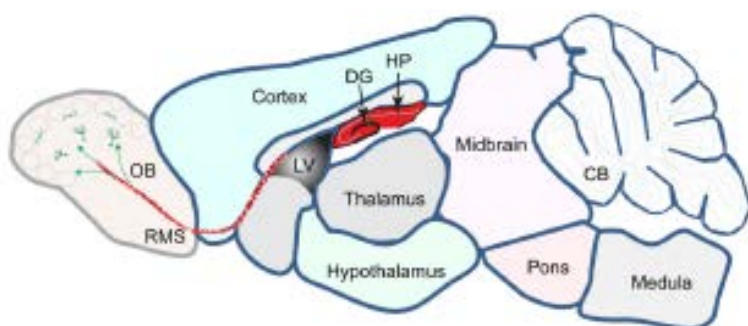


Fig 2: Visió d'una secció sagital d'un cervell de rosegador adult. Es troben marcades les dues regions espacialment restringides on es dona la neurogènesi: el gir dentat (DG) de l'hipocamp (HP), i la zona subventricular dels ventricles laterals (LV) des d'on migren els neuroblasts per la via rostral migratòria (RMS) fins al bulb olfatori (OB). (7)

Malgrat això, hi ha hagut també evidències que suggereixen l'existència del procés en altres regions del cervell mamífer adult com ara el propi bulb olfatori (48) o la substància nigra (49). Però, en el present treball, ens centrarem en les dues regions les quals la presència d'una neurogènesi constitutiva no és controvertida.

S'han trobat també cèl·lules mare i precursoras en altres regions del cervell que es creu que durant el desenvolupament intrauterí són responsables de donar lloc a la població neuronal sencera, però que en l'adult, en condicions fisiològiques normals, no es troben "actives" (50). És a dir, en l'adult, si aquestes es troben en àrees no neurogèniques no fan servir el seu potencial neurogènic. Ara bé, si es troben en un àrea permissiva com la ZSG i ZSV, poden fer-ne ús (51,52). D'altra banda, s'especula que estímuls com ara una lesió cerebral podria crear el microambient favorable pel procés i per tant, induir la neurogènesi en zones no neurogèniques (14).

4.3 Caracterització del procés de neurogènesi en el cervell mamífer adult

El procés s'origina gràcies a l'existència de cèl·lules amb activitat mitòtica en la ZSV i ZSG del cervell. Aquestes es poden classificar en dos grups: les cèl·lules mare neurals i les cèl·lules progenitores neuronals (CPN) (15).

Cèl·lules mare neurals

El seu cicle cel·lular és superior a 28 dies. Tenen capacitat de generar contínuament dos tipus cel·lulars mitjançant la divisió cel·lular: noves cèl·lules mare (el que s'anomena **capacitat d'autorenovació**) i *cèl·lules progenitores neuronals*. Aquestes, al seu torn, tenen un cicle cel·lular de 12 hores però perden la seva capacitat mitòtica per donar lloc a neurones (53,54).

Les cèl·lules mare neurals embrionàries són pluripotents, és a dir, tenen la capacitat de diferenciar-se donant lloc a diferents tipus cel·lulars de l'organisme en desenvolupament. Les cèl·lules mare en el cervell adult, en canvi, perden part d'aquesta capacitat i resten **multipotents**, la qual cosa implica que només poden donar lloc, finalment, a tipus cel·lulars més restrictius i específics: neurones, astròcits i oligodendròcits (11,55,56). (Fig 3)

Fins al moment, hi ha una gran controvèrsia sobre quin és la naturalesa de les cèl·lules mare neurals i, per tant, l'origen cel·lular de les CPN. Les cèl·lules mare comparteixen característiques funcionals, morfològiques i antigèniques pròpies d'una cèl·lula glial radial amb propietats d'astròcit (57-59). De fet, s'ha demostrat que una població específica de glia radial pot originar precursors neuronals, els quals, al seu torn, originen tant neurones com cèl·lules de la glia (60,61).

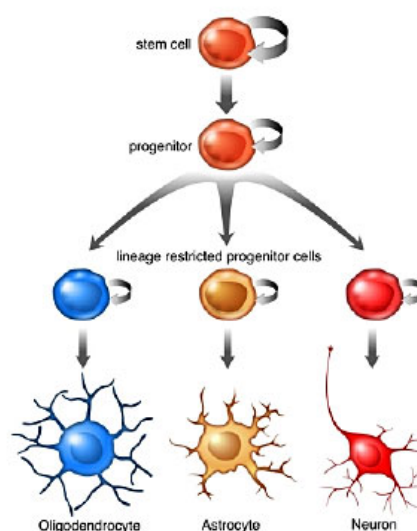


Fig 3: Tipus cel·lulars (oligodendròcits, astròcits i neurones) als quals pot donar lloc les cèl·lules mare multipotents (cèl·lules B) de la ZSG i ZSV en el cervell adult.

Per aquest motiu, la majoria d'estudis reforcen la teoria de que, en ambdues regions cerebrals, les CPN procedeixen de cèl·lules mare de tipus astrocític (GFAP⁺ *glial fibrillary acidic protein*; i nestina⁺) anomenades astròcits radials o **cèl·lules tipus B**. (57,58). I així doncs, s'especula que el procés de neurogènesi i gliogènesi puguin estar barrejats o almenys, provinquin de la mateixa cèl·lula mare (62).

Model de desenvolupament

Malgrat que el resultat del procés de neurogènesi en ambdós regions cerebrals (ZSV i ZSG) sigui el mateix: generació de noves neurones madures, cal saber que el model de desenvolupament proposat en cada cas difereix substancialment.

En trets generals i des d'un punt de vista senzill i simplista, el procés de neurogènesi en ambdós regions consta de les següents fases (43):

1. **Divisió inicial i proliferació lenta** de les cèl·lules mare neurals
2. **Fase d'expansió:** proliferació ràpida de les cèl·lules progenitores neuronals transitòries a unes de llinatge cada cop més restrictiu (neuroblasts)
3. **Etapa post-mitòtica:** procés de selecció cel·lular i integració en la xarxa neuronal preexistent de les cèl·lules que han sobreviscut a la selecció
4. **Últimes fases de desenvolupament i maduració post-mitòtica:** increment gradual de la connectivitat neuronal i canvis en les propietats fisiològiques de la neurona

Durant l'etapa de progenitor a neuroblast, la majoria de cèl·lules són subjectes a un primer procés crític de **selecció cel·lular** per a la supervivència, segons el qual, o seran eliminades o bé es reclutaran per esdevenir funcionals (63-65). El resultat d'aquest procés sempre resulta amb una reducció dràstica del número de cèl·lules que moren per apoptosi (65). Així doncs, de totes les cèl·lules formades, només unes poques arribaran a integrar-se a la xarxa neuronal i ser actives.

Pel que fa al moment d'integració de les neurones immadures en la xarxa preexistent, és quan es produeix la segona etapa crítica de selecció (66,67). Les noves neurones que es connecten sinàpticament a la xarxa mostren una hiperexcitabilitat i una major plasticitat sinàptica degut a l'acció del glutamat (neurotransmissor excitador) durant el període de maduració (68). Després d'una fase prolongada de maduració, tot i així, acaben presentant propietats electrofisiològiques similars. Amb tot, hi ha dos possibles conseqüències fisiològiques: aquesta plasticitat incrementada pot donar a les noves cèl·lules un avantatge per competir amb les neurones antigues en la formació i estabilització selectiva de noves connexions sinàptiques. A més, també podrien permetre que les noves neurones fessin una contribució única en el processament de la informació durant aquell període (67,68).

En conseqüència, l'activitat i capacitat proliferativa de les cèl·lules precursors és poc predictiu i representatiu de la taxa de neurogènesi final esperada. Aquesta variabilitat en la selecció per la supervivència és responsable en gran part de la variabilitat del resultat del procés. Així doncs, per valorar el nivell de NG que es

dóna en un individu, cal tenir present dos índex: el nivell de proliferació de les cèl·lules i l'índex de supervivència de les mateixes (70).

En quant a la integració de les neurones, existeix un ampli debat (Fig 4) sobre si aquestes neurones s'integren directament (contribuint al creixement de l'estructura) o bé reemplacen a les neurones antigues. Com també queda aprofundir en el coneixement sobre si la funció pròpia de la nova neurona és o no específica (16).

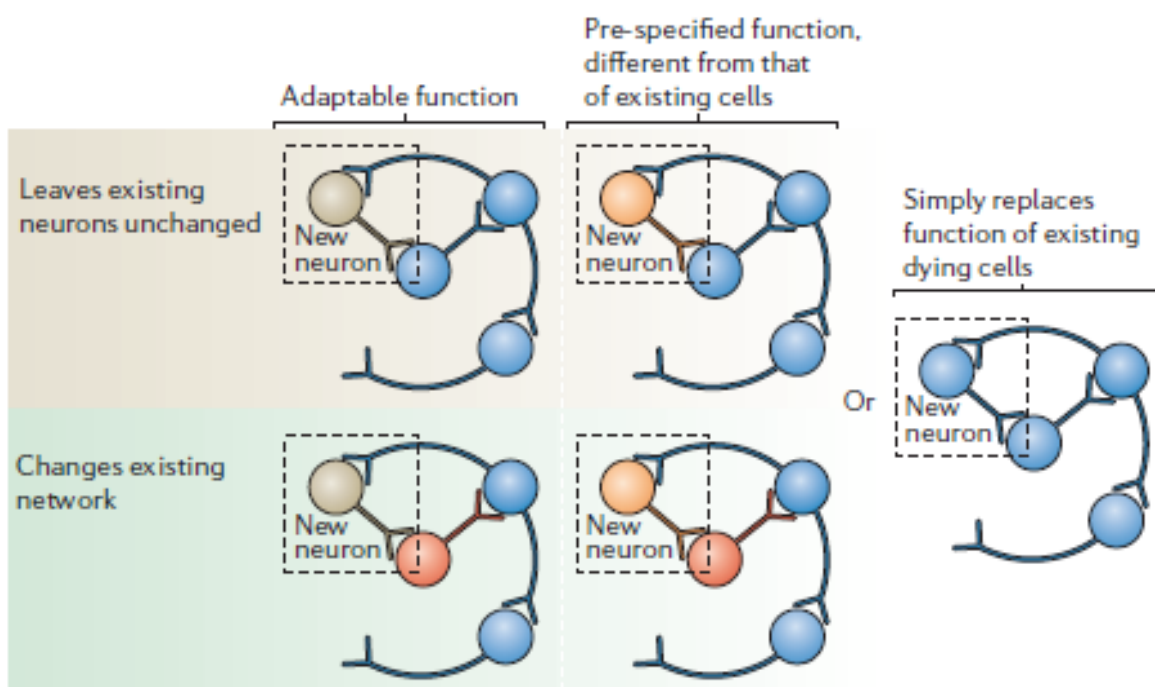


Fig 4: Possibles funcions de les noves neurones a nivell cel·lular i de xarxa neuronal. Esquema bàsic de les possibilitats funcionals que la nova neurona pot aportar a la xarxa preexistent a la qual s'uneix. Aquestes poden, d'una banda, tenir una funció inespecífica i adaptable, o bé un paper específic i predeterminat. A més, poden simplement afegir-se a la xarxa, fent la seva funció sense causar cap canvi, o bé alterar les característiques de la xarxa. Finament, també és possible que no facin cap funció especial i simplement reemplacin la funció d'una existent, la qual mor. Totes aquestes funcions i possibilitats no necessàriament s'exclouen les unes de les altres. Pot ser, per exemple, que una neurona tingui una funció particular i específica al inici de la seva maduració i que adquireixi un rol similar al de les cèl·lules existents un cop ha madurat (16).

4.3.1 Neurogènesi en la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp

S'ha determinat un MODEL DELS SIS ESTADIS DE DESENVOLUPAMENT d'acord amb la morfologia, habilitat proliferativa i expressió de marcadors moleculars clau de cada tipus cel·lular implicat (43) (Fig 5).

ESTADI 1: divisió inicial i proliferació lenta de les cèl·lules mare

Les cèl·lules mare de la ZSG (nestina⁺ GFAP⁺ i S-100 B⁻), anomenades "cèl·lules tipus 1", presenten una baixa habilitat proliferativa, es divideixen amb poca freqüència i ho fan asimètricament. Les cèl·lules filles són un tipus de CPN anomenades "cèl·lules

tipus 2" (59), les quals, al seu torn, acabaran originant cèl·lules glials i neurones (71) en la capa granular del gir dentat (72,73).

En quant als marcadors moleculars, aquestes expressen un marcador típic d'astroglia: GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), i al igual que els progenitors d'astròcits, expressen també una proteïna de filament anomenada Nestina (59), la qual és un marcador de cèl·lules progenitores del SNC que marca la terminació del cicle cel·lular i el inici de la diferenciació (74). D'altra banda, els astròcits ja madurs expressen, a més de la GFAP, una proteïna d'unió al calci: S-100 B (62) (marcador típic d'astròcit madur (74)), i no s'ha trobat fins al moment cap cèl·lula positiva per aquest marcador en el cicle de NG (62).

ESTADIS 2-4: Fase d'expansió: proliferació ràpida de les cèl·lules progenitores neuronals transitòries a unes de llinatge cada cop més restrictiu (neuroblasts)

Es donen tres etapes consecutives d'amplificació de CPN que difereixen entre elles pel seu potencial proliferatiu i el seu nivell de diferenciació neuronal. Culmina amb l'acabament del cicle cel·lular.

S'inicia amb les **cèl·lules tipus 2** (cèl·lules filles que provenen de la divisió inicial de la cèl·lula mare) que presenten una habilitat proliferativa molt alta. És llavors, per tant, quan es dona la major part de l'expansió cel·lular del procés i comencen a diferenciar-se (59,76).

Pel que fa als marcadors cel·lulars, es poden distingir dos subtipus de cèl·lules tipus 2: les 2a i 2b (76). Ambdues són GFAP⁻ i Nestina⁺, però les 2a són negatives i les 2b són positives pel marcador neuronal DCX (*double courtin*, proteïna associada als microtúbuls de cèl·lules precursors i neurones immadures) (59,76,77). Algunes poden expressar també PSA-NCAM (59) (forma polisialilada de la molècula d'adhesió cel·lular neuronal, glicoproteïna implicada en l'adhesió cel·lular i plasticitat sinàptica, entre altres. Indica un estat d'activitat precursora (78)). Així doncs se solapen marcadors glials (nestina) i neuronals (DCX, PSA-NCAM). Les tipus 2a (estadi 2) comparteixen característiques amb els astròcits i evolucionen donant lloc a les 2b (estadi 3) que presenten membranes més complexes i, ocasionalment, fins i tot es poden trobar canals de sodi (59).

Aquestes cèl·lules proliferen i evolucionen fins entrar en l'estadi 4 donant lloc a les **cèl·lules tipus 3**, considerades com neuroblasts i caracteritzades per una baixa activitat proliferativa i diversitat morfològica. Pel que fa a l'expressió de marcadors: són GFAP⁻, Nestina⁻, DCX⁺ i PSA-NCAM⁺, així doncs només presenten marcadors neuronals (79).

Cal destacar la heterogeneïtat existent entre la població de cèl·lules en divisió, tret molt característic d'aquest procés (18,80).

ESTADI 5: Etapa post-mitòtica, procés de selecció de supervivència i integració de les cèl·lules que han sobreviscut a la selecció en la xarxa neuronal preexistent

L'estadi comença quan les cèl·lules tipus 3 acaben el seu cicle mitòtic i s'entra en un estat transitori post-mitòtic amb unes cèl·lules granulars encara immadures. S'arriba a aquest estadi tan sols 3 dies després de la divisió de la cèl·lula mare inicial (43,81).

En quant als marcadors moleculars, són PSA-NCAM⁺, DCX⁺ i expressen també una proteïna d'unió al calci característica de neurones immadures anomenada calretinina i la proteïna nuclear específica de neurones en vertebrats (NeuN) (62,78,79).

Transcorreguts 4 dies després d'assolir aquest estat de desenvolupament es dona el procés de selecció, de manera que la població de cèl·lules granulars immadures es redueix dràsticament fins que, 1.5 setmanes després, arriba a un nivell que esdevé constant durant mesos i anys (81). Aquest comportament evidencia que l'expansió cel·lular es produeix a nivell de cèl·lules precursors, sobretot cèl·lules tipus 2, mentre que el reclutament per a la diferenciació final (i per tant, decisió de supervivència) es dona amb posterioritat, que resulta amb la mort per apoptosi de la majoria de cèl·lules.

Paral·lelament, les neurones immadures migren a l'interior de la capa granular i continuen diferenciant-se i desenvolupant-se en l'elongació axonal i en l'elaboració de l'arbre dendrític en la capa molecular (82). Uns deu dies després de la divisió inicial, l'axó neural creix i entra en contacte amb la regió diana de la CA3 de l'hipocamp (73, 83, 84). Aquesta formació de l'axò, no obstant, s'inicia abans de fer els primers contactes sinàptics de l'arbre dendrític, el qual comença a formar-se una setmana més tard i triga fins i tot mesos en finalitzar (82).

ESTADI 6: Últimes fases de desenvolupament i maduració post-mitòtic: increment gradual de la connectivitat neuronal i canvis en les propietats fisiològiques de la neurona

L'estadi comença quan les cèl·lules granulars immadures, durant el seu desenvolupament, deixen d'expressar calretinina i comencen a expressar una altra proteïna d'unió al calci anomenada calbindina, marcador característic de neurones madures. Aquest canvi es dona entre 2-3 setmanes després de la divisió inicial però no indica un estat de maduració absolut ja que calen entre 4-7 setmanes més per a què aquestes cèl·lules adquireixin l'activitat excitatòria completa i siguin totalment funcionals i indistingibles d'altres cèl·lules granulars antigues (69,85).

Finalment, el procés culmina amb la integració de les noves neurones granulars diferenciades en els circuits neuronals preexistents de la capa granular del gir dentat. Alguns autors defensen que aquestes neurones s'integren directament a l'estructura (81), mentre que altres, sostenen que reemplacen a les neurones antigues (86). S'estima que en el cervell humà adult, aproximadament 700 noves neurones s'incorporen diàriament al GD, és a dir, un 1,5% de la població cel·lular total de l'estructura a l'any, amb un lleuger descens durant l'envelliment (87).

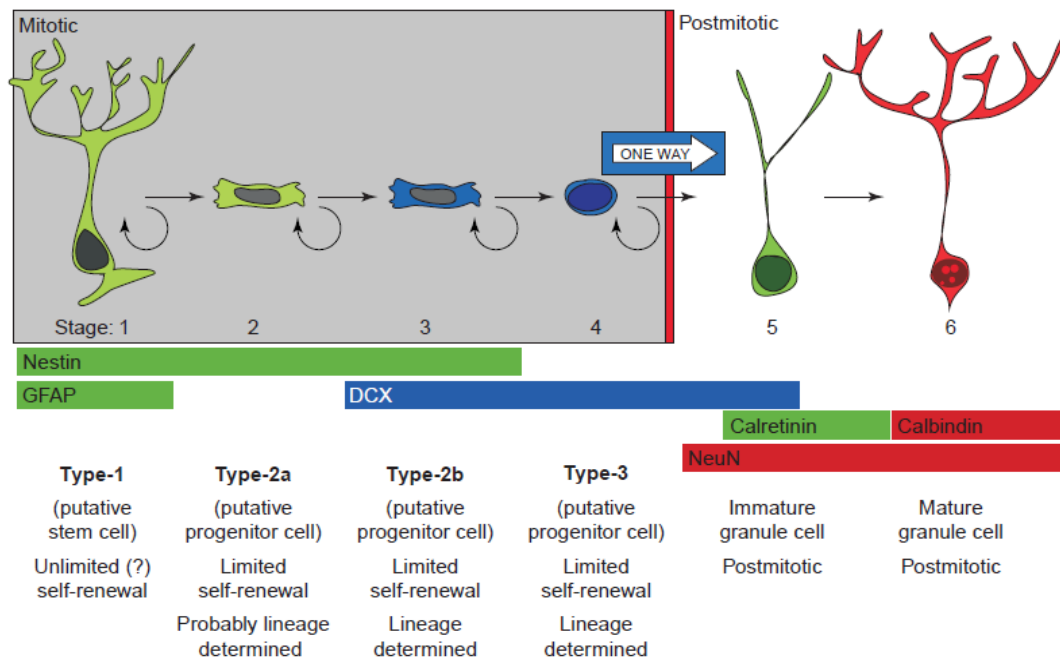


Fig 5: Representació gràfica del Model dels Sis Estadis de Desenvolupament proposats pel procés de neurogènesi adult en el gir dentat de l'hipocamp. Els diferents estadis de desenvolupament es poden identificar en base a la morfologia, habilitat proliferativa i expressió de marcadors de cada subtipus cel·lular (Nestina, GFAP, DCX, calretinina, calbindina i NeuN). El desenvolupament s'origina des de la cèl·lula mare (cèl·lula tipus 1, estadi 1) amb propietats de glia radial astrocítica anomenada cèl·lula tipus B. Aquesta progressa pels diferents estadis de progenitors d'amplificació transitoris (tipus 2a, 2b, i 3; estadis 2-4), els quals són més restrictius en llinatge i comencen a deixar d'expressar marcadors gials. Finalment s'arriba a un estat post-mitòtic amb una neurona immadura que expressa calretinina (estadi 5) i que arriba a neurona madura funcional expressant calbindina [43].

4.3.2 Neurogènesi en la zona subventricular dels ventricles laterals

Estudis quantitius indiquen que la taxa de neurogènesi en la ZSV de rata adulta és d'aproximadament 80.000 noves neurones granulars per bulb olfatori i dia. Cosa que representa el 1% de la població de cèl·lules granulars olfàctòries per dia (88).

ESTADI 1: divisió inicial i proliferació lenta de les cèl·lules mare

El procés s'inicia amb l'activació de les cèl·lules mare (cèl·lules tipus B, nestina⁺ GFAP⁺ i S-100 B⁻) de proliferació lenta residents en les parets dels ventricles laterals, que comencen el seu cicle cel·lular mitòtic donant lloc a les CPN (89).

ESTADI 2: Fase d'expansió: proliferació ràpida de les cèl·lules progenitores neuronals transitòries a unes de llinatge cada cop més restrictiu (neuroblasts)

Les CPN proliferen ràpidament fins donar lloc als neuroblasts. Un cop generats, aquests migren, a diferència dels precursors de la ZSG, una distància considerable (uns 5 mm en rosegadors i fins a 20 mm en primats) durant un període de 6 a 15 dies

fins arribar al bulb olfatori (90). Ho fan per la via rostral migratòria (VRM). La VRM és l'única estructura del cervell que posseeix una ruta llarga de migració. Aquesta s'inicia en la ZSV amb la partida dels neuroblasts i finalitza amb l'arribada de les noves interneurons al bulb olfatori (91,92).

Els neuroblasts presenten una morfologia allargada que els permet formar cadenes entre ells, la qual cosa facilita la seva migració cap al bulb mentre segueixen dividint-se (10,91,93). Aquestes cadenes de neuroblasts es desplacen a través d'una estructura tubular formada per astròcits, els quals secreten factors de creixement que afavoreixen la migració (10,93). A més, també serveixen de suport direccional i contribueixen a la supervivència dels neuroblasts evitant que aquests surtin de la via prematurament (47).

Els precursors, en el moment de la migració cap al bulb olfatori, comencen a expressar la proteïna calretinina (ho fan amb anterioritat en comparació amb la ZSG) (94).

ESTADI 3: Etapa post-mitòtica: procés de selecció cel·lular i integració en la xarxa neuronal preexistent de les cèl·lules que han sobreviscut a la selecció.

Un cop els neuroblasts arriben al nucli del bulb, surten de la VRM (se separen de les cadenes) i migren radialment cap a la capa granular i periglomerular. En aquell moment és quan es dona el procés de selecció per a la supervivència. Allí, com a neurones immadures, estenen ramificacions dendrítiques i més endavant es diferencien en dos tipus d'interneurons (cèl·lules granulars i periglomerulars) d'activitat gabaèrgica i dopaminèrgica (75,91,92).

ESTADI 4: Últimes fases de desenvolupament i maduració post-mitòtica: increment gradual de la connectivitat neuronal i canvis en les propietats fisiològiques de la neurona (Fig 6)

Integració sinàptica i maduració de les cèl·lules granulars i neurones periglomerulars en el bulb olfatori. Un cop integrades, estableixen contactes locals en el bulb i modulen de forma directa o indirecta el processament de la informació sensorial (95).

Les cèl·lules granulars esdevenen madures al cap de dues setmanes (95), mentre que les periglomerulars ho fan al cap de 4 (96), un període de temps similar al que, com hem vist, triguen les neurones de l'hipocamp en madurar (85). La majoria esdevenen neurones granulars gabaèrgiques que manquen d'axons i estableixen sinapsis dendrítiques amb cèl·lules de la regió. Una minoria, en canvi, esdevenen neurones periglomerulars gabaèrgiques, un petit percentatge de les quals són també dopaminèrgiques. Així doncs, el procés culmina amb la generació de diferents subtipus d'interneurons en el bulb olfatori segons la seva localització (97).

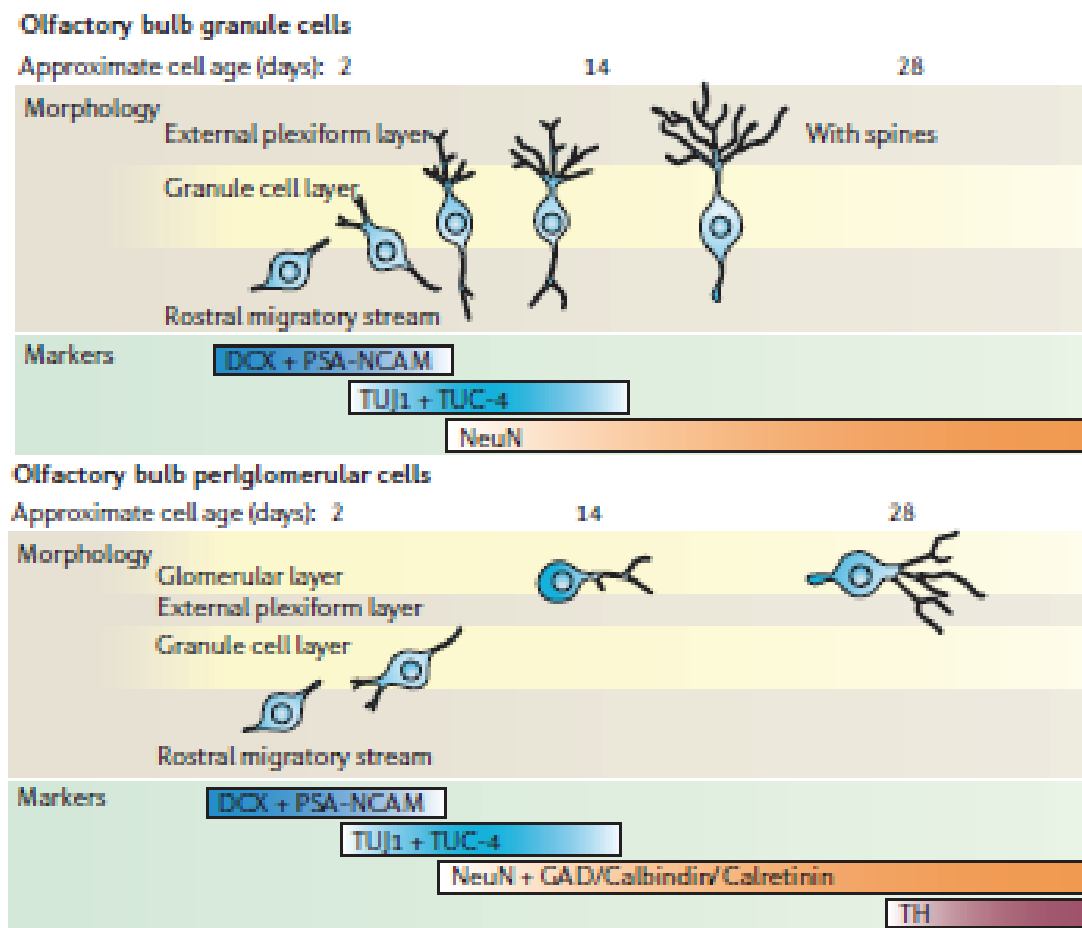


Fig 6: Maduració post-mitòtica de les noves neurones nascudes en el cervell adult a partir del procés de neurogènesi en la zona subventricular. Es representen els diferents estats anatòmics i funcionals de desenvolupament dels dos tipus neuronals del bulb olfatori, previs a l'estat de neurona madura. Es considera com un procés continu més que diferents estats separats i els temps de maduració poden canviar entre cèl·lules. Per aquest motiu, els temps que es representen corresponen a aquells en que s'ha pogut observar abans les propietats en un subtipus cel·lular donat. A més, la maduració no és completa als 28 dies, sinó que la complexitat i densitat dendrítica es completa als 4 mesos després del naixement de la neurona. Tot i així, les cèl·lules granulars maduren abans que les periglomerulars (i les del gir dentat). Es representen també els diferents marcadors moleculars que expressa cada subtipus cel·lular en cada estadi de desenvolupament. TUC4, proteïna medidora de la resposta a col·lapsina; TUJ1, beta-III tubulina, TH tirosina hidroxilasa. [16]

4.3.3 Neurogènesi en el cervell adult humà

Estudis molt recents estan posant en dubte que en els humans els neuroblasts de la ZSV migrin per la via rostral migratòria cap al bulb olfatori. De fet, en els experiments de Bergmann 2012 (98) es va mesurar l'edat de les neurones del bulb olfatori en l'humà adult i concloueren que l'edat correspon al moment del naixement de l'individu, establint doncs que es dona només en recent nascuts i es va perdent amb l'edat fins que, en l'edat adulta, és molt limitada o pràcticament inexistent.

Pot semblar intuïtiu que l'activitat en l'hipocamp es mantingui amb l'edat per tal de proporcionar una adaptació cognitiva a l'individu, mentre que la neurogènesi en el

bulb descendeixi degut a la menor dependència olfactiva en relació amb els nostres avantpassats. Tot i així, els precursors neuronals (neuroblasts) sí que es generen en el cervell humà adult, i no sols en l'hipocamp, sinó també en la ZSV. De fet, la dinàmica i el grau de generació d'aquests en totes dues regions és similar: hi ha un gran descens durant els primers mesos de vida, després una generació sostinguda fins que descendeix amb l'edat (13). La diferència amb la resta de mamífers no és el patró de generació de neuroblasts, sinó que aquests no migren de la ZSV cap al bulb olfactivi. Altres estudis apunten que els neuroblasts realment viatgen per la via rostral migratòria cap a regions més properes com l'estriat i/o el còrtex prefrontal. Amb tot, aquests resultats revelen la robustesa de la migració tangencial de les neurones immadures en la ZSV postnatal de l'humà (12,13).

4.4 Regulació del procés de neurogènesi en el mamífer adult

La neurogènesi no és un procés biològic estàtic, doncs la seva taxa és variable i depèn de diversos factors de regulació moleculars i de l'entorn (99). No es tracta d'un procés iniciat amb la proliferació de les cèl·lules mare i merament corregit per mecanismes de mort cel·lular durant les fases de selecció per la supervivència, sinó que es tracta d'un procés complex i altament regulat que es veu influenciat per molts més factors que afecten diferencialment a cada etapa del desenvolupament. Per tal de caracteritzar la regulació del procés en l'adult se solen estudiar tres paràmetres: el grau de proliferació, la supervivència i la diferenciació cel·lular (43).

Aquesta regulació és present tant en l'adult com durant el desenvolupament intrauterí (1). Donada la similitud entre ambdós processos és d'esperar que molts factors i vies intrínseques de senyalització i regulació estiguin altament conservades malgrat que la naturalesa dels factors extrínsecs pugui ser diferent.

A grans trets, el procés de NG en l'adult pot veure's regulat de forma positiva o negativa per diversos mecanismes i arrel de diferents estímuls que es classifiquen en dos tipus: factors interns, aquells que formen part de l'organisme, i externs, aquells que són aliens a ell (15).

Factors interns

El primer punt de regulació del procés es dona a nivell del propi **nínxol neurogènic**: factors específics i receptors regulen la generació de cèl·lules mare i la proliferació i diferenciació de les cèl·lules precursoras neuronals (100). De fet, sembla ser que el microentorn que regula la neurogènesi durant el desenvolupament postnatal es conserva i es manté en les dues regions neurogèniques del cervell adult, ZSV i ZSG.

Les cèl·lules mare neurals constantment interaccionen amb el seu entorn i, per tant, qualsevol alteració d'aquest pot donar lloc a conseqüències desastroses per les cèl·lules. Com ja hem vist, d'entre els molts components del nínxol neurogènic

trobem els **astròcits** i les **cèl·lules endotelials**. En general, les cèl·lules endotelials promouen l'autorenovació de les cèl·lules mare (101) i els astròcits les instrueixen per arribar a esdevenir neurones (102). Però, el que és més sorprenent és que s'ha vist que les cèl·lules mare no tenen un paper passiu, sinó que en certes condicions, poden diferenciar-se donant lloc a cèl·lules endotelials (103). D'aquesta manera, en una situació donada de necessitat, les pròpies cèl·lules mare poden poblar el seu propi nínxol de cèl·lules endotelials, les quals són factors que, a la vegada, promouen la generació de més cèl·lules mare, afavorint així el procés de neurogènesi.

a) Factors genètics

S'especula que l'expressió de determinats **gens proneurals (morfogens)** regulen el manteniment del nínxol, l'activació i l'elecció del destí dels precursors neuronals. Per exemple, l'expressió dels gens *Notch BMP, Eph/ephrins, Noggin i Shh* indueixen la neurogènesi i morfogènesi embrionària. Però és més, en les zones neurogèniques del cervell adult, també participen regulant la proliferació i diferenciació cel·lular (100). Durant el desenvolupament, el procés de neurogènesi està regulat també per un gran nombre de gens proneurals de la **família bHLH** (104), i alguns d'aquests gens s'expressen en diferent grau en les regions germinatives del cervell adult com a resposta a estímuls o lesions en dita zona (105).

Les cèl·lules mare expressen el gen que codifica per la proteïna morfogènica òssia, **BMP**, i els seus receptors. Aquesta proteïna BMP, en el cervell adult (i a diferència del cervell en desenvolupament) promou la diferenciació dels precursors neuronals cap a un estat glial i inhibeix la diferenciació neural (106). La presència d'antagonistes BMP com ara les molècules *noggin i neurogenésina-1*, expressades per les cèl·lules endotelials de la ZSV (106) i pels astròcits i cèl·lules granulars de la ZSG (107), respectivament, bloquen la senyalització donant lloc a una activació i increment de la neurogènesi, tot i que, seguidament, pot derivar a una depleció dels precursors i un conseqüent descens del procés (108).

En conclusió, malgrat que encara s'ha de caracteritzar la font de la majoria de senyals i alguns encara no s'han identificat, està clar que múltiples morfogens actuen de forma simultània sobre els precursors neuronals adults per determinar el balanç entre precursors quiescents i el nombre de noves neurones o astròcits en el cervell adult.

b) Factors de creixement

L'expressió de diferents factors de creixement (com ara VEGF, BDNF, IGF-1, FGF-2, EGF i HB-EGF, entre d'altres) estimulen la neurogènesi i determinen la mida de la població neuronal o glial tant en el cervell en desenvolupament com en l'adult (109). De fet, s'ha vist que en diferents models neurodegeneratius aquests es troben sobreexpressats com a factors protectors del dany neuronal o com a factors inductors

de la generació i diferenciació de noves cèl·lules que reemplacin a aquelles que estan lesionades (110).

Les regions on es dona molta activitat proliferativa sovint estan localitzades a prop de la vasculatura. És per això que se sospita que una regulació important del procés de neurogènesi prové dels vasos sanguinis. De fet, s'ha vist que el **factor de creixement endotelial vascular (VEGF)**, un dels factors tròfics que deriva de la vasculatura, és un important regulador donat que, un cop administrat intracerebroventricularment, provoca un increment del procés en ambdues zones del cervell adult, ZSV i ZSG (111).

c) Factors intracel·lulars

Factors reguladors del cicle cel·lular, factors de transcripció i reguladors epigenètics són els principals reguladors intracel·lulars de la neurogènesi en l'adult (112).

Per exemple, hi ha diversos **mecanismes epigenètics** que regulen i coordinen l'expressió genètica durant la neurogènesi adulta mitjançant mecanismes de metilació del DNA, modificació de les histones i RNAs no codificants (113). Per exemple, la **proteïna Mbd1** (*methyl-CpG-binding domain protein 1*) és una proteïna que s'uneix a les seqüències metilades de les illes C-p-G del DNA i inhibeix la transcripció en aquelles zones, per tant, inhibeix l'expressió de certs gens. Concretament, s'ha vist que suprimeix l'expressió del factor de creixement FGF-2 i de diversos miRNAs per controlar el balanç de proliferació i diferenciació durant la NG en l'hipocamp. (114)

d) Neurotransmissors (NT)

Tant el bulb olfatori com el gir dentat són regions que constantment reben informació d'altres regions cerebrals mitjançant diferents NT i neuropèptids. Actualment se sap que diversos neurotransmissors actuen com a factors de regulació del procés de neurogènesi en l'adult. Els més estudiats són el glutamat, la serotonina (5-HT), la noradrenalina (NA), l'àcid gamma-aminobutíric (GABA), l'òxid nítric (NO) i la dopamina (DA).

En primer lloc, el **glutamat** és considerat el NT més important per la funció de l'encèfal i, al seu torn, s'ha vist que regula la NG en l'hipocamp d'animals adults. Això no obstant, la majoria d'estudis se centren en els **receptors tipus NDMA** (N-metil-D-Aspartat) i han vist que quan s'administra NDMA disminueix la proliferació de les cèl·lules en l'hipocamp, mentre que quan s'administra un antagonista del receptor s'incrementa la neurogènesi (115,116). D'igual manera, altres receptors glutamatèrgics com el receptor AMPA (àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic) (117) o els metabotròpics (118), estan involucrats també en la regulació de la proliferació cel·lular en l'hipocamp.

En segon lloc, el paper inductor de la neurogènesi de la 5-HT s'ha demostrat en diversos estudis (120). S'ha vist que una lesió en el sistema serotoninèrgic o la

inhibició de la síntesi del NT resulta en una disminució de la proliferació cel·lular en la ZSV i ZSG de rata (121). Altrament, l'administració de D-fenfluramina (agent que indueix l'alliberació de 5-HT) incrementa el número de cèl·lules marcades amb BrdU en l'hipocamp, efecte que es pot blocar administrant prèviament un antagonista dels receptors 5-HT_{1A}. D'altra banda, l'administració d'un agonista del mateix receptor, incrementa el nombre de cèl·lules BrdU⁺ (121). Així doncs, s'evidencia el paper del receptor 5-HT_{1A} en la inducció de la neurogènesi en ambdues regions, no obstant, la serotonina també pot regular el procés a través d'altres subtipus de receptors com 5-HT_{2A} i 5-HT₇ del gir dentat i 5-HT_{2c} de la ZSV (122).

En tercer lloc, el sistema noradrenèrgic també està implicat en el procés. S'ha demostrat que al inhibir l'alliberació de NA, la proliferació cel·lular en l'hipocamp es veu disminuïda, mentre que la diferenciació o supervivència de les noves cèl·lules no es veu afectada (123). En contraposició, el bloqueig del receptor α_2 -adrenèrgic del bulb olfatori de rata amb un antagonista, no suposa canvis en el número de cèl·lules BrdU⁺ en la ZSV, però sí incrementa a la supervivència de les noves neurones (124). Amb tot, l'activació NA (i colinèrgica) de l'hipocamp, facilita la neurogènesi del gir dentat.

En quart lloc, el GABA sembla disminuir la proliferació en ambdues regions a través dels receptors GABA_A. En la ZSV, el GABA alliberat pels neuroblasts promou la seva migració per la via rostral migratòria a la vegada que inhibeix la proliferació dels precursors (125). Altrament, en la ZSG, el GABA promou el creixement dendrític, la formació sinàptica i la supervivència de les noves neurones (126).

En cinquè lloc, l'òxid nítric redueix la proliferació en la ZSV (127).

I per últim, el paper de la dopamina (DA) en la regulació del procés encara està per establir. S'ha demostrat experimentalment que una depleció del NT disminueix la generació de noves neurones en les dues regions neurogèniques (128). El mecanisme proposat per aquest fet és que la DA activa els receptors dopaminèrgics presents en les CPN. En contraposició, altres estudis suggereixen que, donat els efectes observats amb agonistes i antagonistes selectius, la DA disminueix la proliferació (129).

e) Hormones

Hormones tals com els estrògens endògens i la prolactina indueixen la neurogènesi. Alguns estudis indiquen que els estrògens estimulen la proliferació cel·lular dels precursors granulars en la ZSV (130,131) i que la taxa de NG en rata s'incrementa un 65% durant l'embaràs i assoleix el seu pic màxim just abans del part, coincidint amb els nivells de prolactina (130).

f) Edat

Com ja hem vist, és un dels factors més importants en la regulació del procés de neurogènesi. S'ha vist que a mesura que s'incrementa l'edat, en disminueix la taxa. En el cas de l'hipocamp, aquest fet s'ha evidenciat amb un menor número de

cèl·lules BrdU⁺ en el gir dentat a mesura que les rates (21) i primats (40) envelleixen, mentre que en la ZSV no s'ha observat aquest decrement, tot i així, sí s'ha vist un descens en el número de CPN en ratolins envellits (133).

g) Estats patològics

Un tret característic de la neurogènesi en l'adult és la seva gran sensibilitat enfront a estímuls fisiològics i patològics (aguts i crònics) en cadascun dels estadis de proliferació, desenvolupament, migració, maduració, integració i supervivència de les noves neurones (112). Però, el que és realment sorprenent és que les condicions patològiques no només afecten i promouen la NG en les àrees neurogèniques del cervell, sinó que també tenen un impacte en altres regions no neurogèniques, de manera que responen enfront una lesió o estímulo patològic permetent a les neurones recent nascudes que envaeixin i s'integrin en l'àrea lesionada (133). I, fins i tot, certs tipus específics de lesió també semblen promoure el procés a partir de progenitors neurals endògens en zones del cervell adult on el procés és extremadament limitat o inexistent en condicions normals (134).

En general, la majoria de lesions cerebrals com ara un **atac epilèptic o un ictus** incrementen la proliferació cel·lular dels progenitors en ambdues regions (133) i, de vegades, provoquen la migració de les noves neurones a les zones lesionades. Tot i així, en la ZSG, també poden suposar una migració equivocada de les neurones a l'hilus, un creixement aberrant de les dendrites i alteracions en les propietats electrofisiològiques de les cèl·lules granulars (136). Un altre inductor potent de la proliferació cel·lular en la ZSV i ZSG és un episodi focal o global d'**isquèmia** (133).

L'efecte de la **neurodegeneració** és molt complexa. Durant la degeneració neuronal, s'activen mecanismes immunològics que resulten amb l'activació de la microglia i astroglià resident, i amb una infiltració perifèrica de macròfags que alliberen citocines, quimiocines, NT i espècies reactives d'oxigen, els quals, al seu torn, afecten en diversos aspectes de la neurogènesi (136). Per més informació *veure apartat 4.6*.

En models animals de **diabetis** s'ha vist que la malaltia provoca un descens de la proliferació en la ZSG a través de mecanismes mediatos per glucocorticoides (137).

I per últim, un altre regulador negatiu del procés és la **inflamació** induïda per lesió, degeneració neurològica i irradiació (138).

Factors externs

a) Ambientals

El procés està dinàmicament regulat per diversos factors com ara l'activitat física, un ambient enriquit i l'aprenentatge. D'una banda, l'**exercici físic** incrementa la proliferació cel·lular (139) i promou la vascularització i producció de factors de creixement (140). D'altra banda, estudis (141) demostren que el procés de selecció

de supervivència de les neurones està positivament regulat per factors estimulants cognitius com ara viure en un **ambient enriquit** (142), cosa que es tradueix en un major nombre de cèl·lules que es diferencien a neurones en la ZSG del gir dentat. Altrament, l'**aprenentatge** de tasques que depenen de la zona neurogènica de l'hipocamp modulen la neurogènesi en dita regió (112). Així, sotmetre als animals a tasques d'aprenentatge específiques regula la supervivència de les noves neurones i els efectes resultants, que poden ser positius o negatius, depenen de la fase d'aprenentatge i de l'estadi de desenvolupament de les cèl·lules (66).

En contraposició, l'**estrès crònic** deriva en un descens de la proliferació cel·lular en la ZSG, degut sobretot, a l'efecte dels glucocorticoides, els quals s'alliberen en resposta a l'estrès. Així doncs, la taxa de NG es troba disminuïda o, fins i tot, inhibida totalment (143). L'efecte de l'**estrès agut** sobre la proliferació i supervivència de les neurones, en canvi, depèn de l'espècie i sexe de l'animal (144).

Per últim, la **privació del son**, al seu torn, també redueix la proliferació de les cèl·lules precursors del gir dentat (145).

b) Substàncies farmacològiques

Diferents fases de la NG adulta poden estar regulats per substàncies farmacològiques, les quals actuen, sobretot, modulant els diferents sistemes de neurotransmissors (146).

Per exemple, els **antidepressius** emprats en la pràctica clínica suposen canvis en els nivells de serotonina i noradrenalina que es tradueixen en un increment de la proliferació dels precursors, acceleren el desenvolupament dendrític i potencien la supervivència de les neurones recent nascudes en l'hipocamp (147,148).

c) Drogues d'abús (veure apartat 4.7)

Tot i que se sap molt fins al moment sobre els reguladors dels diferents estadis de la neurogènesi adulta, queden moltes qüestions per resoldre. Està clar que cada fase de desenvolupament pot estar regulada per diversos estímuls i que, la sensibilitat amb la que reaccionen a cadascun d'ells no és la mateixa. Quin és, llavors, l'ordre jeràrquic dels diferents factors reguladors? Cada estímul, al seu torn, pot tenir també diversos *targets*, de manera que no tots els subtipus cel·lulars responen igual enfront un mateix estímul neurogènic. Per una altra part, diferents estímuls poden també interactuar entre sí i afectar al resultat final del procés.

En general, la regulació de la neurogènesi adulta és complexa i l'efecte depèn del temps, la dosi, la duració, paradigmes específics, els models animals emprats (edat, sexe, fons genètic) i dels mètodes d'anàlisi. Per tenir un millor i major coneixement dels mecanismes de regulació és necessari, però, aprofundir en el coneixement del propi procés i fer un anàlisi de cadascun dels tipus cel·lulars que hi participen, tant a nivell de transcriptoma, proteoma i estat metabòlic i epigenètic. En realitat, el

procés de neurogènesi i la seva regulació només es poden entendre si combinem el recompte cel·lular quantitatiu (de proliferació, supervivència i diferenciació) amb una avaluació qualitativa del procés de desenvolupament neuronal. De manera que, saber com un estímul influeix qualitativament en el procés és tant important i significatiu com conèixer el número de noves neurones generades.

4.5 Funcions del procés de neurogènesi en el mamífer adult

Com ja hem vist, la finalitat de la neurogènesi embrionària és poblar el cervell en desenvolupament de neurones, condició necessària per la viabilitat de l'individu. Ara bé, un cop formades les neurones, quina funció té la neurogènesi adulta? Un cop les cèl·lules han madurat, què fan? Perquè estan allí?

El cervell adult és una estructura plàstica, és a dir, és capaç de canviar la seva estructura i la seva funció durant la maduració, aprenentatge, reptes, canvis ambientals i processos patològics. Així doncs, el comportament del SNC adult és flexible, s'adapta enfront un entorn variable i ho fa mitjançant canvis morfològics i estructurals a molts nivells del SNC, des del nivell molecular fins a nivell de sistema, incloent el canvi de tota una cèl·lula sencera (16). Un exemple clar de **mecanisme de plasticitat estructural** és el procés de neurogènesi en l'adult pel qual durant tota la vida es van generant noves neurones que s'incorporen de forma integral en els circuits funcionals existents (9). Es tracta d'un mecanisme plàstic que permet optimitzar el rendiment del cervell en un ambient i situació donada, essent així una resposta adaptativa als reptes imposats per l'entorn de l'individu i/o el seu estat fisiològic. Ara bé, a més de ser un important component de plasticitat estructural del cervell a nivell de cèl·lules senceres, els beneficis funcionals que suposa són encara motiu de debat (1,16,18).

Primerament, les neurones nascudes han de ser capaces de participar en les funcions del cervell adult a tres nivells: a nivell cel·lular, a nivell xarxa neuronal i a nivell funcional de l'estructura en el sistema nerviós (41).

A **nivell cel·lular**, la seva funció sembla evident: són neurones i per tant, és d'esperar que la seva funció sigui transmetre impulsos nerviosos (potencials d'acció) a altres neurones o òrgans efectors. Però, són neurones especials? Tenint en compte el procés de maduració de les mateixes, presenten propietats especials que difereixen de les de les neurones preexistents, cosa que pot donar a pensar que la seva funció cel·lular és diferent a la de les neurones antigues, o almenys, de forma transitòria. Per exemple, en el gir dentat adult, les cèl·lules granulars joves mostren una major propensió a la plasticitat sinàptica en comparació a les cèl·lules ja existents (149,150). És més, les cèl·lules granulars i periglomerulars del bulb olfatori mostren una membrana amb propietats marcadament diferents envers les

antigues (90,96), a part d'una major plasticitat en resposta a la privació sensorial (151).

En canvi, suposant que les noves neurones simplement reemplaçin aquelles més antigues, la funció de la neurogènesi adulta a nivell cel·lular dependria també, al seu torn, de les cèl·lules a les quals reemplaçen (16).

A **nivell de xarxa neuronal**, les noves neurones estableixen connexions pre/post-sinàptiques amb les més antigues, responen als estímuls sinàptics i queden totalment integrades en els circuits. Per tant, han de contribuir en les funcions i propietats que duen a terme les cèl·lules en conjunt. Aquestes xarxes són capaces de codificar una gran quantitat d'informació i d'emmagatzemar operacions. El model de neurogènesi suggereix que aquestes noves cèl·lules són responsables de certes propietats específiques del circuit local i que, per tant, puguin ser vitals en algunes d'aquestes funcions (16).

Per últim, és a **nivell de sistema** on més es manifesta quina és la finalitat de la neurogènesi adulta. Tenint en compte les dues regions cerebrals on es duu a terme: hipocamp i bulb olfactori, i els processos més importants que allí es desenvolupen: **aprenentatge i memòria vers l'olfacció** (funcions perceptives i mnemòtiques), respectivament, les investigacions han anat orientades a determinar la importància i repercussió de la neurogènesi sobre aquests processos. I malgrat que la relació "generació de cèl·lules - processos cognitius/comportament" és complexa, s'està estudiant com pot contribuir la plasticitat que ofereix el procés en la conducta de l'individu (1,16,18).

Paper en el processament i emmagatzematge de la informació

Després del descobriment inicial del procés de neurogènesi postnatal en l'hipocamp d'una rata, AtIman ja va suggerir que les noves neurones podien tenir un paper crític en l'aprenentatge i la memòria (152). Actualment, se sap que el rendiment de l'individu en algunes de les tasques dependents de l'hipocamp està relacionat amb el grau de neurogènesi (1,16,18).

Una bona manera de discernir la relació entre la neurogènesi i aquests processos funcionals seria determinar si existeix una correlació entre el rendiment de l'individu en el processat / emmagatzematge de la informació i la taxa de neurogènesi en un moment donat (mesurada amb dos índex: nombre de noves neurones generades i el grau de supervivència de les mateixes) (16). Fent això es pot veure que: en el fenomen de **condicionament del parpelleig** (*veure Annex I.C*), la seva adquisició es correlaciona amb les mesures de supervivència de les noves cèl·lules (153). Però en canvi, existeix una gran controvèrsia pel que fa a la implicació del procés de NG en l'aprenentatge i memòria espacial avaluat amb el test del **Laberint Aquàtic de Morris** (LAM) (*veure Annex I.D*). Alguns estudis demostren que els paràmetres del LAM varien amb la proliferació i supervivència de les neurones recent nascudes (154), però altres estudis similars demostren el contrari (155). Alguns científics atribueixen aquestes

diferències en els resultats a factors de confusió que són forts reguladors del procés, com ara l'estrès (156) i l'activitat física (139). Altres ho atribueixen a que les relacions entre la NG i els resultats del LAM són complexes, degut a que depenen, al seu torn, del grau d'entrenament dels animals i del grau de maduresa de les cèl·lules en cada fase d'aprenentatge (157). Així doncs, el paper de la NG en l'aprenentatge roman encara poc clar.

Altres estudis han demostrat la relació entre el procés de NG i els processos d'aprenentatge i memòria de forma indirecta. Per exemple, a nivell cel·lular i de xarxa neuronal, estímuls que incrementen (com ara l'exercici (158)) o disminueixen (animals *knock-out* Mbd1 (159)) la NG adulta, causen en el gir dentat, respectivament, un increment i un descens de la potenciació a llarg termini, fenomen que permet augmentar la connexió i eficiència sinàptica i es considera com un dels mecanismes cel·lulars principals que intervenen en el procés d'aprenentatge i consolidació de la memòria. A nivell de sistema, tant l'activitat física (158) com la riquesa ambiental (160), incrementen la NG i el rendiment de l'hipocamp en tasques d'aprenentatge. Mentre que l'edat (154), l'estrès (161) i animals *knock-out* Mbd1 (159) s'associen amb dèficits d'aquest fenomen.

En el bulb olfatori, la riquesa olfactiva es relaciona amb un increment de la supervivència de les cèl·lules i una major memòria olfactiva (162). En contraposició, la discriminació olfactiva descendeix amb manipulacions genètiques que redueixen el nombre de noves cèl·lules en el bulb (163).

Per últim, l'enfocament més directe per avaluar la funció de la NG ha estat suprimint específicament aquest procés mitjançant estratègies farmacològiques, radiològiques i genètiques. En el primer estudi d'aquest caire (164), es va blocar el procés administrant als animals un **agent metilant antimitòtic** (MAM, *methylazoxymethanol acetate*) durant dos setmanes, per tal d'aturar la divisió i proliferació de les cèl·lules precursors del GD. El resultat va estar una reducció considerable del nombre de neurones en el GD i un dèficit en la tasca d'aprenentatge (*condicionament de parpelleig*) i en la memòria dependent de l'hipocamp (fonamentalment memòria espacial). Malgrat això, la substància no és totalment específica i només redueix el nombre de noves neurones fins un 20% del seu nivell basal. Per tant, no es pot descartar que el dèficit d'aprenentatge estigui relacionat amb una zona no neurogènica del hipocamp. A més, no perjudica totes les tasques dependents de l'estructura (165), de manera que, o algunes depenen més de la NG que altres o bé els efectes adversos del MAM són específics només per certes funcions. Amb tot, no es pot diferenciar entre les tasques d'aprenentatge que depenen de l'hipocamp d'aquelles que depenen de la zona neurogènica de l'hipocamp.

Estudis posteriors van utilitzar les **radiacions** i l'**enginyeria genètica** (animals modificats genèticament) per suprimir el procés i van aportar una evidència clara de que la NG és necessària per algunes tasques desenvolupades pel bulb i hipocamp, però no per totes (166).

S'ha demostrat també, que un procés aberrant de NG pot conduir a estats fisiopatològics, per exemple: contribueix a l'aparició d'epilèpsia i pot suposar discapacitats cognitives a llarg termini (167).

En conclusió, malgrat les controvèrsies existents, molts dels estudis de correlació i d'intervenció suggereixen, en més o menys mesura i certesa, que el procés de neurogènesi del gir dentat i del bulb olfactori té un paper important en les funcions de dites estructures. Però és necessària més investigació. A més, cal tenir en compte que és d'esperar que hi hagi discrepàncies si considerem que cada experiment presenta variables diferents (animals utilitzats (edat, sexe, fons genètic), temps d'avaluació, etc).

Gràcies a les noves tecnologies, una nova manera de manipular de forma específica i completa la NG adulta és mitjançant **models de simulació computacionals**. Aquests permeten predir com es veuran afectades les diferents xarxes neurals degut a la incorporació de les noves neurones al circuit (168). En el model del bulb olfactori, concretament, s'ha vist que la introducció de noves cèl·lules en el circuit incrementa la discriminació olfactiva en un entorn canviant (169). Altrament, en el GD, millora el record de la informació minimitzant la interferència amb conceptes similars (170). I, en termes d'aprenentatge, la incorporació de la nova neurona pot amenaçar la fidelitat de la informació emmagatzemada. Tot i així, si la xarxa posseeix mecanismes homeostàtics per compensar una excitabilitat incrementada de la nova cèl·lula, l'addició d'una nova neurona excitatòria podria proporcionar capacitat d'emmagatzematge de nova informació, i, simultàniament, facilitar l'oblit d'antigues memòries (171). Certs estudis experimentals, però, van donar a conèixer que les noves neurones no estan directament relacionades amb l'emmagatzematge de la memòria. De manera que s'especula que el procés simplement reflecteix un procés adaptatiu del cervell enfront futures demandes (172).

Aquests models computacionals són possiblement la millor evidència actual de la funció del procés de NG adult, que en lloc de (o a més de) participar en l'emmagatzematge de nova informació, proporciona una xarxa neuronal amb la capacitat d'adaptar-se als futurs canvis externs (172). Així doncs, no sols parlem d'un mecanisme de plasticitat estructural, sinó d'una forma de **metaplasticitat**: canvis en el cervell que permeten i faciliten que es donin, posteriorment, més canvis (16). I el que és més important, aquestes eines computacionals permeten guiar futurs experiments destinats a resoldre específicament noves hipòtesis, cosa que ens ajudarà a identificar noves funcions desconegudes del procés en condicions fisiològiques, així com ens permetrà saber com contribueix l'aberració del procés en desordres mentals, malalties neurodegeneratives i en la reparació de lesions cerebrals.

4.6 Paper del procés de neurogènesi en el camp de les malalties neurodegeneratives

La generació i la mort de noves neurones té un paper crític en el desenvolupament i manteniment del cervell embrionari i adult. En malalties cròniques neurodegeneratives tals com l'Alzheimer, el Parkinson o la malaltia de Huntington, aquests processos s'han vist significativament alterats. Un procés de NG aberrant suposa, a més de la pèrdua de neurones existents sense reemplaçament, que la capacitat endògena del cervell per renovar-se es troba compromesa o s'ha perdut i pot contribuir a l'aparició de desordres mentals en joves i adults (173,174).

Les malalties neurodegeneratives (MND) es caracteritzen per una pèrdua gradual de diferents poblacions neuronals. Les neurones afectades presenten un dèficit en la transmissió sinàptica i aquest fet s'associa amb la conseqüent degeneració axonal i dendrítica (175). Malgrat que cada malaltia presenta una simptomatologia específica derivada de la degeneració neuronal que inclou alteracions en certs NT específics, la simptomatologia observada en estadis primerencs de les tres MND (Parkinson, Alzheimer i malaltia de Huntington) freqüentment inclou: depressió, ansietat i disfunció cognitiva i/o olfactiva (per exemple, anòsmia), símptomes estretament lligats amb la funció de l'hipocamp i el bulb olfatori, les dues àrees neurogèniques del cervell adult (19,20). Per tant, alguns d'aquests primers símptomes poden estar lligats amb un estat deficitari de NG, degut a una major vulnerabilitat en aquestes regions causada pels processos neurodegeneratius subjacents (176,177).

Partint d'això, si induïm la generació de noves neurones, podria ser una estratègia per reemplaçar les neurones que moren durant el progrés de les malalties neurodegeneratives? Podríem així frenar el progrés de la malaltia o, fins i tot, solventar el problema? És més, i la teràpia cel·lular substitutiva? El trasplantament de noves neurones a les regions degenerades que siguin capaces d'integrar-se i sobreviure en un microambient hostil neurodegeneratiu i esdevenir funcionals podria ser també una opció a considerar. Tots aquests fronts dins de la medicina regenerativa romanen encara oberts i a la mira dels grans científics.

S'ha estudiat el procés de NG en els tres casos de malaltia, tant en humans mitjançant anàlisis post-mortem, com amb models animals de la malaltia (animals transgènics). Cal dir, però, que al comparar els resultats entre els diferents estudis realitzats amb models animals, els resultats són molt diversos i variables. Això és degut, inevitablement, a què hi ha diferències en els promotors utilitzats en cada estudi, l'edat dels animals, l'edat d'aparició de la malaltia, el grau d'expressió del transgen, els nivells de NT i grau de sobreexpressió/pèrdua de la proteïna que causa la malaltia (173).

La **malaltia de Parkinson** és el trastorn motor més comú, amb una prevalença cada vegada major degut a l'envelliment de la població (178). Es manifesta amb

síntomes motors (bradicinèsia, rigidesa, tremolors, inestabilitat postural...) relacionats amb la degeneració de les neurones dopaminèrgiques de la substància *nigra*, i no motors (depressió, ansietat, dèficits cognitius/olfactoris i disfunció autonòmica) relacionats amb altres sistemes de neurotransmissors (173).

En anàlisis post-mortem de pacients amb Parkinson s'ha vist una **reducció significativa en la proliferació** dels progenitors en la ZSG i ZSV, possiblement a conseqüència de la pèrdua d'innervació dopaminèrgica (128). Ja que, tal i com s'ha esmentat anteriorment, en rosegadors, la depleció experimental de dopamina disminueix la proliferació dels progenitors en ambdues regions cerebrals (128,179). En el model animal de la malaltia, la proliferació en la ZSV s'ha vist reduïda en un 40% (179) i, al mateix torn, s'ha observat una petita generació de noves neurones en la substància *nigra*, on, en condicions normals, la neurogènesi és extremadament limitada o inexistent (50).

La **malaltia d'Alzheimer** és la forma de demència més comuna durant l'edat adulta. Les manifestacions de la malaltia inclouen dèficits olfactors, alteracions en la memòria i deteriorament cognitiu. I es donen com a conseqüència de la neurodegeneració (pèrdua neural i sinàptica) del sistema límbic, còrtex i prosencèfal basal (173).

Els estudis amb pacients humans amb Alzheimer encara no han estat capaços de determinar amb claredat la relació entre la patologia i el procés de NG. Mentre que estudis mostren un increment en l'expressió de marcadors de neurones immadures (DCX, PSA-NCAM) en la ZSG (180), altres han demostrat un increment en la gliosi (181) i un descens en el nombre de cèl·lules DCX⁺ (182). En el model de la malaltia amb un ratolí transgènic, s'ha vist un augment en la incorporació de cèl·lules BrdU⁺ i en l'expressió de marcadors de neurones immadures en la ZSV i ZSG, fins i tot abans de la pèrdua neuronal i de la deposició i formació de les plaques amiloides (180). Tot i així, també hi ha una gran controvèrsia ja que altres estudis demostren que el procés de neurogènesi es veu alterat negativament (183).

La **malaltia de Huntington** és una malaltia genètica autosòmica dominant causada per una mutació en el gen que codifica per la proteïna Huntingtina. És el trastorn motor hiperkinètic hereditari més comú (184). La simptomatologia es caracteritza per moviments involuntaris progressius, afectacions cognitives i símptomes afectius (185). El deteriorament olfactiv i cognitiu, així com la depressió, són també freqüents i precedeixen als símptomes motors durant molt de temps (20). La simptomatologia és deguda al dany neuronal que causen els agregats de la proteïna mutada en certes regions del cervell (186).

Estudis demostren que pacients amb la malaltia de Huntington presenten un increment significatiu en la proliferació cel·lular en la ZSV (187) però no en la ZSG (188). En els models animals de la malaltia, en canvi, els resultats són contradictoris: en els estudis de Tattersfield (189) s'ha vist un increment en la incorporació de noves

neurones BrdU⁺ en la ZSV i, algunes d'elles, migren a l'estriat lesionat. En contraposició, altres estudis demostren no hi ha cap canvi en la proliferació cel·lular de la ZSV però sí una reducció del nombre de noves neurones generades en el bulb olfatori, donat que s'han descrit agregats de huntingtina en les neurones madures de la capa granular i periglomerular de l'estructura (190). D'altra banda, en el gir dentat s'ha descrit una disminució en la proliferació (191) i un descens en el número de neuroblasts i neurones immadures (192).

Aquestes evidències suggereixen que el procés de neurogènesi en el cervell adult podria ser un mecanisme compensatori intrínsec per corregir i reparar el SNC en degeneració. Tot i així els mecanismes cel·lulars i moleculars pels quals una lesió indueix la proliferació, migració i/o diferenciació cel·lular són encara desconeguts. Se sap, però, que hi ha certs gens i factors que són clau en certes malalties neurodegeneratives i que, a més, estan fisiològicament involucrats en la modulació del procés de plasticitat cerebral (193).

És urgent, per tant, aprofundir en el coneixement i resoldre les preguntes plantejades per tal de poder treure profit d'aquesta neurogènesi limitada induïda per una lesió i poder arribar a plantejar estratègies terapèutiques dirigides a estimular la plasticitat neuronal per tractar la simptomatologia neuropsiquiàtrica associada a aquestes malalties i així reparar funcionalment el sistema nerviós.

4.7 Afectació del procés de neurogènesi pel consum de drogues d'abús

L'exposició repetida a drogues d'abús resulta amb canvis neuroadaptatius en regions específiques del cervell que es correlacionen amb una pèrdua de la capacitat de l'individu de controlar el consum de la substància, parlem llavors, de drogoaddicció (194).

La neurobiologia de l'addicció es relaciona amb el sistema mesocorticolímbic del cervell, que inclou l'àrea tegmental ventral, el nucli accumbens i l'escorça prefrontal. Tot i així, l'hipocamp es troba situat molt a prop d'aquestes estructures i està innervat densament i de forma recíproca per l'escorça prefrontal. Per tant, es creu que aquesta estructura pot estar també involucrada en el procés d'addicció i és d'especial interès conèixer els canvis neuroadaptatius que es donen en l'hipocamp induïts pel consum de substàncies d'abús (195).

Diversos estudis realitzats evidencien l'afectació del procés de neurogènesi en l'adolescent i en l'adult degut al consum de diferents drogues d'abús. Per exemple, l'alcohol (22), els opiacis (heroïna i morfina) (196), les amfetamines (23) i l'MDMA

(24) poden afectar de forma negativa a la NG de l'hipocamp disminuint la taxa de proliferació dels precursors cel·lulars i/o disminuint la seva supervivència.

Altres estudis han demostrat, també, que l'exposició crònica a **cocaïna** disminueix la proliferació dels precursors neuronals del gir dentat sense afectar a la taxa de supervivència ni al nivell de maduració (197,198). També s'ha vist que l'administració puntual de cocaïna a altes dosis pot atenuar la producció i el desenvolupament de les noves neurones en l'hipocamp i reduir la memòria de treball (195).

Els **cannabinoides**, al seu torn, semblen promoure tant la NG en l'adult com en l'embrió i produeixen efectes ansiolítics i antidepressius (199). Tot i així, estudis recents demostren un efecte contrari i dependent del sexe, segons el qual, l'administració d'un agonista cannabinoide disminueix la densitat de cèl·lules marcades amb BrdU en el GD de les rates mascles, però no de les femelles (200).

A més, aquests efectes no es donen només en el consumidor adolescent o adult, sinó que l'exposició prenatal dels ratolins a **MDMA** també afecta negativament en la proliferació i supervivència dels precursors neuronals del gir dentat de l'hipocamp, un cop l'individu és adult (201). Així com l'associació MDMA + etanol durant l'embaràs, encara que sigui en curts períodes de temps, disminueix en rata la proliferació dels precursors neuronals dels seus descendents i els causa anormalitats significatives en el desenvolupament neurocognitiu (202).

En conclusió, queda palesa la influència de les drogues d'abús sobre el procés de neurogènesi en diferents graus i per diferents mecanismes.

4.8 Resultats experimentals: efecte del consum de mefedrona

En els estudis realitzats pels pioners del descobriment del procés de neurogènesi en el cervell mamífer adult, Joseph Altman i els seus col·laboradors van utilitzar **timidina tritiada (timidina-³H)** per marcar les cèl·lules en divisió, seguit d'una detecció per autoradiografia (3,203). Tot i així, una limitació d'aquesta tècnica era que no es podia demostrar de forma inequívoca el fenotip neuronal de les cèl·lules noves generades.

Va ser a la dècada dels 1990 quan es va utilitzar per primera vegada **5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)** com a marcador i traçador de llinatge (21) per l'estudi de la neurogènesi adulta, seguit d'una immunohistoquímica i posterior observació amb microscòpia confocal o de fluorescència. Aquesta tècnica, originalment aplicada a estudis de desenvolupament, va permetre determinar la identitat cel·lular de les noves neurones generades i va suposar un gran avenç en el coneixement d'aquest camp.

La BrdU actua com un traçador exogen de cèl·lules que, en combinació amb altres marcadors neuronals endògens, permet demostrar la neurogènesi en el SNC adult. La BrdU és un marcador de la replicació del DNA ja que, estructuralment, és un anàleg de timidina (Fig 7) que s'incorpora en el DNA de les cèl·lules que s'estan dividint i que per tant, sintetitzen DNA. Un cop incorporat en el nou material genètic, la BrdU es manté estable i es transmet a les cèl·lules filles mitjançant la divisió cel·lular. Per tal de visualitzar-ho, es pot fer una tècnica d'immunohistoquímica. Segons quin sigui l'objectiu de l'estudi i la informació d'interès, el temps de supervivència dels animals serà diferent per tal d'obtenir dades de les fases específiques de la neurogènesi: proliferació, diferenciació i maduració (33).

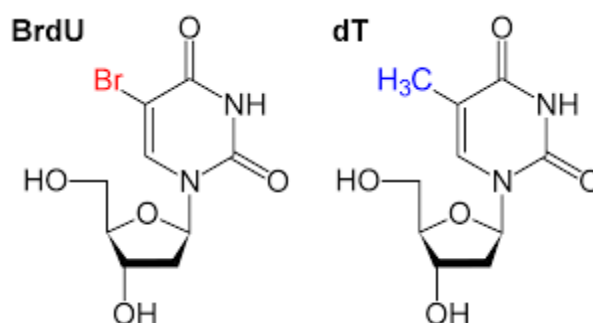


Fig 7: Estructura química de la timidina dT (nucleòsid format per la unió d'una base nitrogenada, timina, i un anell de desoxiribosa) i del seu anàleg, la BrdU (204).

Malgrat tot, la BrdU no dona per si mateixa cap indicació del fenotip de la cèl·lula marcada, és per això que es combina amb altres marcadors endògens com, en aquest cas, la proteïna nuclear específica neuronal de vertebrats (NeuN). Aquesta proteïna és un excel·lent marcador de neurones madures tant del sistema nerviós central com perifèric, tant en l'embrió com en l'adult, i és important en la determinació del fenotip neuronal (33,205).

Tal i com s'ha comentat anteriorment (*veure apartat 4.7*), s'ha evidenciat en nombrosos estudis l'afectació del procés de neurogènesi pel consum de diverses drogues d'abús tals com l'etanol, els opíodes, l'amfetamina, l'MDMA, la cocaïna i el cannabis. Tot i així, poc és sabut fins al moment de l'afectació del procés pel consum de les noves catinones sintètiques, com ara la mefedrona, en associació amb l'alcohol. Donat l'elevat consum d'aquesta droga entre la població, resulta imprescindible conèixer si la substància interfereix en el procés i, en cas positiu, de quina manera.

El present experiment ha consistit en avaluar el procés de neurogènesi en el gir dentat de l'hipocamp de ratolins adolescents després de l'administració repetida de mefedrona (sola i amb etanol) als animals. En el disseny de l'experiment s'han incorporat quatre grups de tractament: grup control (sèrum fisiològic), etanol,

mefedrona i etanol concomitantment amb mefedrona. Aquest disseny de l'estudi ens permetrà, a més, veure si el possible efecte sobre la neurogènesi que pot provocar la mefedrona, es potencia o no amb el consum d'etanol.

28 dies després del tractament, els animals es van sacrificar i els talls dels seus cervells es van sotmetre a una immunohistoquímica i es van marcar per BrdU i NeuN. Al fer-ho 28 dies després de la injecció de BrdU, i amb el marcador NeuN, ens assegurem que les cèl·lules noves que s'han generat presenten un fenotip corresponent a una neurona ja madura.

Després de quantificar el nombre de cèl·lules en el gir dentat que presentaven doble marcatge es va fer una ANOVA amb els resultats: "cèl·lules BrdU positives X índex de volum en el gir dentat", i es va veure un efecte de la variable tractament [$F(3,19)=9.373$; $p<0.01$]. El test post-hoc de Tukey va mostrar un descens significatiu en el nombre de noves cèl·lules formades en els animals tractats amb mefedrona ($75 \pm 10\%$, $p<0.05$) i amb mefedrona + alcohol ($46 \pm 2.75\%$, $p<0.001$) respecte el grup control. És més, també es van trobar diferències significatives entre els dos grups tractats amb mefedrona ($p<0.05$). El recompte de BrdU dels animals tractats amb etanol sol no es va veure afectat. (Fig 8,9)

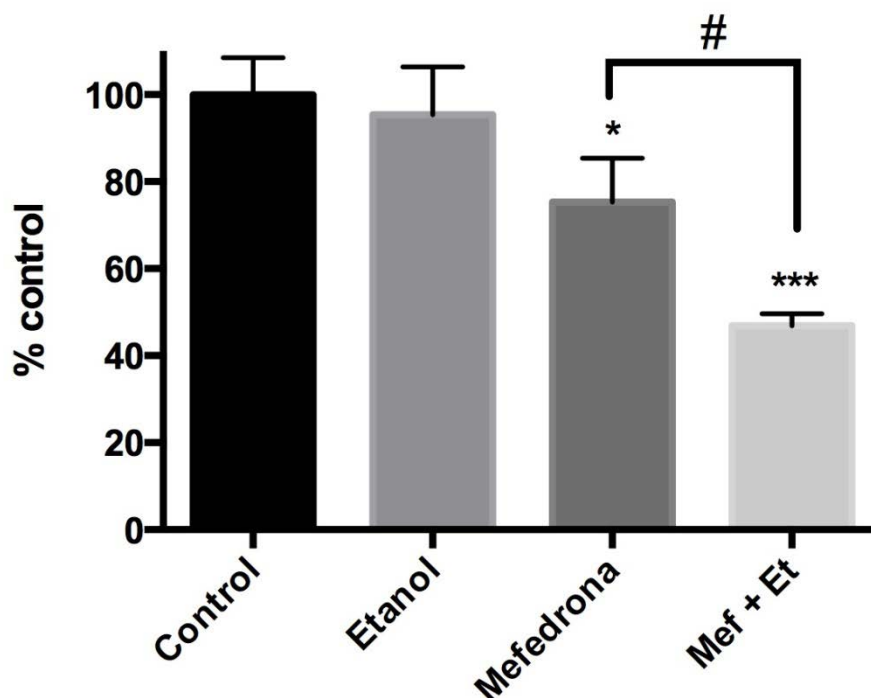


Fig 8: Representació gràfica de la relació entre el número de cèl·lules BrdU⁺ i l'àrea del gir dentat, expressat en forma de percentatge respecte al grup control. S'inclouen els resultats del grup control, grup tractat amb etanol, grup tractat amb mefedrona i grup tractat amb mefedrona i alcohol (Mef+Et). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ versus grup control; # $P<0.05$ versus mefedrona+etanol.

NeuN/BrdU

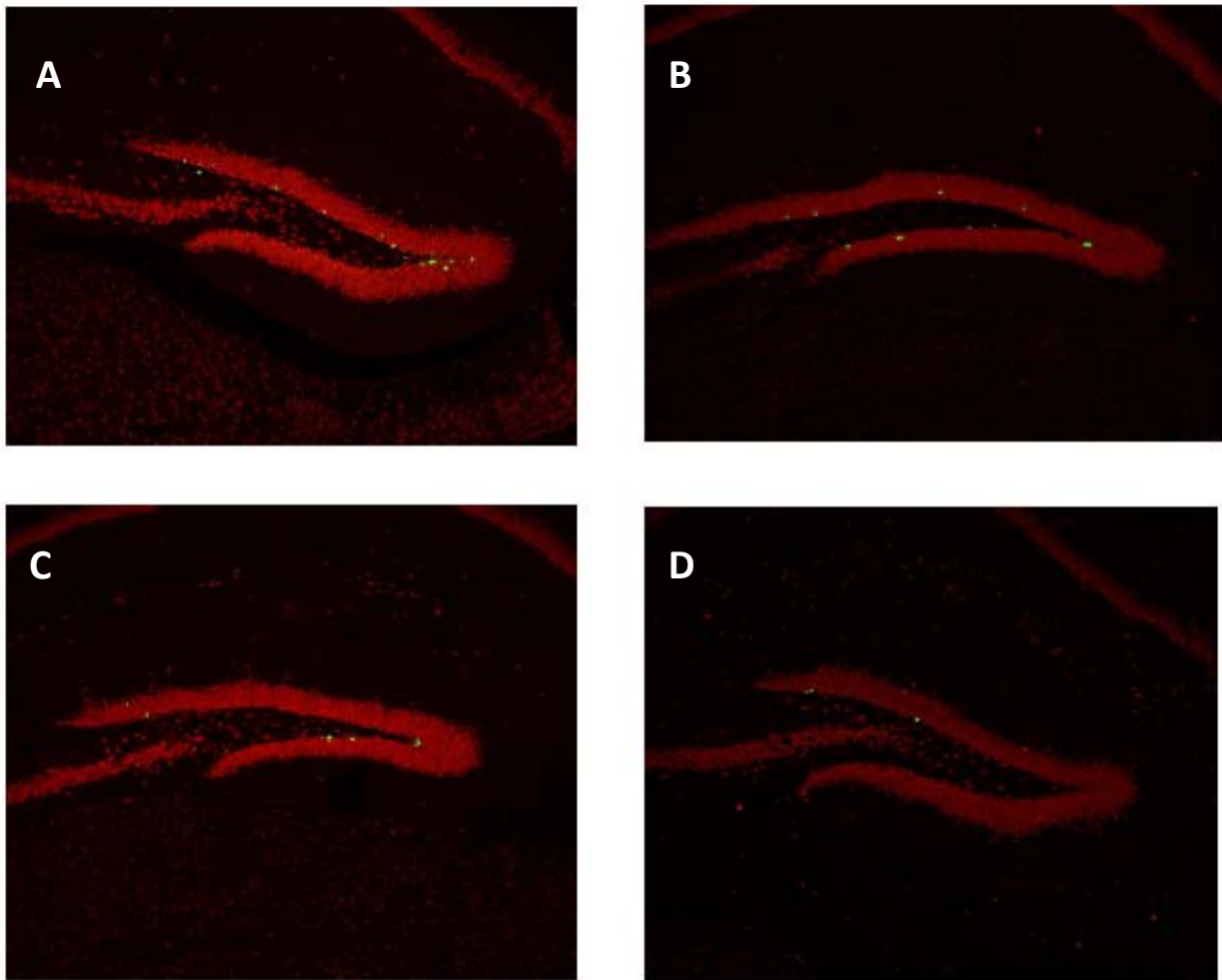


Fig 9: Imatge obtinguda amb el microscopi confocal d'un gir dentat de l'hipocamp d'un tall de cervell d'un ratolí del grup control (A), del grup de tractament amb etanol (B), del grup de tractament amb mefedrona (C) i del grup de tractament de mefedrona + etanol (D). Els punts verds representen el marcatge amb BrdU i la coloració vermella la proteïna NeuN.

Tal com esperàvem, el consum de **mefedrona** provoca com a efecte residual un **descens en la taxa de neurogènesi**, que es manifesta amb un **menor nombre de cèl·lules BrdU⁺ i NeuN⁺** en el gir dentat de l'hipocamp dels animals tractats. I, com podem veure, aquest efecte es veu potenciat amb el consum concomitant d'alcohol. Tot i així, caldria fer més experiments que incorporessin altres temps de sacrifici dels animals, per exemple, a les 24h post-injecció de la solució BrdU, per tal d'avaluar la proliferació dels precursors i així poder determinar el mecanisme per qual la droga exerceix aquesta regulació negativa, ja que amb la informació obtinguda no podem determinar si aquest descens en el procés és degut a una disminució en la proliferació dels precursors, una disminució de la supervivència de les noves neurones, o bé una combinació dels dos factors. Així com també queda per determinar per quin mecanisme l'alcohol potencia els efectes inhibitoris del procés.

5. CONCLUSIONS

- La **neurogènesi (NG)** és el procés de generació de noves neurones funcionals en el cervell. És el procés més actiu durant el **desenvolupament** perinatal i s'ha vist que se segueix donant durant la **vida adulta** en tots els **mamífers** estudiats, incloent els **humans**. Fet que evidencia la capacitat del sistema nerviós central adult de regenerar-se.
- La NG en el mamífer adult es troba restringida espacialment a dues regions cerebrals: la **zona subgranular de gir dentat** de l'hipocamp, on les noves neurones s'incorporen a la capa granular; i la **zona subventricular** adjacent als ventricles laterals, on els precursors migren per la via rostral migratòria cap al **bulb olfactori**.
- El procés s'inicia en ambdues regions amb l'activació i proliferació de cèl·lules mare de tipus astrocític (**cèl·lules B**) que donen lloc a diferents **cèl·lules precursoras neuronals** que aniran dividint-se i diferenciant-se fins donar lloc a **neurones madures funcionals** que s'integraran en els circuits neuronals preexistents.
- S'està evidenciant una diferència entre el procés de NG en els **humans** i en la resta de mamífers: els neuroblasts de la ZSV semblen no migrar cap al bulb olfactori, sinó cap a regions més properes com l'**estriat** o el **còrtex prefrontal**. Aquest fet podria ser degut a que els animals són més dependents del sentit de l'olfacte per la seva supervivència que l'home, en el qual les funcions del còrtex prefrontal semblen ser més importants.
- La NG és un clar exemple de mecanisme de **plasticitat estructural** del cervell, la funció específica del procés, però, roman desconeguda. S'especula que intervén en les funcions de **memòria** i **aprenentatge** de l'hipocamp, i d'**olfacció** del bulb olfactori.
- Com a mecanisme de plasticitat cerebral, es tracta d'un procés flexible i variable que s'adapta a les necessitats i demandes de l'entorn. Per tant, es troba **fortament regulat** per factors intrínsecs i extrínsecs a l'individu.
- En casos de **malalties neurodegeneratives** (Alzheimer, Parkinson, Huntington...) el procés de NG es troba alterat. S'especula que la inducció del procés podria ser una nova **estratègia terapèutica** d'èxit en aquests malalts.
- El consum de **drogues d'abús** tals com l'alcohol, amfetamines o MDMA repercuteix de forma negativa sobre el procés de neurogènesi.
- L'administració de **mefedrona** a ratolins adolescents provoca un descens de la taxa de NG en l'hipocamp, efecte que es veu potenciat amb l'**alcohol**. Aquest fet pot ser degut a un descens de la proliferació cel·lular o de la supervivència, o bé a la combinació de tots dos factors.

6. BIBLIOGRAFIA

Articles referenciats en el treball:

1. Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions [revisió]. *Neuron*. 2011;70(4):687-702.
2. Ramón y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. 1928 Hafner, New York.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319-35
4. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis, 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol*. 1969;136(3):269-93
5. Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984;225(4666):1046-8.
6. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-10.
7. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(18):8591-5.
8. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4(11):1313-7.
9. Kempermann G & Gage FH. New nerve cells for the adult brain. *Sci Am*. 1999;280(5):48-53.
10. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 1996;271(5251):978-81.
11. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-38.
12. Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 2014;156(5):1072-83.
13. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 2011;478(7369):382-6.
14. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? [revisió]. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(6):481-8.
15. Arias-Carrión O, Olivares-Buñuelos T, Drucker-Colín R. Neurogenesis in the adult brain [revisió] *Rev Neurol*. 2007;44(9):541-50.
16. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits [revisió]. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(3):179-93.
17. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [revisió]. *Annu Rev Neurosci*. 2005;28:223-50.
18. Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. [revisió] *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):243-50.
19. Simuni T, Sethi K. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease [revisió] *Ann Neurol*. 2008;64:S65-80.
20. Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* 2011;25(1):1-14.
21. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16(6): 2027-33.
22. Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Murtach M et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7919-24.
23. Teucherd-Noodt G, Dawirs RR, Hildebrandt K. Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J. Neural Transm*. 2000;107(2):133-43.
24. Hernández-Rabaza V, Domínguez-Escribà L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, García-Verdugo JM et al. Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology*. 2006;51(5):967-73.
25. Sorensen LK. Determination of cathinones and related ephedrine in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2011;879(11-12):727-36.
26. Measham F, Moore K, Newcombe R, Welch Z. Tweaking, bombing, dabbing and stockpiling: the emergence of mephedrone and the perversity of prohibition. *Drugs Alcohol Today*. 2010;10:14-21.
27. Winstock A, Mitcheson L, Ramsey J, Davies S, Puchnarewicz M, Marsden J. Mephedrone: use, subjective effects and health risks. *Addiction* 2011;106(11): 1991-6.

28. Varner KJ, Daigle K, Weed PF, Lewis PB, Mahne SE, Sankaranarayanan A et al. Comparison of the behavioral and cardiovascular effects of mephedrone with other drugs of abuse in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;225(3):675-85.
29. Brunt TM, Koeter MW, Niesink RJ, van der Brink W. Linking the pharmacological content of ecstasy tablets to the subjective experiences of drug users. *Psychopharmacology (Berl)* 2012;220(4):751-62.
30. Brunt T.M., Poortman A., Niesink R.J., Van den Brink W. Instability of the ecstasy market and a new kid on the block: mephedrone. *J Psychopharmacol*. 2011;25(11): 1543-47.
31. McElrath K, O'Neill C. Experiences with mephedrone pre- and postlegislative control: perceptions of safety and sources of supply. *Int. J. Drug Policy*. 2011;22(2):120-7.
32. López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol*. 2012;167(2):407-20.
33. Wojtowicz JM, Kee N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 2006;1(3):1399-405.
34. Martínez-Clemente J, López-Arnau R, Abad S, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Dose and time-dependent selective neurotoxicity induced by mephedrone in mice. *PLoS One*. 2014;9(6):e99002.
35. Martínez-Clemente J, López-Arnau R, Carbó M, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E. Mephedrone pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats: relation to pharmacodynamics. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;229(2):295-306.
36. Bejanian M, Finn DA, Syapin PJ, Alkana RL. Body temperature and ethanol pharmacokinetics in temperature-challenged mice. *Alcohol*. 1990;7(4):331-7
37. Harzsch S, Dawirs RR. Neurogenesis in the developing crab brain: postembryonic generation of neurons persists beyond metamorphosis. *J. Neurobiol*. 1996;29(3):384-398.
38. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983 80(8):2390-4.
39. Altman J, DaS GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 1965;207(5000):953-6.
40. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999;286(5439):548-52.
41. Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol* 2004;14(2):186-191.
42. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002;5(5): 438-45.
43. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. [revisió] *Trends Neurosci*. 2004;27(8):447-52.
44. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol*. 2002;451(2):170-88.
45. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000;425(4):479-494.
46. Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 2002;22(3):614-8.
47. Alvarez-Buylla, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002;22(3):629-34.
48. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA et. al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci*. 2002;22(2):437-45.
49. Zhao M, Momba S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB et. al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(13):7925-30.
50. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*. 1999;19(19):8487-97.
51. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*. 1996;383(6601):624-7.
52. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*. 2000;20(23):8727-35.
53. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D. et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 1994;13(5):1071-82
54. Morshead CM, van der Kooy D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci*. 1992;12(1):249-56.

55. Price J, Williams BP. Neural stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(5):564-7.
56. Tsai RY, Kittappa R, McKay RD. Plasticity, niches, and the use of stem cells [revisió]. *Dev Cell.* 2002;2(6):707-12
57. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703-16
58. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(25):13883-8.
59. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2003;23(3):373-82
60. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells [revisió]. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):297-93.
61. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 2005;25(1):10-8.
62. Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 2004;46(1):41-52.
63. Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A. NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 2010;65(6):859-72.
64. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010;7(4):483-95.
65. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 2000;291(1):17-20.
66. Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 2008;28(45):11511-6.
67. Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 2006;442(7105):929-33
68. Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 2007;54(4):559-66.
69. Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 2007;10(6):727-34.
70. Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;03(3):780-5.
71. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Álvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 2001;21(18):7153-60.
72. Eckenhoff MF, Rakic P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J Neurosci.* 1998;8(8):2729-47.
73. Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res.* 1988;72(2):399-406.
74. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 2005;20(2):665-71.
75. Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 2000;96(1):195-203
76. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 2003;467(4):455-63.
77. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of double cortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 2003;467(1):1-10.
78. Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993;13(6):2351-8.
79. Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 2003;24(3):603-13.
80. Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73:357-65.

81. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated neurons in the hippocampus of mice. *Development* 2003;130(2):391-9.
82. Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 2006;26(1):3-11.
83. Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*. 1999;406(4):449-60
84. Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*. 1999;413(1):146-54
85. Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002;415(6875):1030-4.
86. Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 2001;32(5):911-26.
87. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013;153(6):1219-27.
88. Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW. Population dynamics of adultformed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1985;239(1):117-25.
89. Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50): 17528-32.
90. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2003;6(5):507-18.
91. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*. 1993;11(1):173-89.
92. Lois C, Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264(5162):1145-81.
93. Wichterle H, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*. 1997;18(5):779-91.
94. Li Z, Kato T, Kawagishi K, Fukushima N, Yokouchi K, Moriizumi T. Cell dynamics of calretinin-immunoreactive neurons in the rostral migratory stream after ibotenate-induced lesions in the forebrain. *Neurosci Res* 2002;42(2):123-32.
95. Petreanu L, Alvarez-Buylla. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 2002;22(14):6106-13.
96. Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2003;23(32):10411-8.
97. Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 2007;317(5836):381-4.
98. Bermann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P et al. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 2012;74(4):634-9.
99. Peterson DA. Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2(1):34-42
100. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004;41(5):683-6.
101. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304(5675):1338-40.
102. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002;417(6884):39-44.
103. Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004;430(6997):350-6.
104. Kintner C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci* 2002;22(3):639-43.
105. Hallbergson AF, Gnatenco C, Peterson DA. Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair. *J Clin Invest* 2003;112(8):1128-33.
106. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000;28(3):713-26.
107. Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ et al. A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J. Neurosci* 2003;23(37):11732-40.
108. Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2010;7(1):78-89.
109. Kuhn HG, Winkler J, Kemperman G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural

- progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997;17(15):5820-9.
110. Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Ear Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;25(1):152-8.
111. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11946-50.
112. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008;132(4):645-60.
113. Sun J, Sun J, Ming GL, Song H. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1087-93.
114. Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P et al. Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell* 2010;6(5):433-44.
115. Cameron HA, McEwen BS, Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 1995;15(6):4687-92.
116. Nacher J, Rosell DR, Alonso-Llosa G, McEwen BS. NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2001;13(3):512-20
117. Bai F, Bergeron M, Nelson DL. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2003;44(8):1013-21
118. Yoshimizu T, Chaki S. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(2):493-6.
119. Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 1999 21(2 Suppl):46S-51S.
120. Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 1999;89(4):999-1002
121. Jacobs B, Tanapat P, Reeves A, Gould E. Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via 5-HT1A receptor in the adult brain. *Soc Neurosci* 1998;Abstr.24
122. Duman RS, Heninger Gr, Nestler EJ. Molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54(7):597-606.
123. Kulkarni VA, Jha S, Vaidya Va. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2002;16(10):2008-12.
124. Bauer S, Moyse E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC, Marien M. Effects of the alpha 2-adrenoreceptor antagonist dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat in vivo: selective protection against neuronal death. *Neuroscience* 2003;117(2):281-91.
125. Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 2005;8(9):1179-87.
126. Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M et al. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2009;29(25):7966-77.
127. Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(16):9566-71.
128. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2004;7(7):726-35.
129. Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G. Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm* 1998;105(2-3):317-27.
130. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 2003;299(5603):117-20.
131. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999;19(14):5792-801.
132. Maslov AY, Barone Ta, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural stem cell detection, characterization, and associated changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 2004;24(7):1726-33.
133. Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 2003;9(4):261-72.

134. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 2000;405(6789):951-5.
135. Jakubs K, Nanobashvili A, Bonde S, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M et al. Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. *Neuron* 2005;52(6):1047-59.
136. Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1139-51.
137. Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 2008;11(3):309-17.
138. Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* 2009;64(1):79-92.
139. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999;2(3):266-70.
140. Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J. & Cotman, C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 1995;373(6510):109.
141. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386(6624):493-5.
142. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 1998;18(9):3206-12.
143. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):3168-71.
144. Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 2006;16(3):233-8.
145. Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D. Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 2005;22(8):2111-6.
146. Jang MH, Song H, Ming G. Regulation of adult neurogenesis by neurotransmitters. In: Gage, FH.; Kempermann, G.; Song, H., editors. *Adult neurogenesis*. CSHL Press; 2008.
147. Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003;28(9):1562-71.
148. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;20(24):9104-10.
149. Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol* 2000;42(2):248-57.
150. Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 2004;429(6988):184-7.
151. Saghatelian A, Roux P, Migliore M, Rochefort C, Desmaisons D, Charneau P et al. Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 2005;46(1):103-16.
152. Altman J. *The Neurosciences, Second Study Program*. Quarton GC, Melnechuck T, Schmitt FO, editors. New York: Rockefeller University Press; 1967:723-743.
153. Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 2004;24(34):7477-81.
154. Drapeau E, Mayo W, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(24):14385-90.
155. Ehninger D, Kempermann G. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. *Genes Brain Behav* 2006;5(1):29-39.
156. Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 1999;46(11):1472-9.
157. Döbrössy MD, Drapeau E, Arousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 2003;8(12):974-82.
158. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(23):13427-31.
159. Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K et al. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(11):6777-82.
160. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases

- neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999;39(4):569-78.
161. Mayo W, Lemaire V, Malaterre J, Rodriguez JJ, Cayre M, Stewart MG et al. Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus. *Neurobiol Aging* 2005;26(1):103-14.
162. Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 2002;22(7):2679-89.
163. Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(4):1823-8.
164. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001;410(6826):372-6.
165. Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 2002;12(5):578-84.
166. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? [revisió]. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(5):339-50.
167. Jessberger S, Nakashima K, Clemenson GD Jr, Mejia E, Mathews E, Ure K et al. Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline. *J Neurosci* 2007;27(22):5967-75.
168. Aimone JB, Gage FH. Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33(6):1160-9.
169. Cecchi GA, Petreanu LT, Alvarez-Buylla A, Magnasco MO. Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comput Neurosci* 2001;11(2):175-82.
170. Becker S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus* 2005;15(6):722-38.
171. Meltzer LA, Yabaluri R, Deisseroth K. A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 2005;28(12):653-60.
172. Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2002;22(3):635-8.
173. Winner B, Winkler J. Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases [revisió]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(4)
174. Christian K, Song H, Ming GL. Adult neurogenesis as a cellular model to study schizophrenia. *Cell Cycle* 2010;9(4):636-7.
175. Luo L, O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease [revisió]. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:127-56
176. Carlesimo GA, Piras F, Assogna F, Pontieri FE, Caltagirone C, Spalletta G. Hippocampal abnormalities and memory deficits in Parkinson disease: a multimodal imaging study. *Neurology* 2012;78(24):1939-45.
177. Pavese N, Metta V, Bose SK, Chaudhuri KR, Brooks DJ. Fatigue in Parkinson's disease is linked to striatal and limbic serotonergic dysfunction. *Brain* 2010;133(11):3434-43.
178. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease [revisió]. *Lancet Neurol* 2006;5(6):525-35.
179. Baker SA, Baker KA, Hagg T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 2004;20(2):575-9.
180. Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(36):13363-7.
181. Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 2006;24(1):1-14.
182. Crews L, Adame A, Patrick C, Delaney A, Pham E, Rockenstein E et al. Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* 2010;30(37):12252-62.
183. Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads [revisió]. *Exp Neurol* 2010;223(2):267-81.
184. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis [revisió]. *Mov Disord* 2012;27(9):1083-91.
185. Walker FO. Huntington's Disease. *Semin Neurol* 2007;27(2):143-50.
186. Sathasivam K, Lane A, Legleiter J, Warley A, Woodman B, Finkbeiner S et al. Identical oligomeric and fibrillar structures captured from the brains of

- R6/2 and knock-in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2010;19(1):65-78.
187. Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M et al. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(15):9023-7.
188. Low VF, Dragunow M, Tippett LJ, Faull RL, Curtis MA. No change in progenitor cell proliferation in the hippocampus in Huntington's disease. *Neuroscience* 2011;29:577-88
189. Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2004;127(2):319-32.
190. Kohl Z, Regensburger M, Aigner R, Kandasamy M, Winner B, Aigner L et al. Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci* 2010;13:11:114.
191. Lazic SE, Grote H, Armstrong RJ, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A et al. Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport* 2004;15(5):811-3.
192. Kohl Z, Kandasamy M, Winner B, Aigner R, Gross C, Coullard-Despres S et al. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 2007;1155:24-33.
193. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system [revisió]. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:223-50
194. Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW. The neuropsychological basis of addictive behaviour [revisió]. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36(2-3):129-38.
195. Sudai E, Croitoru O, Shaldubina A, Abraham L, Gispán I, Flaumenhaft Y et al. High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. *Addict Biol* 2011;16(2):251-60.
196. Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(13):7579-84
197. Domínguez-Escribà L, Hernández-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero JC, García-Verdugo et al. Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2006 24(2):586-94.
198. Noonan MA, Choi KH, Self DW, Eisch AJ. Withdrawal from cocaine self-administration normalizes deficits in proliferation and enhances maturity of adult-generated hippocampal neurons. *J Neurosci* 2008; 25(10):2516-26
199. Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 2005;115(11):3104-16
200. Lee TT, Wainwright SR, Hill MN, Galea LA, Gorzalka BB. Sex, drugs, and adult neurogenesis: sex-dependent effects of escalating adolescent cannabinoid exposure on adult hippocampal neurogenesis, stress reactivity, and amphetamine sensitization. *Hippocampus* 2014;24(3):280-92
201. Cho KO, Rhee GS, Kwack SJ, Chung SY, Kim SY. Developmental exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine results in downregulation of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Neuroscience* 2008;54(3):1034-41.
202. Canales JJ, Ferrer-Donato A. Prenatal exposure to alcohol and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) alters adult hippocampal neurogenesis and causes enduring memory deficits. *Dev Neurosci* 2014;36(1):10-7.
203. Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977;197(4308):1092-4
204. Open Wet Ware. Share your science. [Internet]. [Data de consulta: Maig 2015]. Disponible a: www.openwetware.org
205. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates *Development*. 1992;116(1):201-11.

ANNEX I

A. ABREVIATURES

NG	Neurogènesi	NT	Neurotransmissors
SNC	Sistema Nerviós Central	LAM	Laberint d'Aigua de Morris
ZSG	Zona Subgranular	BrdU	5'-bromo-2'-desoxiuridina
ZSV	Zona Subventricular	MDMA	3,4-metilendioxiàmfetamina
GD	Gir dentat	MND	Malalties Neurodegeneratives
VRM	Via Rostral Migratòria	NeuN	Proteïna Nuclear Específica Neuronal de Vertebrats
CPN	Cèl·lules precursors neuronals		

B. Tampons i solucions emprats en la immunohistoquímica en portaobjectes per la detecció de BrdU

- PBS 0.1 M (*phosphate buffered saline*) pH 7.35

NaCl.....	8.01 g
KCl	0.20 g
Na ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.78 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p 1 L

- PBS 0.1 M - TRITÓ (0.2% i 0.5%)

Tritó 0.2%	2 ml
Tritó 0.5%	5 ml
PBS 0.1 M	q.s.p 1 L

- PBS 0.1 M - GELATINA (0.2%)

Gelatina	2 g
PBS 0.1 M	q.s.p 1 L

- HCl 2N

HCl 37%	17 ml
H ₂ O Milli-Q	q.s.p 100 mL

- Àcid Bòric 0.1 M

Àcid bòric 0.6183 g
H₂O Milli-Q q.s.p 100

mL

TESTS D'APRENTATGE I DE MEMÒRIA ESMENTATS EN L'APARTAT 4.5

C. Condicionament de parpelleig

El condicionament de parpelleig és una forma de condicionament clàssic que s'ha emprat des de fa molt de temps per estudiar les estructures i els mecanismes relacionats amb l'aprenentatge i la memòria.

El test consisteix en relacionar un estímul auditiu o visual (anomenat **estímul condicionat**, EC) amb un **estímul incondicionat**, EI (per exemple, un lleuger cop o un buf d'aire a l'ull) que provoca un parpelleig en l'animal. Així doncs es tracta d'associar estímuls per tal que l'animal sigui capaç de predir un esdeveniment per la presentació d'un altre esdeveniment que el precedeix.

Al principi, els animals, produeixen una **resposta no condicionada** (parpelleig) just després de l'estímul incondicionat. Després de diferents repeticions (aparellaments estímul condicionat - estímul incondicionat), es genera una associació que dona lloc a un parpelleig après (**resposta condicionada**), que ja apareix com a resposta a l'estímul condicionat i abans del inici de l'estímul incondicionat.

Dit amb altres paraules, es dona estímul auditiu o visual seguit amb el temps d'un estímul que provoca el parpelleig de l'animal, com un buf d'aire a l'ull. Al cap de diversos dies d'aprenentatge, l'animal parpelleja l'ull en sentir l'estímul auditiu /visual i abans de rebre el buf d'aire, de manera que associa tots dos estímuls i sap que, després d'un, es donarà l'altre.

La magnitud de l'aprenentatge depèn del percentatge d'assajos d'aparellaments EC-EI que generen la resposta condicionada.

Per més informació:

Takehara K, Kawahara S, Kirino Y. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 2003;23(30):9897-905.

D. Laberint d'Aigua de Morris (*Morris Water Maze*)

El Laberint d'Aigua de Morris va ser dissenyat per Richard Morris com un mètode per avaluar l'aprenentatge espacial de rosegadors. Aquest avalua la capacitat de l'animal de reconèixer i memoritzar determinades senyals distals (per exemple, objectes)

situades al voltant del perímetre d'un tanc ple d'aigua, de manera que ha de nedar en la piscina des del punt d'inici fins a una plataforma fixa que es troba amagada (submergida). L'animal ha d'aprendre que ha de trobar aquella plataforma per poder sortir de la piscina.

El test permet avaluar la **capacitat d'aprenentatge espacial** a través de repetits assajos i la **memòria referencial**, determinada per la preferència de l'animal a navegar pel quadrant on hi havia la plataforma, en aquell moment absent.

Generalment, per tal de realitzar-lo es disposa de:

- Tanc circular blanc d'acer inoxidable ple d'aigua fins a la meitat. L'aigua està tenyida amb làtex i a una temperatura controlada durant els assajos.
- Plataforma blanca circular submergida 2 cm per sota del nivell de l'aigua. Es situa sempre en el centre del mateix quadrant (Nord-Est, Nord-Oest, Sud-Est o Sud-Oest).
- Quatre senyals distals, com ara objectes, situats en cadascun dels quatre punts que queden si dibuixem una creu imaginària al centre del tanc.

Es tracta d'un test robust i fiable que permet obtenir resultats en no més de sis dies i que està fortament relacionat amb la plasticitat sinàptica de l'hipocamp.

Per més informació:

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc 2006;1(2):848-58.