



Tesis Doctoral

**EJERCICIO FÍSICO Y ENTRENAMIENTO  
NEUROCOGNITIVO COMO FACTORES  
MODULADORES DE LAS ASOCIACIONES  
COCAÍNA-CONTEXTO: PAPEL DE LA  
NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA**

**Fabiola Ávila Gámiz**

**Directores**

Luis Javier Santín Núñez  
David Ladrón de Guevara Miranda

Programa de Doctorado en Psicología  
Facultad de Psicología y Logopedia  
Universidad de Málaga, 2024



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



TESIS DOCTORAL

**Ejercicio físico y entrenamiento neurocognitivo  
como factores moduladores de las asociaciones  
cocaína-contexto: papel de la neurogénesis  
hipocampal adulta**

Physical exercise and neurocognitive training as modulatory factors of  
cocaine-context associations: role of adult hippocampal neurogenesis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Departamento de Psicobiología y  
Metodología de las Ciencias del Comportamiento

Programa de Doctorado en Psicología

Memoria presentada por Dña. Fabiola Ávila Gámiz para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Málaga, bajo la dirección de los  
Dres. Luis Javier Santín Núñez y David Ladrón de Guevara Miranda

Málaga, 2024





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Autora: Fabiola Ávila Gámiz

 <https://orcid.org/0000-0003-2633-0983>

Edita: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización, pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es).





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña FABIOLA ÁVILA GÁMIZ

Estudiante del programa de doctorado EN PSICOLOGÍA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada:

EJERCICIO FÍSICO Y ENTRENAMIENTO NEUROCOGNITIVO COMO FACTORES MODULADORES DE LAS ASOCIACIONES COCAÍNA-CONTEXTO: PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

Realizada bajo la tutorización de LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ y dirección de LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ Y DAVID LADRÓN DE GUEVARA MIRANDA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 26 de ENERO de 2024

Fdo.: FABIOLA ÁVILA GÁMIZ Doctorando/a	Fdo.: LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ Tutor/a
Fdo.: LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ                      DAVID LADRÓN DE GUEVARA MIRANDA Director/es de tesis	





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ, Doctor en Psicología y Catedrático del Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, como tutor y director, junto con D. DAVID LADRÓN DE GUEVARA, Doctor en Psicología e investigador en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, como codirector CERTIFICAN:

Que Dña. Fabiola Ávila Gámiz ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga, bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado:

*Ejercicio físico y entrenamiento neurocognitivo como factores moduladores de las asociaciones cocaína-contexto: papel de la neurogénesis hipocampal adulta.*

La investigación responde a los requisitos de una Tesis Doctoral y la metodología adoptada es apropiada a los fines de investigación. Por tanto, entiende que reúne los requisitos para optar al Grado de Doctor/a según la legislación vigente y, en consecuencia, autoriza su depósito y posterior presentación y defensa ante el tribunal designado para tal fin.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga, a 26 de enero de 2024.

Fdo. Luis Javier Santín Núñez

Fdo. David Ladrón de Guevara Miranda



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Yo, Fabiola Ávila Gámiz, DECLARO que soy autora del presente trabajo y que lo he realizado en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la Facultad de Psicología y Logopedia bajo la dirección de los Dres. Luis Javier Santín Núñez y David Ladrón de Guevara Miranda.

Y para que así conste, firmo la presente declaración en Málaga, a 26 de enero de 2024.

Fdo. Fabiola Ávila Gámiz



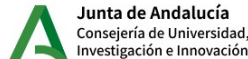
UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Este trabajo ha sido realizado al amparo del grupo de investigación del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación, **Neuropsicofarmacología Aplicada en Enfermedades Neurológicas y Neuropsiquiátricas** (código CT643, PAIDI; Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo; Junta de Andalucía), dirigido por el Dr. Guillermo Estivill Torrús y establecido en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA plataforma BIONAND) con la participación conjunta del Hospital Universitario Regional de Málaga y la Universidad de Málaga, así como al amparo del grupo de investigación consolidado **C01 Neuroinmunología y Neuroinflamación** del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA, plataforma BIONAND).

El trabajo se ha llevado a cabo en las siguientes **instalaciones**: Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, IBIMA Plataforma BIONAND, Universidad de Málaga; Departamento de Fisiología Humana, IBIMA Plataforma BIONAND, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga; Cerebral Codes and Circuits Connectivity team, Brain Plasticity Unit, ESPCI Paris, PSL Research University (Paris, Francia); Centro de Experimentación y Conducta Animal (CECA), Universidad de Málaga; Área de Microscopía, Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI), Universidad de Málaga.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Junta de Andalucía  
Consejería de Universidad,  
Investigación e Innovación



## Entidades financiadoras

Programa de Formación del Personal Investigador 2018. Contrato PRE2018-085673 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN), la Agencia Estatal de Investigación (AEI)/0.13039/501100011033 y los fondos de la Unión Europea “Fondo Social Europeo Invierte en tu Futuro”.

Ayuda para contratos puente, II Plan Propio de Investigación, Transferencia y Divulgación Científica de la Universidad de Málaga.

**Título del proyecto:** Mejora neurogénica mediante entrenamiento neurocognitivo como estrategia para favorecer la extinción y reducir la reinstauración de las asociaciones contexto-cocaína. Proyecto PSI2017-82604-R financiado por MICIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por Feder una manera de hacer Europa. Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez. Fecha de inicio y fin: 01/01/2018 - 31/12/2020. Cuantía: 125.840 €.

**Título del proyecto:** Uso de IGF-II para el tratamiento de las alteraciones hipocampales y conductuales inducidas por el consumo crónico de cocaína durante la adolescencia. Proyecto PID2020-113806RB-I00 financiado por MICIN/AEI/10.13039/501100011033. Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez y María Inmaculada García Fernández. Duración: 01/09/2021 - 31/08/2024. Financiación: 108.900 €.

**Título del proyecto:** Facilitación de la conectividad hipocampo-corteza ventromedial como herramienta para favorecer la extinción de asociaciones cocaína-contexto. Proyecto: B4-2023-16 financiado por Universidad de Málaga (II Plan Propio de Investigación, Transferencia y Divulgación Científica). Investigador Principal: David Ladrón de Guevara Miranda. Financiación: 8.000 €. Duración: 01/03/2023 - 28/02/2024.





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*A mi familia. A mi familia elegida.*

*A Magdalena.*

“There is something at work in my soul, which I do not understand”.

Mary Wollstonecraft Shelley, *Frankenstein or the modern Prometheus*, 1818



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## AGRADECIMIENTOS

Como toda Tesis Doctoral esta también ha requerido de un esfuerzo colectivo, sois muchas las personas que habéis formado parte de ella y sin las cuales estoy segura no habría llegado a empezarse ni a terminarse.

En primer lugar, gracias a los directores, Luis y David. Luis gracias por confiar en mí y dejarme hacer desde el primer día que llegué al laboratorio. Han sido seis años y he crecido mucho como profesional en todo este tiempo, gracias por guiarme y acompañarme en ese proceso y por todo lo aprendido. También por el trabajo, por estar siempre a una llamada de distancia ante los problemas sobrevenidos, por darme ánimos en los momentos difíciles y por celebrar los logros casi más que yo. Por transmitirnos tu pasión por la ciencia. A David, gracias por estar ahí desde el primer CPP y por aventurarte en tu primera dirección con esta Tesis Doctoral de la que has sido un pilar fundamental. Por tu dedicación y esfuerzo para que saliese adelante, por el apoyo y paciencia en los momentos difíciles, y por todo el trabajo, gracias.

Por otro lado, también querría agradecer a Milagros Gallo sin la cual tampoco estaría aquí por introducirme en el mundo de la neurociencia, inspirarme y guiarme en mis primeros pasos; a Carmen por todas las dudas que me ha resuelto en este último período; a María Cavas y Eduardo por su apoyo con la experiencia docente. También, dar las gracias al personal del centro de Experimentación Animal, por cuidarme y ayudarme durante el trabajo experimental y a David Navas por sus consejos e inestimable ayuda con el microscopio confocal.

Por supuesto, también quiero agradecer a mis compañeros y compañeras del laboratorio de Psicobiología, a los que están y a los que estuvieron, por todo lo compartido. A Patri, por tu presencia durante los primeros años de esta tesis, por el apoyo, por todo lo que aprendí de ti. También a Román, Sara Tabbai y Andrea por hacerme sentir en familia cuando llegué. A Ana, Chema, Sara, Mari Carmen, Emma por vuestra colaboración en esta tesis, por los congresos, los almuerzos compartidos, por hacer más amenas las horas de laboratorio. Gracias. También mil gracias a Rosa, por su saber hacer, y su actitud positiva, por acompañarme en las largas horas de confocal. A Mamen, es todo un placer haber compartido contigo laboratorio estos últimos meses, gracias por escucharme cada mañana hablar sobre la tesis.

Agradecer también a Gisella Vetere, mi tutora de estancia en París por darme la oportunidad de realizar la estancia, por hacerme sentir como en casa desde el primer día y por todo lo que aprendí durante esos meses. Gracias también a los fantásticos compañeros y compañeras del laboratorio, Jose, Charlie, Clément, Maëlle y Lisa, por su enorme generosidad al compartir conmigo lo que hacían, por enseñarme y hacerme sentir como una más durante la estancia, por las risas compartidas, *Merci*. También, dar las gracias a las amistades que tuve la suerte de conocer en el Colegio de España en París, a las que me acompañaron durante esos meses y a las que siguen ahí hoy en día. No os puedo nombrar a todos y todas, pero ya sabéis quienes sois ;)

A todas las personas que desde fuera del ámbito académico han hecho esta tesis posible. A todas mis amigas y amigos. Gracias Ana, Alex, Juanma y Antonio por ser esa red de apoyo emocional en la que caer plácidamente, por haceros sentir siempre cerca, aunque no estéis aquí, por recordarme que hay vida más allá de la ciencia y por escucharme. Especialmente, gracias a ti, Ana, por el infinito apoyo diario que me has brindado estos últimos meses; A Víctor y Carlos, ojalá algún día ser tan buena persona como

vosotros, gracias por querer estar siempre que consigo algo; A Benito, por seguir ahí a pesar de la distancia, y por tu paciencia, a partir de ahora te responderé más rápido; A Ángela, llegaste (o más bien volviste) a mi vida cuando no tenía tiempo y aun así te has quedado, gracias por todos los paseos y por tu optimismo contagioso; al resto de granadinas, María, Laura, y Nazaret por compartir conmigo otra etapa más; Anita, a ti otra vez amiga, porque también tienes cabida en este apartado, viniste como un regalo, espero estar muy pronto viéndote en el mismo sitio.

Y para finalizar a los que estáis desde el principio, a *mi familia*. A mis padres, a Gonzalo y Lorena, gracias por cuidarme incondicionalmente, por estar a mi lado y darme la oportunidad de llegar hasta aquí, por todo lo que me dais sin esperar nada a cambio. Gracias también por interesaros por lo que hago y por escucharme hablar de ello. Por ayudarme a poner en perspectiva la vida. Esta tesis también es vuestra.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## TABLA DE CONTENIDOS/table of contents

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS/index of abbreviations</b> .....	21
<b>RESUMEN</b> .....	25
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	27
1. LA COCAÍNA .....	29
1.1 Epidemiología del consumo de cocaína.....	29
1.2 Trastorno por uso de cocaína.....	30
2. MECANISMOS DE APRENDIZAJE IMPLICADOS EN LA BÚSQUEDA Y CONSUMO DE COCAÍNA.....	31
3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DEL TRASTORNO POR USO DE COCAÍNA: IMPLICACIÓN DEL HIPOCAMPO Y LA NEUROPLASTICIDAD HIPOCAMPAL .....	35
3.1 Neuroanatomía del hipocampo .....	38
3.2 El hipocampo como sustrato del aprendizaje y la memoria espacial .....	40
3.3 Papel del hipocampo en el aprendizaje asociativo cocaína-contexto.....	43
3.4 Neurogénesis hipocampal adulta .....	45
3.4.1 Factores reguladores de la neurogénesis hipocampal adulta....	49
3.4.2. Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo.....	51
3.4.3. Implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en el aprendizaje asociativo cocaína-contexto .....	53
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	57
<b>PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL:</b> <i>La combinación secuencial de ejercicio en cinta y entrenamiento neurocognitivo incrementa sinérgicamente la neurogénesis hipocampal adulta en ratón</i> .....	63
1. INTRODUCCIÓN.....	65
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
2.1 Animales .....	67
2.2 Diseño experimental .....	67
2.3 Intervenciones conductuales.....	69
2.3.1 Ejercicio aeróbico programado.....	69
2.3.2 Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris.....	70
2.4 Administración de bromodeoxiuridina .....	71
2.5 Perfusión intracardiaca y obtención de tejido cerebral fijado.....	72
2.6 Corte y seriación del tejido cerebral.....	72
2.7 Inmunohistoquímica.....	72
2.7.1 Procedimientos de inmunohistoquímica por DAB.....	72

2.7.2 Procedimientos de inmunofluorescencia.....	74
2.8 Procedimientos de cuantificación celular .....	75
2.9 Análisis estadísticos.....	76
3. RESULTADOS .....	76
3.1 Efectos del ejercicio aeróbico programado sobre la neurogénesis hipocampal adulta.....	76
3.2 Efecto del ejercicio programado sobre el aprendizaje de la tarea de laberinto acuático.....	79
3.3 Efecto de la combinación del ejercicio programado y el entrenamiento en el laberinto acuático sobre la NHA y la plasticidad hipocampal.....	82
4. DISCUSIÓN .....	89

<b>SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL:</b> <i>La combinación secuencial de ejercicio físico y entrenamiento neurocognitivo modula la extinción y la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto: implicación de la neurogénesis hipocampal adulta</i> .....	95
--	----

1. INTRODUCCIÓN .....	97
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	98
2.1 Animales.....	98
2.2 Diseño experimental.....	99
2.3 Intervenciones conductuales .....	99
2.3.1 Protocolo de preferencia de lugar condicionada .....	99
2.3.2 Protocolos de ejercicio aeróbico programado y aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.....	102
2.4 Administración de bromodeoxiuridina.....	102
2.5 Procesamiento del tejido e inmunohistoquímica .....	102
2.5.1 Estudios de inmunofluorescencia .....	102
2.6 Procedimientos de cuantificación celular .....	103
2.7 Análisis estadísticos.....	104
3. RESULTADOS .....	105
3.1 Efecto del ejercicio programado y el entrenamiento espacial sobre la extinción y reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto .....	105
3.2 Aprendizaje de la tarea de entrenamiento espacial .....	107
3.3 Efecto del ejercicio y el entrenamiento espacial sobre la neurogénesis hipocampal adulta .....	109
3.4 Efecto del entrenamiento espacial sobre la integración funcional de las nuevas células en el giro dentado.....	111

3.5 Efecto mediador de la generación e integración funcional de nuevas células del giro dentado adulto sobre la persistencia a largo plazo de una preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína .....	112
4. DISCUSIÓN .....	113
<b>CONCLUSIONES</b> .....	119
<b>ENGLISH SUMMARY AND CONCLUSIONS</b> .....	123
1. SUMMARY .....	125
2. CONCLUSIONS .....	136
<b>REFERENCIAS/REFERENCES</b> .....	139
<b>ANEXOS</b> .....	175



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS/index of abbreviations

- AHN:** Neurogénesis hipocampal adulta (del inglés, *Adult Hippocampal Neurogenesis*)
- ACP:** Análisis de componentes principales
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ATV:** Área tegmental ventral
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)
- BrdU:** 5'-bromo-2'-desoxiuridina/5'-bromo-2'-desoxiuridine
- CA1:** Cornu Ammonis 1
- CA2:** Cornu Ammonis 2
- CA3:** Cornu Ammonis 3
- CCG:** Capa celular granular
- CE:** Corteza entorrinal
- CECA:** Centro de experimentación y conducta animal
- CGD:** Células granulares del giro dentado
- CldU:** clorodesoxiuridina
- CP:** Componente principal
- CPF:** Corteza Prefrontal
- CPN:** Célula Progenitora Neural
- CPP:** Preferencia de lugar condicionada (del inglés, *Conditioned Place Preference*)
- CS:** Estímulo condicionado (del inglés, *conditioned stimulus*)
- CTN:** Célula troncal neural
- DA:** Dopamina
- DAT:** Transportador de dopamina (del inglés, *Dopamine Transporter*)
- DCX:** Proteína de migración neuronal doblecortina/ neuronal migration protein doublecortin
- DAB:** Tetrahidrocloruro de 3,3'diaminobenzindina
- DG:** Giro dentado (del inglés, *Dentate Gyrus*)
- DGCs:** Células granulares del giro dentado (del inglés, *Dentate Granule Cells*)
- DREADD:** Receptores de diseño activados exclusivamente por drogas de diseño (del inglés *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*)
- DMRT:** Prueba de rango múltiple de Duncan (del inglés, *Duncan's Multiple Range Test*)
- EC:** Estímulo condicionado
- EDL:** Estriado dorsolateral
- EI:** Estímulo incondicionado
- EDADES:** Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España
- FH:** Formación hipocampal
- GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico/ $\gamma$ -aminobutyric acid
- GD:** Giro dentado
- GFAP:** Proteína glial fibrilar ácida (del inglés, *Glia Fibrillary Acidic Protein*)
- ED:** Estriado dorsal

<b>IdU:</b> yododesoxiuridina	<b>PFC:</b> Prefrontal cortex
<b>IHQ:</b> Inmunohistoquímica	<b>PLC:</b> Preferencia de lugar condicionada
<b>i.p.:</b> Intraperitoneal	<b>SA:</b> Autoadministración (del inglés, <i>self-administration</i> )
<b>LPA:</b> Ácido lisofosfatídico (del inglés, <i>Lysophosphatidic Acid</i> )	<b>SEM:</b> Error típico de la media (del inglés, <i>Standard Error of the Mean</i> )
<b>MWM:</b> Laberinto acuático de Morris (del inglés, <i>Morris Water Maze</i> )	<b>SUB:</b> Subículo
<b>NAc:</b> Núcleo accumbens	<b>SYN:</b> Sinapsina I (del inglés, <i>synapsin I</i> )
<b>NaCl:</b> Cloruro sódico/sodium chloride	<b>UNODC:</b> Oficina de las naciones unidas contra la droga y el crimen (del inglés, <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> )
<b>NeuN:</b> Proteína nuclear específica neuronal (del inglés, <i>Neuronal Nuclei</i> )	<b>VEGF:</b> Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, <i>Vascular endothelial Growth Factor</i> )
<b>NHA:</b> Neurogénesis hipocampal adulta	<b>VTA:</b> Área tegmental ventral (del inglés, <i>Ventral Tegmental Area</i> )
<b>OEDT:</b> Observatorio europeo de las drogas y las toxicomanías	<b>ZSG:</b> Zona subgranular
<b>OEDA:</b> Observatorio español de las drogas y las drogadicciones	<b>ZSV:</b> Zona subventricular
<b>PCA:</b> Análisis de componentes principales (del inglés, <i>Principal Component Analysis</i> )	
<b>PCNA:</b> Antígeno nuclear de célula en proliferación (del inglés, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> )	





## RESUMEN

El consumo de sustancias ilícitas constituye un problema global, con numerosas repercusiones a nivel socioeconómico y de salud pública. Entre las sustancias ilícitas más consumidas se encuentra la cocaína, una droga estimulante del sistema nervioso central con un alto potencial adictivo. El desarrollo del trastorno por uso de cocaína se caracteriza por la transición de un consumo intermitente a un consumo incontrolado, caracterizado por la búsqueda compulsiva de la droga, la presencia de síntomas negativos durante la abstinencia y un deseo irrefrenable por volver a consumir. Entre los factores que precipitan la recaída y favorecen la cronicidad del trastorno se encuentra el establecimiento de asociaciones entre las claves contextuales presentes durante el consumo de la droga y sus efectos reforzantes. Aunque las asociaciones cocaína-contexto presentan una alta resistencia a la extinción y el olvido, el uso de estrategias terapéuticas para debilitar su fuerza podría tener importantes implicaciones en el tratamiento del trastorno por uso de cocaína. A nivel neurobiológico, el hipocampo constituye una región clave en el mantenimiento, extinción y reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto. La literatura disponible indica que un fenómeno neuroplástico que tiene lugar en el giro dentado del hipocampo, la neurogénesis hipocampal adulta, podría ser relevante en la modulación de estas asociaciones. En este sentido, una capacidad neurogénica reducida constituye un factor de vulnerabilidad para el desarrollo y mantenimiento a largo plazo de conductas de búsqueda y consumo de la droga, mientras que la potenciación de este fenómeno neuroplástico podría contribuir a reducir la persistencia de las asociaciones cocaína-contexto. Por ello, la búsqueda de estrategias eficaces y no invasivas de estimulación neurogénica constituye una alternativa terapéutica potencial para el abordaje del trastorno por uso de cocaína.

En este marco teórico, la presente Tesis Doctoral se compone de dos bloques experimentales, empleando modelos animales, centrados en determinar los efectos de un programa combinado de ejercicio físico y entrenamiento cognitivo sobre la neurogénesis hipocampal adulta (**primer bloque experimental**), y la utilidad de esta estrategia de incremento neurogénico para favorecer la extinción y prevenir la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto previamente establecidas (**segundo bloque experimental**). Por un lado, los resultados del primer bloque experimental indican de forma novedosa que la combinación de ejercicio físico programado y entrenamiento de memoria de trabajo espacial es una estrategia útil para incrementar la neurogénesis hipocampal adulta en ratones, estimulando de manera sinérgica la proliferación, supervivencia y diferenciación/maduración neuronal de nuevas células en el giro dentado del hipocampo. Por otro lado, los hallazgos del segundo bloque experimental suponen una primera descripción de la utilidad de esta aproximación conductual como estrategia funcional para facilitar la extinción y reducir la reinstauración de asociaciones cocaína-contexto, así como del papel mediador de la neurogénesis hipocampal adulta en este proceso. En conjunto, los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral aumentan nuestra comprensión sobre las bases biológicas relacionadas con el mantenimiento de las asociaciones droga-contexto y aportan información relevante para el desarrollo de estrategias más eficaces para el abordaje de los problemas relacionados con el consumo de cocaína.



# MARCO TEÓRICO



## 1. LA COCAÍNA

### 1.1 Epidemiología del consumo de cocaína

En la actualidad, el consumo de sustancias ilícitas constituye un desafío tanto social como de salud pública a nivel mundial. Tal y como indican los informes internacionales sobre drogas, el abuso de sustancias afecta significativamente a la salud de las personas consumidoras y también tiene repercusiones socioeconómicas que afectan a su entorno y la sociedad en general (p. ej., aumento de los índices de delincuencia y mayor gasto presupuestario sanitario; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías-OEDT- 2022; The United Nations Office on Drugs and Crime Report-UNODC- 2022). Entre las drogas ilícitas más consumidas se encuentra la cocaína, un estimulante del sistema nervioso central con altas propiedades reforzantes (Kuhar et al., 1991). En 2020, se estimó que aproximadamente 21,5 millones de personas de entre 15-64 años habían consumido cocaína, encontrándose los índices más altos en Oceanía, América y Europa Central y Occidental (UNODC, 2022). En Europa, la cocaína es el psicoestimulante más consumido y la segunda droga ilegal con mayor prevalencia de uso (tras el cannabis), que presenta una tendencia al alza en su consumo durante la última década. Aproximadamente 3,5 millones de europeos de entre 15-64 años consumieron cocaína en 2021, de los cuales 2,2 millones eran jóvenes en un rango de edad de 15-34 años (OEDT, 2022). Concretamente, España es uno de los países del continente europeo donde la prevalencia del consumo de cocaína es más alta (OEDT, 2022). En este sentido, un 2,3% de la población española adulta de entre 15-64 años afirma que consumió cocaína durante el año 2021 y un 11,7% admite haberla consumido al menos una vez en la vida (Encuesta sobre Alcohol y otras drogas en España -EDADES- 2022).

La cocaína es un alcaloide producido a partir de algunas plantas del género *Erythroxylum*, nativas de Sudamérica y cultivadas principalmente en Colombia, Bolivia y Perú. Su producción ilícita se encuentra en el nivel más alto registrado históricamente y las vías de tráfico siguen expandiéndose globalmente, lo que facilita su disponibilidad y el aumento de su consumo (UNODC, 2022). En el mercado ilegal puede encontrarse en diversas formas, siendo la cocaína en polvo (clorhidrato de cocaína) la forma más consumida actualmente, seguida de la base de cocaína (p. ej., *crack*), si bien el consumo de esta última modalidad es cada vez más frecuente en Europa, principalmente en contextos marginales y vulnerables (OEDT, 2022; UNODC, 2021, 2022). La forma de presentación de la cocaína junto con la presencia de aditivos, impurezas o residuos determinan las características físicas de la sustancia, sus niveles de pureza, su toxicidad, así como las posibles vías de administración. En este sentido, el clorhidrato de cocaína se consume principalmente por vía intranasal (p. ej., esnifado), mientras que la cocaína en base suele consumirse por vía inhalatoria, siendo menos habitual el consumo por vías parenteral u oral (OEDT, 2022; UNODC, 2021). La administración por vía inhalada y parenteral son las que producen una mayor biodisponibilidad de la cocaína tras su consumo (Cone, 1995) y se asocian con mayores problemas de salud y sociales, con pautas de consumo más perjudiciales y en el caso de la vía parenteral, con un mayor riesgo de contraer otras enfermedades (p. ej., VIH, hepatitis víricas; OEDT, 2022).

La cocaína produce efectos estimulantes a nivel fisiológico, incrementando la tasa cardíaca, la presión sanguínea y la temperatura corporal (Cone, 1995) y a nivel psicológico, incrementando la atención y provocando sensaciones transitorias de euforia, placer, excitación e inquietud entre otras (Morton, 1999). Tras desaparecer estas sensaciones placenteras suelen aparecer síntomas de irritabilidad y malestar que, a

menudo, promueven la repetición en la toma de la droga, lo cual favorece la aparición de un patrón característico de consumo compulsivo. A diferencia de otras drogas, el consumo incontrolado de cocaína se intercala con períodos de abstinencia que pueden durar varios días (Morton, 1999; Gawin, 1991). Algunos estudios estiman que alrededor del 15-20% de los consumidores ocasionales de cocaína desarrollan un perfil de consumo intenso y frecuente que termina generando situaciones de dependencia de la droga (Flórez-Salamanca et al., 2013; Lopez-Quintero et al., 2011). El consumo regular de cocaína se ha relacionado con problemas sociales y también de salud (Degenhardt et al., 2014), asociándose con una mayor mortalidad (Peacock et al., 2021) problemas cardiovasculares (p. ej., arritmias, infarto de miocardio; (Sordo et al., 2014), alteraciones psiquiátricas (p. ej., episodios psicóticos, ideación suicida; Butler et al., 2017) y cognitivas (Sampedro-Piquero et al., 2018; Vonmoos et al., 2014) y otros problemas directamente relacionados con la vía de administración (p. ej., el desarrollo de enfermedades respiratorias o infecciosas; Peacock et al., 2021; OEDT, 2022).

## 1.2 Trastorno por uso de cocaína

La cocaína tiene intensos efectos reforzantes y provoca sensaciones subjetivas gratificantes que promueven un consumo reiterado. Inicialmente, la persona que toma cocaína presenta un consumo voluntario y recreativo, empleando dosis reducidas y limitando el uso a determinadas ocasiones. Sin embargo, el uso repetido puede derivar en el desarrollo de un patrón de consumo compulsivo e incontrolado, incrementándose la cantidad y frecuencia de las tomas a pesar de los efectos adversos para el propio bienestar personal y social (Everitt, 2014; Everitt & Robbins, 2016). Estas situaciones representan un riesgo elevado para el desarrollo de un trastorno crónico caracterizado por un perfil de búsqueda y consumo compulsivo de la droga que se acompaña de síntomas negativos durante las fases de abstinencia, como un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, e irritabilidad) y un deseo irrefrenable por consumir (*craving*), lo cual precipita continuamente la recaída en el consumo (Koob & Volkow, 2010, 2016).

En comparación con otras drogas de abuso, como el alcohol o el cannabis, la dependencia a la cocaína se desarrolla de forma más rápida desde la primera toma, produciéndose una escalada rápida en la dosis consumida (Wagner & Anthony, 2002). No obstante, el riesgo de desarrollar un trastorno por uso de cocaína muestra una cierta variabilidad interindividual, de forma que solo un porcentaje de personas (~20%) experimentan un problema de entidad diagnóstica a lo largo de su vida (Flórez-Salamanca et al., 2013). La vulnerabilidad individual para la transición desde un consumo intermitente a un consumo regular y, finalmente, al desarrollo de un trastorno por uso de drogas se ve determinada por factores genéticos y ambientales que interactúan con los propios efectos de la droga (p. ej., modificación de la expresión génica, redes neuronales, sinaptogénesis, etc.; Fouyssac et al., 2021; Homberg et al., 2014). Se ha observado que la probabilidad de desarrollar un trastorno por abuso de drogas se puede ver potenciada en etapas más tempranas del desarrollo neurobiológico del individuo (p. ej., la adolescencia; Belin et al., 2016), así como por determinados rasgos de personalidad que presentan cierto componente hereditario, tales como una respuesta incrementada ante el estrés, la propensión a experimentar nuevas sensaciones o estímulos (búsqueda de la novedad) o la predisposición a actuar de forma impulsiva (Kreek et al., 2005). Además de estos factores biológicos, el contexto socioeconómico influye en la vulnerabilidad individual al abuso de drogas, de forma que los estresores sociales (p. ej., negligencia o abuso físico, emocional y sexual, aislamiento social, etc.), especialmente cuando aparecen durante el desarrollo temprano, y también el contexto social en el que se toma la droga (p. ej., disponibilidad de la droga, normas sociales con respecto a su consumo), son

elementos que pueden predisponer y modular la adquisición del comportamiento de consumo de sustancias (Bardo et al., 2013; Sahani et al., 2022). La esfera cognitiva también constituye un factor relevante a este respecto, en tanto que el consumo crónico (e incluso recreativo) de cocaína se ha asociado con la presencia de alteraciones en funciones ejecutivas (p. ej., atención, flexibilidad cognitiva) y en algunos tipos de memoria (de trabajo y declarativa; Spronk et al., 2013; Vonmoos et al., 2013, 2014) así como de un sesgo atencional hacia las claves relacionadas con el consumo de la droga (Leeman et al., 2014). No obstante, es difícil determinar en qué medida estos problemas cognitivos son premórbidos o por el contrario consecuencia del consumo repetido de la droga (Spronk et al., 2013).

Uno de los problemas más acuciantes en relación con el trastorno por uso de cocaína tiene que ver con la dificultad para su abordaje terapéutico. En Europa, la cocaína es la segunda droga más citada en las solicitudes de inicio de tratamiento por trastornos relacionados con sustancias de abuso (OEDT, 2022). En España, los datos más recientes (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones-OEDA- 2022) resultan difíciles de interpretar por la reducción general de admisiones a tratamiento derivada del confinamiento por la Covid-19. Sin embargo, encuestas anteriores muestran que, en 2019, de todas las admisiones a tratamiento por drogas cerca de la mitad (44,7%; 22,395 admisiones a tratamiento) correspondieron al tratamiento por uso de cocaína. Los datos también reflejan que las alternativas terapéuticas actuales no resultan totalmente eficaces a largo plazo, de forma que una gran parte de las personas que solicitaron terapia por abuso de cocaína en España ya habían recibido tratamiento previo por este problema (~40%; OEDA, 2021). De esta forma, una dificultad recurrente y común a todos los programas de tratamiento tiene que ver con la elevada propensión a la recaída en el consumo de la droga, incluso después de haber mantenido una abstinencia prolongada (Sánchez-Hervás et al., 2012). Dado que aún no se han aprobado intervenciones farmacológicas para el tratamiento del trastorno por uso de cocaína, las intervenciones de referencia son de carácter eminentemente psicosocial (Kampman, 2019). Los tratamientos psicosociales han mostrado cierta efectividad para reducir de forma general el consumo de la droga, pero siguen mostrando altas tasas de abandono y recaída, incluso después de ser completados con éxito (Dutra et al., 2008; Kampman, 2019; Lappan et al., 2020). En este sentido, cabe destacar que la presencia de déficits cognitivos se ha relacionado consistentemente con una mayor probabilidad de abandono del tratamiento (Aharonovich et al., 2006) y una mayor tasa de recaída (Verdejo-García et al., 2014). Precisamente, las intervenciones de corte psicosocial requieren de áreas cognitivas que se ven afectadas en los consumidores de cocaína (p. ej., atención, flexibilidad, aprendizaje y memoria, etc.), lo cual podría obstaculizar el correcto seguimiento de la terapia (Sampedro-Piquero et al., 2019) y al mismo tiempo dificultar la adquisición de nuevos patrones de conducta adaptativos (Castilla-Ortega et al., 2017), favoreciendo la cronicidad del trastorno. Por tanto, el desarrollo de tratamientos que incluyan estrategias de mejora cognitiva podría incrementar la eficacia de la terapia y generar mejores resultados a medio y largo plazo (Mahoney, 2019; Perry & Lawrence, 2017).

## **2. MECANISMOS DE APRENDIZAJE IMPLICADOS EN LA BÚSQUEDA Y CONSUMO DE COCAÍNA**

Entre los desencadenantes más potentes de la recaída, la literatura en humanos y en modelos animales destaca el papel crítico de las claves asociadas con los efectos reforzantes de la droga. En este sentido, una gran parte de las personas que consumen

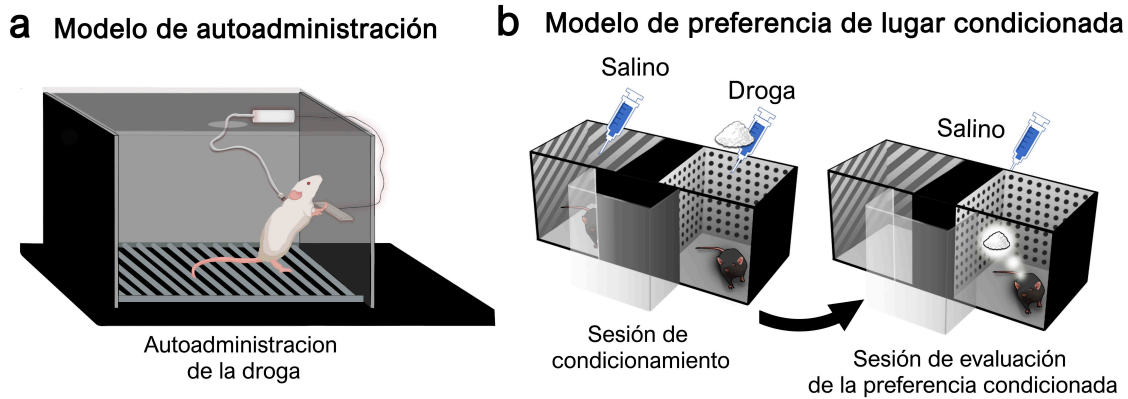
sustancias de abuso presentan respuestas fisiológicas (i.e. disminución en la temperatura de la piel, incremento en sudoración y frecuencia cardíaca) y psicológicas (i.e. *arousal* incrementado o un pronunciado deseo por consumir) ante la exposición a este tipo de claves aprendidas, las cuales actúan como “señales” que indican disponibilidad de la droga y que ejercen una influencia persistente sobre la conducta incluso en condiciones de abstinencia prolongada (Carter & Tiffany, 1999; O’Brien et al., 1990). Existe una amplia variedad de estímulos que pueden convertirse en claves asociadas con los efectos gratificantes de las drogas, tanto de naturaleza exteroceptiva (p. ej., objetos, personas, olores, espacios físicos, momentos del día, etc.) como interoceptiva (p. ej., ciertas sensaciones físicas, estados de ánimo u hormonales, etc.). Estos estímulos, en conjunto, conforman un “contexto” que puede ser asociado a los efectos reforzantes de las drogas de abuso a través de procesos de condicionamiento (Bouton, 1993, 2002).

Con el consumo repetido, los efectos gratificantes de la droga pueden asociarse de forma pasiva con un amplio rango de estímulos o claves contextuales. Así, estas señales (originalmente neutras) se convierten en estímulos condicionados capaces de desencadenar de forma recurrente conductas de búsqueda y consumo de la droga (Everitt, 2014). Estos comportamientos constituyen en un inicio acciones controladas y dirigidas a un objetivo (p. ej., obtener el efecto deseado de la droga o evitar emociones negativas) y son moduladas en función del resultado obtenido. Sin embargo, cuando el uso de la droga se cronifica, las acciones de búsqueda y consumo de la droga pueden convertirse en un hábito desencadenado por la presencia de claves contextuales. En este punto, los estímulos condicionados pueden generar por sí mismos un fuerte *craving*, de forma que la búsqueda de droga es evocada de forma automática, no siendo controlada mediante una percepción consciente y produciéndose a pesar de la presencia de procesos cognitivos superiores como la voluntad o decisión de no tomar drogas. Esto favorece que las conductas de búsqueda y consumo compulsivo de la droga sean muy difíciles de inhibir en presencia de las claves asociadas con la misma (Crombag et al., 2008; Ersche et al., 2016; Lüscher et al., 2020). Por ello, el uso de estrategias para debilitar la fuerza de estas asociaciones droga-contexto puede tener interés terapéutico en tanto que podría favorecer el control del *craving* y, por ende, reducir el riesgo de recaída (Torregrossa & Taylor, 2013).

Una de las estrategias que se han propuesto para controlar la expresión de estos hábitos desadaptativos es favorecer la extinción de las asociaciones droga-contexto. La extinción es un fenómeno de aprendizaje que implica la eliminación progresiva de una respuesta aprendida cuando esta deja de ser reforzada (Bouton, 2000, 2002; Quirk & Mueller, 2007). En el ámbito del consumo de drogas, el aprendizaje de extinción implica el establecimiento de una nueva asociación en la que los estímulos o claves condicionadas se presentan repetidamente en ausencia de los efectos de la sustancia. Esta nueva asociación actuaría inhibiendo o interfiriendo con el aprendizaje inicial, favoreciendo así la reducción gradual de los eventos fisiológicos y psicológicos que ocurren en respuesta a la exposición a las claves contextuales asociadas con los efectos reforzantes de la droga (Torregrossa et al., 2011; Torregrossa & Taylor, 2013). Sin embargo, y a pesar de su potencial terapéutico, las intervenciones basadas en la extinción (p. ej., terapia de exposición) han mostrado una baja eficacia en el tratamiento del trastorno por uso de sustancias (Nic Dhonnchadha & Kantak, 2011). El aprendizaje de extinción presenta ciertas dificultades ya que es sensible a procesos naturales como la reaparición de la respuesta extinguida con el paso del tiempo (recuperación espontánea) o tras un cambio de contexto (renovación; Torregrossa & Taylor, 2013). Además, las asociaciones droga-contexto son resistentes a la modificación (Kutlu & Gould, 2016) y las respuestas extinguidas son susceptibles a fenómenos de reinstauración, que implican la recuperación

de la asociación original entre el efecto de la droga y las claves contextuales, fomentando de nuevo la conducta de búsqueda y consumo de la sustancia (Bouton, 1993, 2002). La reinstauración puede ocurrir por distintas causas, entre las que destacan la exposición a los efectos de la droga (*priming*), las situaciones de estrés o la reexposición al contexto de consumo o a claves discretas asociadas a la droga (Shaham et al., 2003). En el caso de la reinstauración inducida por *priming*, se ha observado que una sola dosis subumbral es suficiente para producir la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga. Este incremento en la motivación por consumir constituye el denominado “efecto *priming*” y supone un factor precipitante de la recaída (De Wit, 1996). Precisamente, la reinstauración inducida por *priming* es más potente cuando ocurre en presencia de claves contextuales previamente asociadas con los efectos de la droga (Spealman et al., 1999). Dado que la recaída en el uso de sustancias se suele producir en ambientes familiares en los que se había consumido previamente, resulta relevante desarrollar estrategias que favorezcan una extinción duradera y generalizada de las asociaciones droga-contexto con el objetivo de prevenir de forma consistente la recaída en el consumo (Shaham et al., 2003).

Gran parte de la evidencia disponible en relación con la adquisición y mantenimiento de asociaciones cocaína-contexto procede de estudios desarrollados en roedores. El uso de modelos animales ha sido y sigue siendo fundamental para comprender los mecanismos psicobiológicos involucrados en el desarrollo de conductas desadaptativas relacionadas con drogas. Aunque no existen paradigmas experimentales capaces de abordar todos los aspectos que definen el trastorno por uso de sustancias, sí existen modelos con validez predictiva sobre componentes concretos del ciclo adictivo (uso compulsivo de la droga, abstinencia o *craving*; (Koob & Le Moal, 2006). Hasta el momento, los paradigmas más usados para estudiar los mecanismos subyacentes a los efectos reforzantes de las drogas son los modelos de autoadministración y de preferencia de lugar condicionada (PLC; Koob & Le Moal, 2006; **Figura 1**). El modelo de autoadministración se basa principalmente en fenómenos de condicionamiento operante y permite evaluar los efectos reforzantes primarios de la droga mediante el estudio directo del comportamiento de búsqueda y consumo (Aguilar et al., 2009; McKendrick & Graziane, 2020). En este modelo, el animal lleva a cabo una respuesta (p. ej., presionar una palanca) que le proporciona una dosis de la droga, como la cocaína, vía oral o intravenosa generalmente. Además, este modelo permite estudiar los efectos derivados de las asociaciones entre las claves presentes en el ambiente y el consumo de la droga (Panlilio & Goldberg, 2007). Por su parte, los mecanismos de aprendizaje que subyacen al establecimiento de la PLC se basan principalmente en fenómenos de condicionamiento clásico pavloviano. En este sentido, un conjunto de estímulos ambientales originalmente neutros (que conforman un “contexto” determinado) son asociados con un evento motivacionalmente significativo (el efecto de una droga o estímulo incondicionado). Como resultado de esta asociación, el contexto neutro se convierte en un estímulo condicionado con capacidad de evocar una respuesta condicionada similar a la generada directamente por efecto de la droga (respuesta incondicionada). De esta forma, la exposición al contexto asociado a la droga fomentará la exploración del mismo por parte del animal (Huston et al., 2013; McKendrick & Graziane, 2020). Entre las principales ventajas del modelo del PLC destacan su mayor simplicidad metodológica (i. e., no requiere la realización de procedimientos quirúrgicos, como ocurre con el modelo de autoadministración intravenosa), su sensibilidad ante efectos derivados de dosis bajas de la droga, la posibilidad de medir simultáneamente otros cambios inducidos por la droga (p. ej., en la actividad locomotora) y su utilidad para estudiar los circuitos neuronales implicados en la recompensa por drogas (Bardo & Bevins, 2000).



**Figura 1. Principales modelos animales utilizados en el estudio del comportamiento de tipo adictivo.** **a)** En el modelo de autoadministración se usa habitualmente una caja operante donde el animal puede ejercer una conducta (p. ej., presión de una palanca) que le proporciona el reforzador (p. ej., la administración de la droga vía intravenosa, intraperitoneal u oral). El programa de refuerzo puede ser manipulado, determinando cuántas veces se debe pulsar la palanca u otras acciones para recibir la droga. Estas características permiten estudiar distintos aspectos de la conducta de búsqueda de drogas, como la intensidad, la persistencia de la búsqueda, o el efecto de las claves ambientales sobre el comportamiento de búsqueda de la droga. **b)** En el paradigma de preferencia de lugar condicionada las propiedades motivacionales primarias de la droga sirven como estímulo incondicionado que es emparejado repetidamente con un contexto o compartimento del laberinto. Durante la fase de condicionamiento, el contexto previamente neutro adquiere propiedades motivacionales secundarias de tal forma que actuará como un estímulo condicionado fomentando durante la posterior sesión de evaluación el acercamiento del animal al compartimento asociado con la droga. La tarea de preferencia de lugar condicionada aporta información relevante sobre la adquisición de las conductas condicionadas de búsqueda de droga y el mantenimiento, extinción o reinstauración de las mismas.

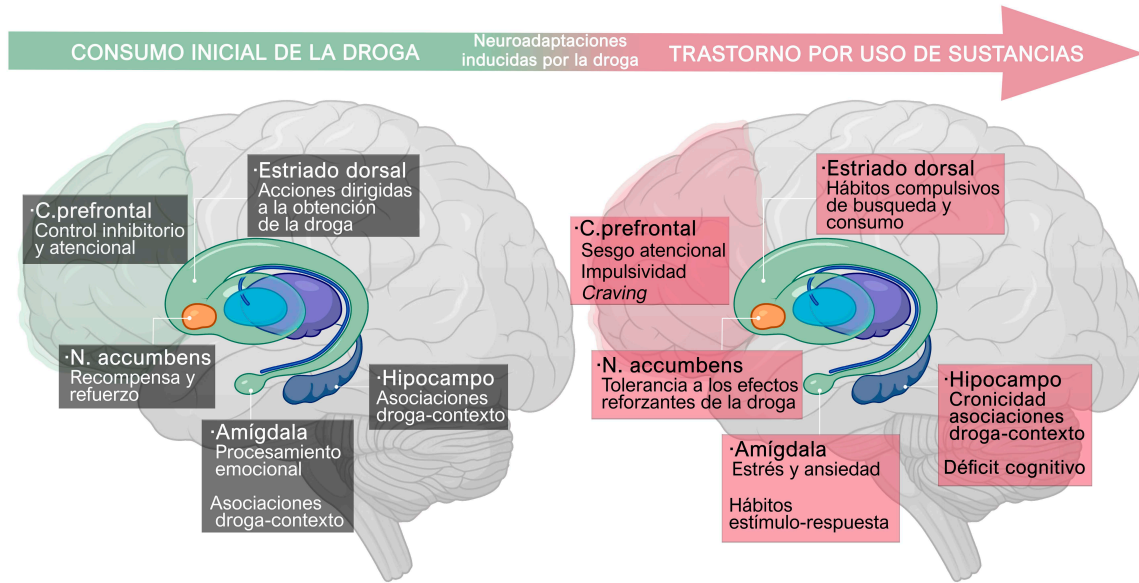
Los modelos de PLC y autoadministración también han sido usados en roedores para estudiar los factores que facilitan la extinción y/o que dificultan la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto previamente adquiridas, así como para el estudio de posibles intervenciones farmacológicas y comportamentales que faciliten la modulación de estos fenómenos (Liu et al., 2019; Taylor et al., 2009). En ambos modelos, la extinción consiste en la exposición repetida de los animales a la clave condicionada en ausencia de los efectos de la droga. Se considera que se ha producido la extinción si en una sesión posterior el animal no muestra una preferencia significativa por el contexto asociado a la droga (en la PLC; Aguilar et al., 2009) o si disminuye significativamente la ratio de respuesta incluso en presencia de la clave condicionada (p. ej., menor presión de la palanca en el modelo de autoadministración; Everitt & Robbins, 2000). Tras la extinción, la recaída en el uso de la droga puede ser modelada mediante la evaluación del fenómeno de reinstauración (Mueller & Stewart, 2000; Soria et al., 2008) que puede producirse mediante la administración de una dosis *priming* de la sustancia, la presentación de estímulos estresantes (Aguilar et al., 2009; Soria et al., 2008) o la reexposición a las claves previamente asociadas a la droga (Soria et al., 2008). Generalmente, las sesiones de reinstauración de la PLC consisten en la administración de una única dosis “*priming*” de la droga (Shaham et al., 2003) seguida de la exploración libre de los distintos contextos (i. e., compartimentos) por parte del animal. Así, la reinstauración de las asociaciones contexto-droga implica que el animal volvería a mostrar preferencia por el contexto condicionado (Mueller & Stewart, 2000).

La investigación en animales de laboratorio ha aportado una mayor comprensión sobre los mecanismos neurobiológicos que contribuyen a la vulnerabilidad y el mantenimiento de la conducta de tipo adictivo. En este sentido, los estudios realizados con roedores indican que el consumo repetido de cocaína se relaciona con alteraciones

neurales y deterioro del funcionamiento de zonas cerebrales implicadas en el control motivacional de la conducta, la emoción y la cognición (Everitt & Robbins, 2016; Koob & Volkow, 2016), y que precisamente contribuyen al desarrollo y mantenimiento de recuerdos asociativos droga-estímulo (Everitt, 2014; Torregrossa & Taylor, 2013). Como consecuencia, la dependencia a sustancias de abuso es considerada actualmente un trastorno con una marcada influencia biológica (Torregrossa et al., 2011), y por ello, el avance en el estudio de las neuroadaptaciones que subyacen al consumo problemático de drogas puede ser de gran relevancia para el desarrollo de alternativas terapéuticas más eficaces.

### 3. BASES NEUROBIOLÓGICAS DEL TRASTORNO POR USO DE COCAÍNA: IMPLICACIÓN DEL HIPOCAMPO Y LA NEUROPLASTICIDAD HIPOCAMPAL

La investigación sobre la adicción a las drogas ha definido, en gran medida, los circuitos neuronales que se encuentran implicados en el refuerzo. Los cambios en la activación del sistema de recompensa cerebral inducidos por el consumo de drogas son esenciales en la comprensión del desarrollo de la adicción. Las sustancias de abuso activan los sistemas cerebrales relacionados con el refuerzo, la motivación y el desarrollo de hábitos, entre los que se encuentra el sistema dopaminérgico mesolímbico (Kelley & Berridge, 2002; Wise, 2004), que ha recibido especial atención en el caso de las drogas psicoactivas. Este sistema se encuentra conformado principalmente por neuronas dopaminérgicas localizadas en el Área Tegmental Ventral (ATV), las cuales envían proyecciones al Núcleo Accumbens (NAc, también denominado estriado ventral) y a otras estructuras corticales y subcorticales como la corteza prefrontal (CPF), la amígdala o el hipocampo (Pierce & Kumaresan, 2006). Aunque la cocaína interacciona con varios sistemas de neurotransmisión cerebral, la mayor parte de sus efectos se derivan de un incremento en la señalización monoaminérgica, principalmente de la liberación de dopamina (DA; Di Chiara & Imperato, 1988). En términos funcionales, la cocaína aumenta los niveles de DA de forma indirecta, bloqueando al transportador de DA (DAT) y por ende reduciendo la recaptación de este neurotransmisor a nivel presináptico (Volkow et al., 1997) y mediante la degradación autofágica del mismo (Harrasz et al., 2021). Asimismo, la cocaína aumenta los niveles de DA también de manera indirecta, al reducir la actividad de la población de interneuronas GABAérgicas del ATV que controlan la liberación de DA (Steffensen et al., 2008). El aumento rápido en los niveles de DA media los efectos gratificantes de las drogas a través de la activación de los receptores D1 (Caine et al., 2007) y D2 (Bari & Pierce, 2005) presentes en el NAc y otras regiones cerebrales. El NAc interviene en el procesamiento de las sensaciones placenteras y de satisfacción provocadas por el consumo agudo de cocaína, las cuales incrementan la motivación por volver a consumir (Nestler, 2005). La integridad del circuito que involucra al NAc, la amígdala y otras regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal (CPF) resulta fundamental en la búsqueda y consumo de la droga tanto durante las fases iniciales de consumo controlado como en el establecimiento de las asociaciones droga-estímulo que promueven el desarrollo del patrón de consumo incontrolado (Everitt et al., 2008; Everitt & Robbins, 2005; **Figura 2**).



**Figura 2. Circuito cerebral de la adicción.** El consumo repetido de la droga provoca neuroadaptaciones en el circuito cerebral que promueven la conducta de búsqueda de la droga y el desarrollo del trastorno por uso de sustancias. Durante el consumo inicial, el núcleo accumbens se encuentra involucrado en los efectos reforzantes de las drogas y en la creación de asociaciones entre dichos efectos y los estímulos ambientales presentes durante el consumo, los cuales promueven la búsqueda controlada del refuerzo. Con el consumo repetido de la droga, se produce un desplazamiento del control desde el núcleo accumbens hacia la porción lateral del estriado dorsal. Esta región desempeña un papel principal en la generación de hábitos estímulo-respuesta y en la cronicación del consumo, que son características del trastorno por abuso de sustancias. La corteza prefrontal también se ve comprometida, observándose una pérdida progresiva del control inhibitorio sobre los hábitos de búsqueda de droga, y una mayor saliencia incentiva de los estímulos relacionados con la misma en comparación con los reforzadores naturales. Las neuroadaptaciones generadas en otras estructuras límbicas implicadas en la memoria y la regulación emocional, como el hipocampo y la amígdala, fomentan la persistencia a largo plazo de las asociaciones droga-contexto.

El consumo repetido de cocaína induce cambios neuroadaptativos persistentes que subyacen al desarrollo del trastorno por uso de sustancias (Koob & Volkow, 2016). En este sentido, la exposición repetida a la droga provoca cambios en las estructuras cerebrales de proyección dopaminérgica como el NAc o el estriado dorsal. De esta forma, el consumo repetido produce una disminución en la capacidad de la cocaína para inhibir al transportador DAT lo que implica una mayor recaptación de la dopamina disponible en el espacio sináptico y por ende menores niveles de dopamina (Calipari et al., 2014). Asimismo, se han descrito cambios en la funcionalidad de los terminales dopaminérgicos, observándose una disminución en la sensibilidad de los autorreceptores pre-sinápticos D2 (Mateo et al., 2005) y una disminución en la densidad de receptores post-sinápticos D2 (Nader et al., 2002, 2006) tras un consumo crónico de cocaína. Estos cambios contribuyen al desarrollo de tolerancia a los efectos de la droga y, en consecuencia, fomentan la necesidad de consumir dosis cada vez mayores en un intento por alcanzar los mismos efectos gratificantes (Volkow & Morales, 2015). Cabe destacar que las mencionadas neuroadaptaciones parecen persistir tras la abstinencia a la droga durante largos períodos de tiempo (i.e. 1 año) aunque los estudios con modelos animales indican la existencia de diferencias individuales en su recuperación (Nader et al., 2006). En humanos, también se ha observado la permanencia de estos cambios (i.e. la reducción en la densidad de receptores D2) durante periodos prolongados de abstinencia a la droga (p. ej. 3-4 meses; Volkow et al., 1993), que podrían fomentar la recaída en el consumo. Por otro lado, la transición desde un consumo controlado a un consumo

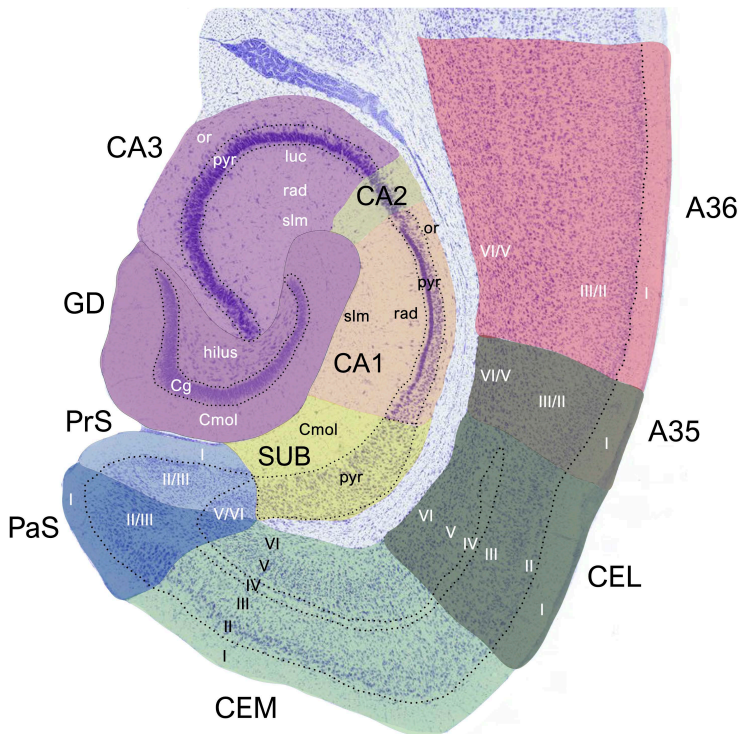
compulsivo de la droga podría verse favorecida por neuroadaptaciones que desplazarían progresivamente el control de la conducta desde el NAc hacia el estriado dorsal, que precisamente participa en la ejecución de acciones dirigidas a objetivos (p. ej., la obtención de una recompensa) y la formación de hábitos estímulo-respuesta (Everitt, 2014; Lüscher et al., 2020). En consonancia con estas funciones, los estudios con modelos animales de autoadministración han observado la implicación del estriado dorsal en el establecimiento inicial de la conducta de búsqueda de cocaína y el desarrollo posterior del hábito compulsivo de búsqueda y consumo de la droga (Murray et al., 2012; Zapata et al., 2010), incluyendo la reinstauración del consumo de la droga tras un proceso de abstinencia (See et al., 2007). Asimismo, se ha observado que la exposición a claves contextuales asociadas a la cocaína genera una mayor liberación de DA en el sistema de recompensa, concretamente en el estriado dorsal de personas con dependencia a la droga, y este incremento en la ocupación de los receptores dopaminérgicos correlaciona con la sensación subjetiva de *craving* que reportan (Volkow et al., 2006; Wong et al., 2006).

A pesar de su importante papel en el desarrollo del trastorno por abuso de cocaína, el estriado constituye solo una parte de la compleja red neuronal implicada en la dependencia a la droga, manteniendo conexiones recíprocas con otras estructuras límbicas (Volkow & Morales, 2015). Estas regiones resultan claves en la comprensión de las manifestaciones características del trastorno adictivo, cumpliendo un papel importante en el aprendizaje contextual y en los procesos de regulación de la cognición y la emoción. La amígdala participa en la adquisición de asociaciones condicionadas conformadas por estímulos con una valencia apetitiva o aversiva. Su papel en esta función se encuentra relacionado con su procesamiento de las respuestas emocionales como el estrés, la ansiedad y el miedo (Murray, 2007). Concretamente, el complejo basolateral de la amígdala forma parte junto con el NAc del circuito que controla las conductas de búsqueda de cocaína durante el consumo agudo o “recreacional”. Su papel coordinado con el NAc es especialmente importante en el procesamiento de las conductas de búsqueda de droga motivadas por información asociativa, ya que favorece la realización de secuencias prolongadas de búsqueda de droga que son reforzadas por las claves asociadas a la cocaína (Everitt & Robbins, 2005). Además, recientemente, se ha propuesto que el núcleo central de la amígdala fomentaría el desarrollo de los hábitos estímulo-respuesta controlados por el EDL, por lo tanto, participando también en la búsqueda y consumo compulsivos de la cocaína (Murray et al., 2015). Por último, en concordancia con su papel en el control de las emociones se encuentra implicada en el estrés y ansiedad experimentadas durante la abstinencia (Koob & Volkow, 2016). Por su parte, la CPF es crucial en la red neural de control ejecutivo, participando en procesos cognitivos superiores como la memoria de trabajo, el control de acciones dirigidas a un objetivo, la toma de decisiones en función de la recompensa, o el control atencional o inhibitorio de la conducta, entre otras (Ceceli et al., 2021). En lo que respecta a la adicción a la cocaína, las regiones de la CPF (especialmente la corteza orbitofrontal, la CPF medial y la corteza cingulada anterior) se han visto implicadas en el fomento o inhibición de la búsqueda de droga, en el deseo irrefrenable por consumir (*craving*), así como en la formación de los hábitos estímulo-respuesta relacionados con las drogas (Feil et al., 2010; Goldstein & Volkow, 2011; Volkow & Morales, 2015). En este último aspecto, el control inhibitorio y atencional ejercido por la CPF es clave ya que conforme se desarrolla el trastorno por abuso de cocaína, la CPF disminuye paulatinamente su función inhibitoria (Kaufman et al., 2003) lo que favorece la aparición de acciones automáticas. Al mismo tiempo, se produce un aumento del sesgo atencional y la reactividad hacia las claves asociadas a la droga, factores que precipitan la recaída (Marhe et al., 2013). Finalmente, la formación hipocampal ha recibido menos atención en los estudios sobre drogas en

comparación con otras estructuras cerebrales (Everitt, 2014). Sin embargo, se trata de una región de especial relevancia en este ámbito que recibe aferencias dopaminérgicas del ATV y envía eferencias de vuelta a través del NAc (Lisman & Grace, 2005) manteniendo un papel importante en la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto. Debido a la importancia que tiene en los estudios que se han desarrollado en esta tesis doctoral, en los apartados siguientes se profundiza de forma exhaustiva en esta región temporal.

### 3.1 Neuroanatomía del hipocampo

Desde el punto de vista anatómico, la formación hipocampal<sup>1</sup> (FH; **Figura 3**), presenta una estructura en forma de C y se encuentra situada en la zona caudal del cerebro. Tiene tres subregiones distintas que pueden ser diferenciadas: el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho también denominado “cuerno de Amón” o “*Cornu Ammonis*” (CA; constituido por CA1, CA2 y CA3) y el subículo. La corteza que constituye la FH se encuentra conformada por tres capas. La primera capa es la más profunda, formada por una mezcla de fibras e interneuronas aferentes y eferentes. En el GD, esta capa es denominada *hilus* o capa polimórfica mientras que en las regiones de CA es denominada *stratum oriens*. Bordeando al *hilus* en el GD se encuentra una capa celular compuesta principalmente por neuronas granulares, que puede ser distinguida fácilmente por sus células densamente empaquetadas. Por su parte, en las regiones de CA y el subículo, esta capa está compuesta por células piramidales e interneuronas, y es denominada *stratum pyramidale*. Por último, la capa más superficial es la llamada capa molecular (*el stratum moleculare*) en el GD y el subículo. En la región de CA la capa molecular se subdivide a su vez en diversas subcapas. En CA3, se pueden distinguir el



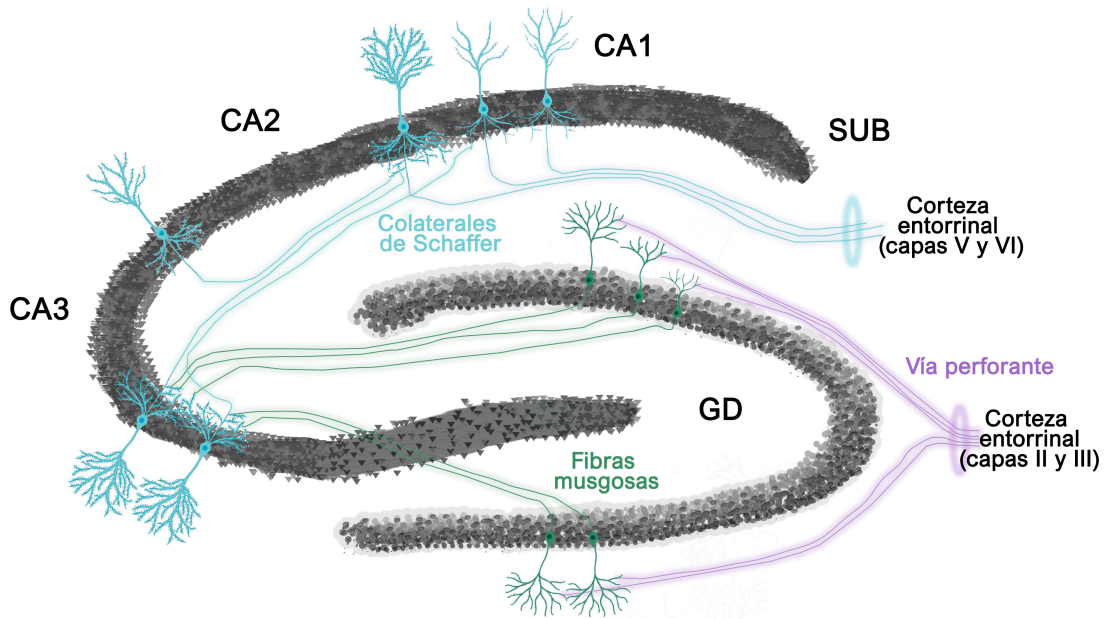
**Figura 3. Representación de la formación hipocámpal y de la región parahipocámpal en el cerebro de rata.** Sección transversal horizontal tratada con la tinción de Nissl en la que se encuentran coloreados los subcampos de la región hipocámpal y parahipocámpal en correspondencia con el atlas espacial Waxholm (Kjonigsen et al. 2015; Papp et al. 2014). Los números romanos indican las capas de la corteza. Abreviaturas: A35, área 35 perirrinal; A36, área 36 perirrinal; CA, *Cornu Ammonis*; CEL, corteza entorrinal lateral; CEM, corteza entorrinal medial; Cg, capa granular; Cmol, capa molecular; GD, giro dentado; luc, *stratum lucidum*; or, *stratum oriens*; PaS, parasubículo; PrS, presubículo; pyr, *stratum pyramidale*; rad, *stratum radiatum*; slm, *stratum lacunosum-moleculare*.

<sup>1</sup>La terminología empleada para describir las regiones hipocámpales no es consensuada a lo largo de la literatura sobre hipocampo. Comúnmente, en la literatura de experimentación animal, bajo el término hipocampo se incluyen el GD junto con los subcampos de CA. Para facilitar la comprensión de esta Tesis Doctoral, en el resto de los apartados, se utiliza el término hipocampo con esta acepción.

*stratum lucidum* que recibe *input* del GD a través de las fibras musgosas, así como el *stratum radiatum* que contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales y, por último, más superficialmente el *stratum lacunosum-moleculare* conformado por la porción distal de las ramificaciones de las dendritas apicales. La distribución en CA1 y CA2 es similar, con la excepción de que no contienen *stratum lucidum*. De forma adyacente a la formación hipocampal, rodeando al subículo, se encuentra la región parahipocampal. Esta región, se subdivide en cinco capas que se distribuyen en el complejo subicular (presubículo y parasubículo) y la corteza entorrinal (CE; dividida en medial y lateral), perirrinal y postrinal (Amaral & Witter, 1989; Hannula & Duff, 2017; Van Strien et al., 2009; Witter & Amaral, 2004).

Existen varias vías de entrada de la información al hipocampo, aunque la mayor parte del *input* neocortical proviene de la CE. El circuito sináptico hipocampal es principalmente unidireccional. De esta forma, el GD recibe aferencias principalmente a través de la denominada vía perforante de la CE. La CE proyecta axones (p. ej., fibras musgosas) hacia las células granulares del GD (CGD), las cuales a su vez establecen conexiones sinápticas con las neuronas piramidales de CA3. Las células piramidales de CA3 envían axones (conocidos como *colaterales de Schaffer*) y forman sinapsis con las neuronas piramidales de CA1. El campo de CA1 proyecta unidireccionalmente, bien fuera del hipocampo o hacia el subículo. Las neuronas del subículo finalmente envían la información fuera del hipocampo o de vuelta al área entorrinal. Estas conexiones cierran un bucle de procesamiento de información del hipocampo que comienza en las capas más superficiales de la CE (capas II y III principalmente) y termina en las capas más profundas de esta estructura (capas V y VI), conformando el denominado circuito “trisináptico” (Andersen et al., 1971; Amaral & Lavenex, 2006; Van Strien et al., 2009; **Figura 4**).

Las principales aferencias de la FH proceden principalmente de las áreas corticales de asociación polimodal, en las que confluyen los *inputs* de distintos sistemas sensoriales. De esta forma, la FH recibe indirectamente (a través de la CE) información sensorial multimodal procedente de una gran variedad de zonas neocorticales entre las que se encuentran regiones olfativas, somatosensoriales (corteza insular), temporales (corteza estriada, auditiva, giro temporal superior), frontales (corteza frontal medial y lateral, corteza orbitofrontal), parietales y retrospleniales (Hannula & Duff, 2017). Además, recibe inervación directa de zonas subcorticales como el tálamo, el núcleo septal, el hipotálamo (núcleos supramamilar y tuberomamilar) y el tronco encefálico (locus coeruleus, área tegmental ventral, núcleos del rafe; (Amaral & Lavenex, 2006; Witter et al., 1989; Witter & Amaral, 2004). A su vez, la FH envía eferencias hacia la mayor parte de regiones de la corteza desde las que recibe información. Las conexiones eferentes del hipocampo se originan principalmente en el subículo, pero también en las neuronas piramidales de CA1 y CA3, las cuales forman un haz de fibras en la zona lateral del hipocampo denominado fimbria. Los axones que parten desde la FH y se dirigen hacia el prosencéfalo terminan constituyendo los pilares del fórnix, una estructura que se divide rostral y caudalmente inervando estructuras telencefálicas (núcleo septal, núcleos olfativos, cuerpos amigdalinos, NAc) y diencefálicas (tálamo, hipotálamo, tubérculos mamilares). Asimismo, algunas fibras de la fimbria y el fórnix se dirigen hacia la FH contralateral y la columna contralateral del fórnix respectivamente, favoreciendo la comunicación interhemisférica (Swanson & Cowan, 1975, 1977; Witter & Amaral, 2004). Por su localización y conectividad dentro de esta extensa red de estructuras corticales y subcorticales, la FH constituye un nodo muy relevante en el proceso de integración e intercambio de información, desempeñando un papel significativo como soporte de diversas funciones cognitivas superiores (Battaglia et al., 2011).

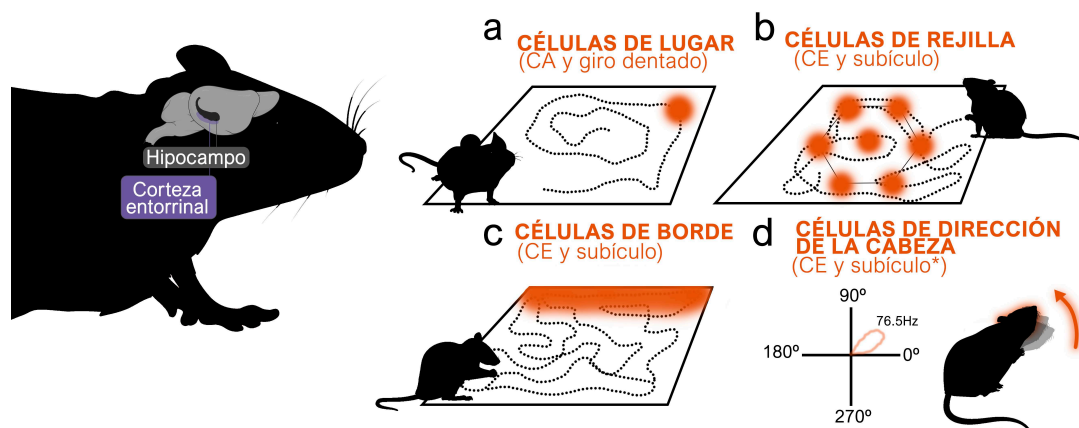


**Figura 4. Circuito trisináptico hipocámpal.** El hipocampo recibe la entrada principal de información desde las capas II y III de la corteza entorrinal a través de proyecciones glutamatérgicas que conforman la denominada vía perforante y que inervan las células granulares del giro dentado (GD). Estas células envían a su vez axones, conocidos como fibras musgosas, a las neuronas piramidales de CA3, las cuales proyectan fibras conocidas como colaterales de Schaffer y hacen sinapsis con las neuronas piramidales de CA1. Finalmente, estas neuronas de CA1 envían proyecciones de vuelta a la corteza entorrinal (capas V y VI) y la región del subículo (SUB), cerrando el “bucle hipocámpal”. Para facilitar la visualización las fibras de la vía perforante se representan en color morado, las fibras musgosas se representan en color verde y las colaterales de Schaffer y proyecciones de CA1-corteza entorrinal se representan en color azul. Abreviaturas: GD, giro dentado; CA, Cornu Ammonis; SUB, subículo.

### 3.2 El hipocampo como sustrato del aprendizaje y la memoria espacial

Originalmente, los estudios sobre la funcionalidad del hipocampo se focalizaron en su participación en el sistema olfativo dadas sus conexiones directas con regiones implicadas en esta modalidad sensorial (Zhou et al., 2021). Sin embargo, la mayor parte de los estudios posteriores se han centrado en su papel en el aprendizaje y la memoria. En este sentido, el hipocampo comenzó a ganar interés dentro de la neurociencia de la memoria a raíz de una serie de intervenciones realizadas en pacientes con epilepsia, incluyendo al famoso H.M., a los que se les extirpó el lóbulo temporal medial como tratamiento quirúrgico de la enfermedad (Scoville & Milner, 1957). Los estudios de estos pacientes evidenciaron que una función principal del hipocampo y de las regiones cerebrales adyacentes es la de dar soporte a la creación de nuevas memorias declarativas, esto es, recuerdos que pueden ser verbalizados y percibidos conscientemente (Squire, 1992). A este respecto, se ha constatado que el hipocampo es un soporte neurobiológico esencial para la memoria semántica (relacionada con hechos y conocimientos generales sobre el mundo) y también para la memoria episódica, que implica el recuerdo de acontecimientos (episodios) ligados a un momento y contexto determinados (Bird & Burgess, 2008; Duff et al., 2020). En estrecha relación con la memoria episódica se encuentra la memoria espacial, la cual implica el aprendizaje y recuerdo de información contextual necesaria para la exploración del entorno (Ekstrom & Ranganath, 2018). El papel del hipocampo como sustrato de la memoria espacial ha sido ampliamente constatado en la

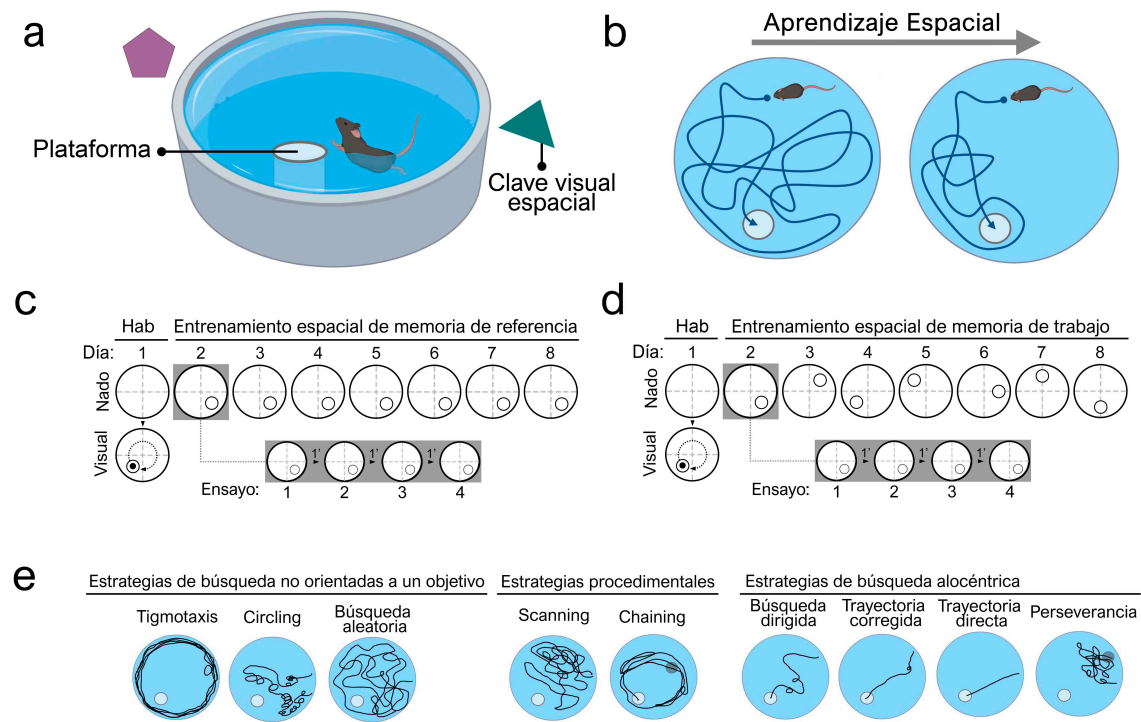
literatura científica. El estudio de las células de lugar del hipocampo, junto con el de otros tipos de células descubiertas posteriormente (p. ej., las células rejilla de la CE) que responden a diferentes aspectos ambientales (dirección de la cabeza, bordes, distancia recorrida, momento temporal; Hartley et al., 2013) sugiere que esta región elabora un mapa cognitivo del contexto utilizado durante el aprendizaje (Hartley et al., 2013; O'Keefe, 1976; **Figura 5**), el cual incluiría información tanto espaciotemporal como relacionada con eventos motivacionalmente significativos (p. ej., la presentación de una recompensa; Eichenbaum & Cohen, 2014). En apoyo a esta hipótesis, se ha observado que las neuronas hipocampales codifican los lugares en los que se ha recibido una recompensa y reorganizan la representación en la red neural ante la aparición de recompensas nuevas (Dupret et al., 2010; Hannula & Duff, 2017; McKenzie et al., 2013).



**Figura 5. Principales tipos de células espaciales encontradas en la formación hipocampal.** La figura representa un ejemplo de cada tipo principal de célula espacial. En naranja se indican los distintos patrones de actividad de las células en función de la localización del animal o de la posición de su cabeza en un contexto determinado. **a)** Las células de lugar se encuentran en CA y el giro dentado del hipocampo. Cada célula de lugar incrementa su actividad cuando el animal se encuentra en una zona determinada del contexto, lo cual constituye el campo de lugar de la célula. **b)** Las células de rejilla se encuentran en la corteza entorrinal (CE) principalmente, aunque también en pre y parasubículo. Las células de rejilla disparan en localizaciones específicas del ambiente, pero a diferencia de las células de lugar cada célula de rejilla presenta múltiples campos de disparo que cubren el ambiente con un patrón regular y hexagonal en forma de rejilla. **c)** Las células de borde se encuentran principalmente en el subículo y CE, pero también en pre y parasubículo. La mayoría de las células de borde presentan campos de disparo cercanos a los bordes de un ambiente determinado (barreras verticales o bordes). **d)** Las células de dirección de la cabeza proporcionan una representación del rumbo aloentróico independiente de la localización. Se encuentran principalmente en la CE y subículo, aunque pueden encontrarse también fuera de la formación hipocampal\*. Cada célula de dirección de la cabeza incrementa su actividad cuando el animal se orienta hacia una dirección determinada; por ejemplo, en la gráfica la dirección preferente de la célula representada son los 45°. Abreviaturas: CA, *Cornu Ammonis*; CE, corteza entorrinal.

De esta forma, la actividad coordinada de las células hipocampales podría conformar la base neurobiológica que sostiene, al menos parcialmente, la representación del contexto en el que un evento específico tiene lugar (Eichenbaum et al., 2007). El papel del hipocampo en la memoria espacial y contextual se ha constatado en multitud de paradigmas de conducta animal (p. ej., laberinto de Barnes, laberinto de hoyos, laberinto en Y; Sharma et al., 2010), si bien la mayor parte de la información a este respecto se deriva del uso de la tarea de laberinto acuático de Morris (MWM; Morris, 1984; **Figura 6**). En esta prueba, el animal es ubicado en una piscina circular y debe localizar una pequeña plataforma de escape oculta bajo la superficie del agua. Durante la tarea, el animal dispone de una serie de claves espaciales distales que puede emplear para

aprender rápidamente la posición de la plataforma de escape. La disponibilidad de estas claves espaciales favorece el uso de estrategias de navegación espacial allocéntrica, que son aquellas que permiten ubicar información en un set de coordenadas espaciotemporales y que, precisamente, constituyen un ejemplo paradigmático de aprendizaje dependiente de hipocampo (De Bruin et al., 2001; Morris et al., 1982).



**Figura 6. Laberinto acuático de Morris.** **a)** En la tarea del laberinto acuático de Morris se emplea una piscina que contiene una plataforma sumergida bajo el agua y que permite al roedor escapar del agua colocándose sobre ella. El animal es colocado en la piscina desde diferentes puntos de partida y debe aprender la localización de la plataforma oculta guiándose mediante claves espaciales distribuidas fuera del laberinto. **b)** La principal medida de aprendizaje de la tarea es la latencia o tiempo empleado por el animal para encontrar la plataforma. A medida que el animal aprende, se observa una menor latencia de escape, así como una menor distancia recorrida hasta la plataforma. **c)** En el protocolo de memoria de referencia, la localización de la plataforma se mantiene constante a lo largo de los días. **d)** En el protocolo de memoria de trabajo la localización de la plataforma es modificada cada día, pero se mantiene estable durante los ensayos dentro de un mismo día. Este protocolo presenta una mayor complejidad, ya que requiere el aprendizaje de la nueva localización de la plataforma cada día. **e)** Las estrategias de búsqueda de la plataforma empleadas por los animales constituyen una medida del nivel de aprendizaje espacial de la tarea. Las estrategias no orientadas al objetivo y procedimentales o egocéntricas son estrategias de búsqueda de la plataforma no guiadas por las claves distales, indicando un nivel bajo de aprendizaje espacial. Las estrategias de búsqueda allocéntrica requieren del hipocampo e indican que el animal se orienta mediante las claves distales para alcanzar la plataforma. Abreviaturas: *hab*, habituación.

Comúnmente, tras un período de aprendizaje los animales recuerdan la localización de la plataforma al ser evaluados en un ensayo de prueba en la que esta se encuentra ausente (Morris, 1984). Sin embargo, la literatura demuestra que los animales con deterioro hipocampal inducido por la lesión (Morris et al., 1982), la inactivación de esta estructura (Morris et al., 1986), o bien por efecto del envejecimiento (Gallagher & Nicolle, 1993), presentan dificultades para aprender y realizar correctamente la tarea de MWM. Estos déficits son detectados mediante distintos parámetros clásicamente empleados para medir el desempeño de los animales en la realización de la prueba. De esta

forma, durante los ensayos de aprendizaje de la tarea, los animales que presentan deterioro hipocampal muestran una mayor latencia para alcanzar la plataforma y/o una mayor distancia recorrida durante la exploración de la piscina, mientras que en el ensayo de prueba los déficits aparecen evidenciados por un menor tiempo de exploración del cuadrante en el cual se encontraba previamente la plataforma (Gallagher et al., 1993; Morris et al., 1982, 1986). Curiosamente, aunque con mayor dificultad, los animales con lesión hipocampal siguen siendo capaces de encontrar la plataforma, si bien lo hacen empleando estrategias de navegación egocéntrica, las cuales son independientes del hipocampo y se basan en claves internas de movimiento como el número de giros que se han realizado durante la búsqueda (Eichenbaum et al., 1990; Garthe & Kempermann, 2013). Cabe mencionar que las dificultades que presentan en la búsqueda de la plataforma no se deben a déficits motores, motivacionales o de refuerzo dado que los animales no presentan dificultades para encontrar y nadar hacia la plataforma en ensayos en los que esta se encuentra visible (Morris et al., 1982).

La función hipocampal en el procesamiento de la información espacial y contextual también guarda una estrecha relación con el aprendizaje asociativo complejo, como por ejemplo aquel que implica establecer una relación entre determinados contextos y estímulos. Se ha observado que las neuronas hipocampales participan en la codificación de este tipo de asociaciones complejas, así como en su consolidación, almacenamiento a largo plazo y modulación tras la presentación de nueva información (Biane et al., 2023). Esto ha sido demostrado en diversos paradigmas experimentales animales. En este sentido, los estudios en los que se provoca una lesión hipocampal electrolítica o farmacológica (i. e., microinfusión de agonistas NMDA) previamente o tras la adquisición de un condicionamiento de miedo al contexto han mostrado que el hipocampo participa en el aprendizaje asociativo de tipo aversivo especialmente cuando el estímulo incondicionado (p. ej., un shock eléctrico) es asociado con una representación conjunta de las distintas claves que constituyen el contexto en lugar de con claves aisladas (Kim & Fanselow, 1992; Rudy et al., 2002). Asimismo, el hipocampo también se ha visto implicado en el procesamiento de estímulos separados por un intervalo temporal, como ocurre en la tarea de condicionamiento palpebral de huella, en la que los animales asocian un estímulo sonoro con un soplo de aire en el ojo, a pesar de que ambos estímulos nunca se solapan en el tiempo. Estudios con lesiones neuroquímicas del hipocampo, así como de registro de la actividad hipocampal mediante imagen de calcio en vivo, han demostrado que la activación hipocampal es necesaria para el aprendizaje de esta tarea, pero no para la creación de asociaciones más simples en la que el EC y el EI se solapan en el tiempo (Modi et al., 2014; Tseng et al., 2004). Por último, estudios recientes relacionan la función del hipocampo también con la adquisición e inhibición de memorias que implican la asociación entre determinados estímulos contextuales y los efectos de drogas de abuso como la cocaína, aspectos que se desarrollarán en el siguiente apartado (Hitchcock & Lattal, 2018).

### **3.3 Papel del hipocampo en el aprendizaje asociativo cocaína-contexto**

El papel del hipocampo en el aprendizaje asociativo contextual adquiere una relevancia significativa en la investigación sobre drogas, ya que las asociaciones droga-contexto juegan un importante papel como factores precipitantes de la recaída en el consumo (Everitt, 2014). Precisamente, los estudios en población humana basados en el uso de técnicas de imagen por resonancia magnética funcional y tomografía por emisión de positrones han demostrado que la presentación de claves asociadas con la cocaína aumenta la liberación de dopamina en el hipocampo (Fotros et al., 2013) y además provoca

un aumento en la actividad de esta estructura (Grant et al., 1996) que se ha relacionado directamente con la percepción subjetiva de *craving* (Kilts et al., 2001; Potenza et al., 2012; Tomasi et al., 2015; Wexler et al., 2001). Estos hallazgos se complementan con la información aportada por los estudios realizados con modelos animales, los cuales han permitido determinar más específicamente el papel de la FH en el establecimiento y mantenimiento a largo plazo de las asociaciones cocaína-contexto. En este sentido, la inhibición farmacológica del hipocampo y/o de otras regiones pertenecientes a la FH como el subículo dificulta la adquisición, representación, consolidación y posterior recuperación de las asociaciones cocaína-contexto, un efecto observado tanto en modelos animales de PLC (Kramar et al., 2014; Meyers et al., 2006; Raybuck & Lattal, 2014) como de autoadministración (Atkins et al., 2008; Black et al., 2004). Asimismo, la investigación mediante el uso de estos paradigmas conductuales ha permitido determinar que la función hipocampal es fundamental para el aprendizaje de extinción de las asociaciones droga-contexto. A este respecto, se ha observado que la inhibición farmacológica o farmacogenética de esta estructura cerebral interfiere con el aprendizaje y la expresión de la memoria de extinción en modelos de PLC (Burgdorf et al., 2020; Hitchcock & Lattal, 2018) y autoadministración (Szalay et al., 2011). Más aún, la literatura indica que el hipocampo regula también la reinstauración de la conducta de búsqueda de drogas inducida por la reexposición al contexto, o por efecto de una dosis *priming* de la droga. En modelos de PLC se ha observado que el silenciamiento mediante optogenética de las neuronas hipocampales que procesan específicamente el contexto asociado a la droga impide la reinstauración inducida por *priming* de la conducta de búsqueda de droga (Trouche et al., 2016). Además, en modelos de autoadministración la inhibición farmacológica y transitoria del hipocampo impide la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga inducida por una dosis *priming* de la droga (Rogers & See, 2007) o por exposición al contexto previamente asociado a la droga (Fuchs et al., 2005).

La investigación sobre la participación del hipocampo en el procesamiento de asociaciones cocaína-contexto ha revelado también que los fenómenos de plasticidad que ocurren en esta estructura cerebral pueden desempeñar un papel relevante. Gran parte de la literatura a este respecto se ha centrado en el rol de la potenciación a largo plazo (PLP), que implica un reforzamiento sináptico sostenido entre dos o más neuronas, provocado por una estimulación eléctrica breve y de alta frecuencia (Bliss & Collingridge, 1993). Desde su descubrimiento, la PLP se ha descrito en todos los circuitos excitatorios hipocampales, constatándose su participación crítica en, al menos, ciertos tipos de memoria dependiente de hipocampo, como por ejemplo algunas formas de memoria asociativa (Nabavi et al., 2014) y espacial (Morris et al., 1986). Precisamente, la administración de cocaína modula la PLP hipocampal, de forma que dosis bajas de la droga facilitan este proceso, mientras que dosis más altas (o repetidas) lo inhiben (Keralapurath et al., 2017; Thompson et al., 2004). Se ha propuesto que los efectos mixtos de la cocaína sobre la PLP podrían facilitar en un principio la consolidación de las asociaciones cocaína-contexto, favoreciendo la persistencia de estos recuerdos asociativos al impedir no solo su modulación sino también la adquisición de nuevas asociaciones tras un consumo crónico (Kutlu & Gould, 2016). Con respecto a otros mecanismos de plasticidad hipocampal potencialmente implicados en el procesamiento de asociaciones droga-contexto, la neurogénesis hipocampal adulta (NHA; i. e., la generación de nuevas células en el hipocampo adulto) ha recibido cada vez más interés en la investigación sobre drogas de abuso debido a su importante contribución a las funciones dependientes de hipocampo, especialmente aquellas relacionadas con el aprendizaje y la memoria de naturaleza espacial y contextual. Por ello, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral será, precisamente, profundizar en el rol de este fenómeno de plasticidad

neural como soporte del mantenimiento a largo plazo y la modulación de asociaciones cocaína-contexto en modelos animales.

### 3.4 Neurogénesis hipocampal adulta

Durante décadas, en el campo de la neurociencia se asumió el supuesto de que la neurogénesis era un proceso ligado exclusivamente al desarrollo embrionario. Sin embargo, los estudios de Altman (1965), Kaplan (1977) y Bayer (1983) entre otros, supusieron una primera evidencia de que la generación de nuevas neuronas podía ocurrir también en el cerebro adulto. La superación de las limitaciones metodológicas de los primeros estudios, junto con el descubrimiento y desarrollo de marcadores neurales específicos que permiten estudiar el origen/nacimiento de las nuevas células así como su maduración, diferenciación e integración, confirmaron poco después la existencia de la neurogénesis adulta (Cameron et al., 1993). Desde entonces, se ha observado un auge experimental en este campo de estudio, encontrándose evidencia de este fenómeno en multitud de especies animales, incluyendo después de cierta discusión científica al ser humano (Lindsey & Tropepe, 2006; Moreno-Jiménez et al., 2019; Terreros-Roncal et al., 2021).

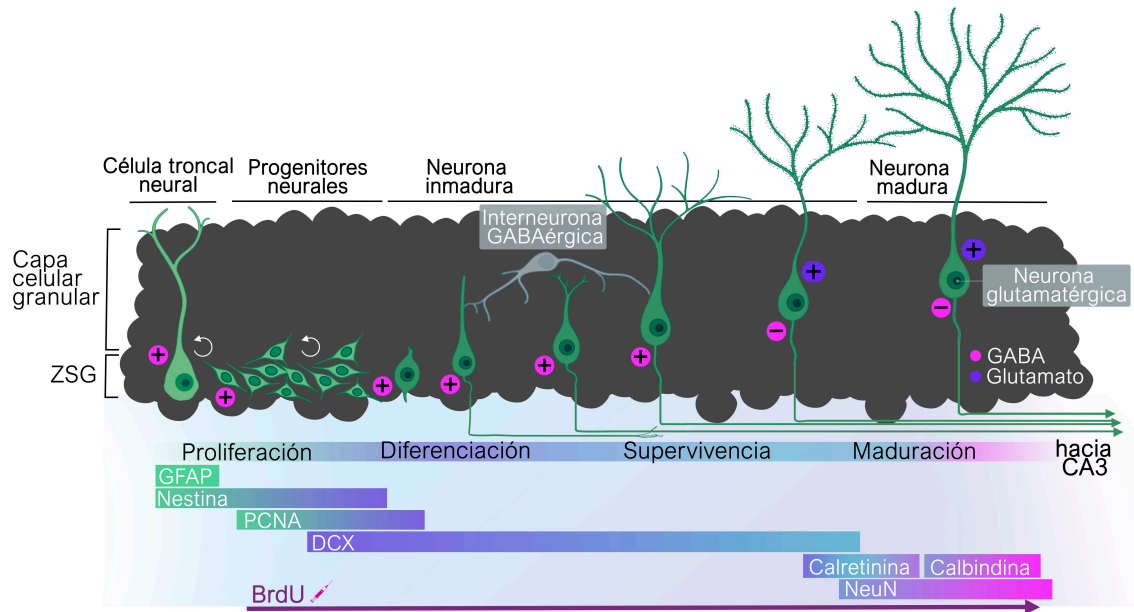
El desarrollo de las técnicas para detectar cohortes de células en división supuso un avance fundamental en el estudio cuantitativo de la neurogénesis adulta. Los primeros estudios en roedores empleaban la autorradiografía para detectar la incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ -timidina) en el ADN nuclear de las células en proceso de división (Altman & Das, 1965). Más adelante, se desarrolló el marcaje con un análogo sintético de la timidina, la bromodesoxiuridina (BrdU), que constituye actualmente una de las técnicas más usadas para estudiar la neurogénesis adulta. La BrdU es un marcador celular de la síntesis de ADN que se introduce en las células precursoras en división y permanece en la progenie celular, pudiendo ser detectada posteriormente mediante inmunohistoquímica (Kuhn et al., 2016; Taupin, 2007). Para permitir una mejor discriminación de la edad y fenotipo de las nuevas células, además de los marcadores sintéticos exógenos, como los análogos de la timidina (BrdU, clorodesoxiuridina -CldU-, yododesoxiuridina -IdU-) se comenzaron a utilizar marcadores endógenos de neurogénesis, en muchas ocasiones en combinación con marcadores exógenos. Estos marcadores endógenos consisten principalmente en proteínas cuya expresión temporal permite identificar diferentes estadios o fases del desarrollo y maduración celular. Entre ellos se encuentran aquellos que permiten la identificación de células troncales o progenitoras en cualquier fase (p. ej., Nestina, proteína ácida fibrilar glial -GFAP-, Sox2) o en una fase específica del ciclo celular (p. ej., Ki67; antígeno nuclear de células en proliferación -PCNA-, histona H<sup>3</sup> fosforilada), marcadores neuronales (p. ej., NeuN) que permiten discernir las células de fenotipo neuronal de otros tipos celulares como las células gliales, así como marcadores expresados por neuronas post-mitóticas en estadios inmaduros (p. ej., PSA-NCAM, DCX, calretinina) o en los que las neuronas ya están desarrolladas e integradas en la red neuronal (calbindina, proteína nuclear específica neuronal -NeuN NeuN-; Balthazart & Ball, 2014; Duan et al., 2008). Por último, en años recientes se han desarrollado metodologías basadas en la inyección intracerebral de vectores retrovirales para marcar células progenitoras en división (p. ej., ver Van Praag et al., 2002) así como en el uso de animales transgénicos en los que un reportador fluorescente, controlado por promotores específicos (p. ej., Nestina, GFAP, Sox2, doblecortina -DCX-), se incorpora a nuevas células en estadios concretos de desarrollo (Semerci & Maletic-Savatic, 2016). La combinación de estos modelos con el uso de análogos de la timidina ha permitido el seguimiento específico de las nuevas neuronas a lo largo de su ciclo de desarrollo, facilitando tanto su caracterización como el estudio de su funcionalidad,

especialmente en roedores de donde se deriva la mayor parte del conocimiento actual sobre la NHA (p. ej., ver Akers et al., 2014; Tronel et al., 2010).

El trabajo seminal de Eriksson, Gage y colaboradores (1998) mostró por primera vez la ocurrencia de NHA en humanos. Estos autores estudiaron el tejido postmortem de pacientes previamente tratados con BrdU y observaron, varios meses después, la presencia de células que expresaban este y otros marcadores neurogénicos (BrdU, NeuN, calbindina). Las conclusiones de este estudio fueron respaldadas más adelante por Spalding et al. (2013) empleando un enfoque innovador para la cuantificación celular. El método se fundamentó en la medición del aumento transitorio en la disponibilidad atmosférica del isótopo radioactivo carbono-14 derivado de la realización de ensayos nucleares, así como en la incorporación de este isótopo por las células hipocámpales en división. Utilizando esta tecnología y modelos matemáticos sofisticados, corroboraron la existencia de neuronas con un historial de división en el hipocampo humano adulto. A pesar de esta evidencia y aunque hoy día la presencia de neurogénesis adulta en distintas especies de mamíferos es ampliamente aceptada, la existencia de este fenómeno en humanos es aún motivo de debate científico. En este sentido, estudios recientes cuestionan la presencia de este fenómeno en humanos adultos (Franjic et al., 2022; Sorrells et al., 2018), mientras que otros han observado una producción de neuronas a lo largo de todo el ciclo vital de un individuo (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019; Wang et al., 2022, entre otros). La dificultad que conlleva la recolección de muestras de tejido en humanos, su correcta manipulación para asegurar la detección de los marcadores proteicos, así como la imposibilidad de aplicar ciertas metodologías por motivos técnicos y éticos (p. ej., uso de análogos de la timidina o vectores retrovirales) ha limitado la descripción detallada de la neurogénesis adulta en humanos (Knoth et al., 2010). En cualquier caso, no existen indicios claros para descartar que las neuronas generadas durante la adultez contribuyan de algún modo a la plasticidad neural y la cognición en humanos (Kempermann et al., 2018). La optimización de la metodología más ampliamente empleada (i. e., fijación del tejido, demora postmortem) y el perfeccionamiento en la aplicación de metodologías alternativas no-invasivas (i. e., tomografía por emisión de positrones, espectroscopía de resonancia magnética funcional) ayudarán a evaluar la existencia y caracterización de las nuevas neuronas en el hipocampo humano adulto (Terrerros-Roncal et al., 2023).

En roedores, la neurogénesis adulta se produce principalmente en dos regiones cerebrales. La zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG). En estas zonas existen células con capacidad mitótica para generar nuevas neuronas: las células troncales neurales (CTN), células con morfología astrocitaria e indiferenciadas con capacidad de proliferación, autorrenovación, y diferenciación en diferentes linajes neuronales y gliales. Las CTN a su vez generan un segundo tipo de células, las células progenitoras neurales (CPN) que mantienen la capacidad proliferativa pero presentan una capacidad de autorrenovación más limitada (Kempermann et al., 2004; Merkle & Alvarez-Buylla, 2006). En la ZSV las CPN migran al bulbo olfatorio antes de diferenciarse en diferentes tipos de neuronas del sistema olfativo (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). En el otro nicho principal de neurogénesis adulta, localizado en la ZSG del GD del hipocampo, las CTN dan lugar a neuronas granulares de fenotipo glutamatérgico que pueden integrarse en la capa granular (CCG; Zhao et al., 2008). Asimismo, existen otras zonas con posible capacidad neurogénica en la adultez, tales como el hipotálamo, el tronco del encéfalo o la neocorteza de roedores y otros mamíferos, aunque la existencia de la neurogénesis en estas regiones aún es objeto de cierta controversia (Kempermann et al., 2018). El proceso de la NHA comienza con la proliferación de CPN a partir de CTN situadas en la ZSG del hipocampo, que

difieren en su potencial proliferativo y su creciente diferenciación neuronal (Kempermann et al., 2004). La mayor parte de la progenie de CPN se diferencia en neuronas granulares, mientras que una pequeña población desarrolla un fenotipo glial (Cameron et al., 1993). Las nuevas células granulares se sitúan preferentemente en el interior o la parte central de la CCG, mientras que las células generadas en fases embrionarias y postnatales del desarrollo se localizan en la parte externa de la CCG (Mathews et al., 2010). Tras proliferar, las nuevas CGD experimentan un proceso de maduración morfológica y fisiológica que es similar al de las generadas durante el desarrollo embrionario y postnatal (Cameron et al., 1993; Espósito et al., 2005; **Figura 7**).



**Figura 7. Representación del proceso madurativo de las nuevas células del giro dentado adulto.** Las nuevas neuronas del giro dentado (GD) se desarrollan a partir de dos poblaciones de células primitivas, las células troncales neurales de división lenta y las células progenitoras neurales de división más rápida. Durante las siguientes semanas las células se diferencian en neuronas y desarrollan lentamente ramificaciones dendríticas y proyecciones axonales. Entre 1 y 3 semanas de edad, las nuevas neuronas comienzan a recibir *inputs* excitatorios de interneuronas gabaérgicas y de los axones glutamatérgicos procedentes de la vía perforante, y para las 4-8 semanas de edad su fisiología y anatomía comienza a asemejarse a las de las neuronas completamente maduras. El proceso madurativo de las nuevas neuronas puede ser monitorizado mediante el empleo de técnicas específicas como la administración de bromodeoxiuridina (BrdU), o mediante el estudio de proteínas específicas expresadas en distintas etapas del proceso madurativo. De esta forma, proteínas como la proteína de migración neuronal doble-cortina (DCX) son expresadas en neuronas inmaduras, mientras que proteínas como la calbindina son expresadas en neuronas maduras. Los símbolos + y - representan activación o inhibición neuronal respectivamente. Abreviaturas: CA3, *Cornu Ammonis* 3; GABA, ácido gamma-aminobutírico; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; NeuN, proteína nuclear específica neuronal; PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación; ZSG, zona subgranular.

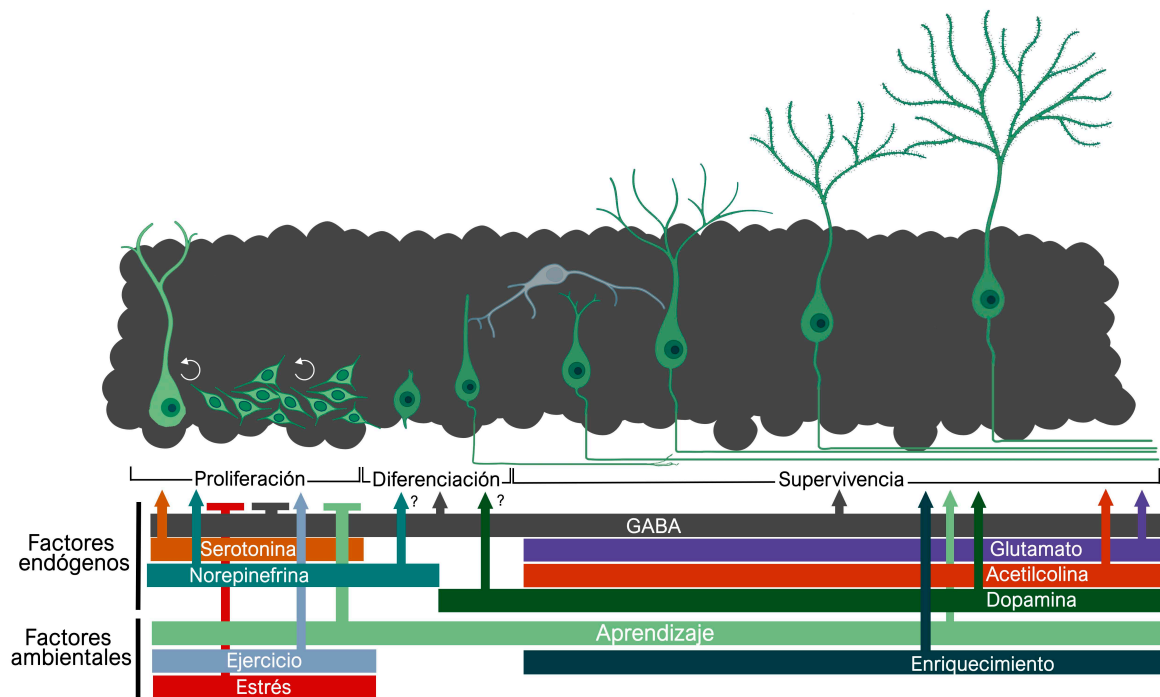
Durante el primer estadio madurativo, las células generadas en el GD adulto comienzan su diferenciación y migran una corta distancia hasta establecerse en la capa interna de la CCG, donde desarrollan pequeñas prolongaciones que, no obstante, carecen aún de conexiones sinápticas. Sin embargo, a nivel electrofisiológico muestran susceptibilidad a la actividad de la red hipocámpal local, siendo destacable su respuesta genuinamente excitatoria ante el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en estas fases iniciales. Aproximadamente a los 12-14 días de edad, las células inmaduras presentan las primeras dendritas dirigidas hacia la capa molecular y empiezan a proyectar axones hacia CA3 a

través del hilus. En este estadio comienzan a recibir *inputs* sinápticos GABAérgicos procedentes principalmente de interneuronas localizadas en el GD (Aimone et al., 2014; Deng et al., 2010; Denoth-Lippuner & Jessberger, 2021). Curiosamente, la activación de las neuronas en respuesta al *input* GABAérgico resulta necesaria para su correcto desarrollo y posterior integración sináptica en la red hipocampal local (Ge et al., 2005; Jagasia et al., 2009). Más adelante, las neuronas reciben *inputs* glutamatérgicos inicialmente procedentes del propio GD y, en fases posteriores, de neuronas de proyección. Alrededor de la tercera semana de edad, las nuevas células pasan a responder inhibitoriamente ante el GABA, presentan un fenotipo glutamatérgico y mantienen conexiones aferentes y eferentes con la red neuronal local. En este punto, las nuevas células presentan espinas dendríticas y conexiones sinápticas con las fibras procedentes de la vía perforante (Deng et al., 2010; Denoth-Lippuner & Jessberger, 2021; Ge et al., 2005, 2007; Gonçalves, Schafer, et al., 2016). A las 4-5 semanas de edad, la morfología general de las nuevas células alcanza su pico madurativo (Espósito et al., 2005; Gonçalves, Bloyd, et al., 2016) aunque siguen experimentando cambios en la morfología dendrítica fina (Zhao et al., 2008). De la misma forma, continúan mostrando características electrofisiológicas diferenciales con respecto a las neuronas granulares generadas durante el neurodesarrollo, incluyendo una mayor excitabilidad y plasticidad sináptica (Ge et al., 2007). Aproximadamente a las 8 semanas de edad, las nuevas células se consideran maduras a nivel morfológico y fisiológico, presentan características prácticamente indistinguibles de las de las células maduras preexistentes en el GD y se encuentran integradas funcionalmente en la red hipocampal (Ge et al., 2007; Laplagne et al., 2006; Zhao et al., 2008). No obstante, se ha descrito que las nuevas células del hipocampo adulto, incluso después de alcanzar la madurez, presentan una capacidad plástica incrementada en respuesta a la experiencia, una característica que las distinguiría de las células preexistentes del GD (Lemaire et al., 2012).

Cabe destacar que gran parte de las CGD generadas *de novo* en la etapa adulta son eliminadas a través de procesos naturales de muerte programada, generalmente apoptóticos (Dayer et al., 2003; Sun et al., 2004). En este sentido, se han descrito dos periodos críticos de muerte celular que corresponden a una fase temprana que sucede durante los primeros 1-5 días tras el nacimiento de las células y a una fase posterior, dependiente de la actividad de la red neuronal, que se prolonga aproximadamente 12-18 días desde el nacimiento de la célula (Denoth-Lippuner & Jessberger, 2021; Olpe & Jessberger, 2023; Pilz et al., 2018; Tashiro et al., 2006). La causa subyacente a la primera ola de muerte celular es desconocida, aunque se cree que podría estar relacionada con alteraciones genéticas hereditarias a nivel celular (Pilz et al., 2018). Por otro lado, la segunda ola de muerte celular coincide con el comienzo del proceso de integración sináptica de las nuevas células, habiéndose observado una menor probabilidad de supervivencia en aquellas células que establecen pocos *inputs* sinápticos dentro de la red neuronal hipocampal (Tashiro et al., 2006). De hecho, se cree que las nuevas neuronas podrían competir con las neuronas maduras del GD para establecer conexiones con las proyecciones glutamatérgicas procedentes de la corteza entorrinal, un proceso que favorecería su supervivencia y posterior integración funcional (Bergami et al., 2015; Piatti et al., 2011; Toni et al., 2007). En este sentido, la supervivencia y conectividad de las nuevas células parece ser dependiente de la concurrencia de ciertos eventos y experiencias individuales durante esta ventana temporal. Estos fenómenos pueden ser de naturaleza extrínseca e intrínseca y afectan a las diferentes etapas del desarrollo de las nuevas células, incluyendo las fases proliferativas, de diferenciación, maduración y supervivencia celular (Kempermann et al., 2004).

### 3.4.1. Factores reguladores de la neurogénesis hipocampal adulta

Hasta el momento, se han descrito numerosos factores capaces de regular positiva o negativamente la NHA, e incluso se han desarrollado estrategias para manipular de forma artificial este fenómeno. En la mayoría de los casos, estas técnicas se han enfocado en la supresión o la inhibición de este fenómeno, bien de forma inespecífica a través de métodos como la irradiación intracraneal o el uso de fármacos antimitóticos (p. ej., temozolomida) o, más recientemente, mediante el uso de líneas animales transgénicas que permiten una ablación selectiva de la NHA (Deng et al., 2010). Aunque menos comunes, se han desarrollado también métodos artificiales para incrementar la NHA a niveles suprafisiológicos, desde los más inespecíficos como el uso de fármacos (p. ej., antidepresivos) o de ciertas sustancias (p. ej., ácido lisofosfatídico), hasta las más recientes estrategias de modulación genética (Berdugo-Vega et al., 2020; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Malberg et al., 2000). No obstante, los procesos de la NHA son también sensibles a factores endógenos y ambientales, no invasivos, que pueden tener un papel modulador (positivo o negativo) sobre las diferentes etapas del proceso de desarrollo neurogénico, ya sea en el estadio proliferativo, de diferenciación neuronal o de supervivencia e integración de las nuevas células en la circuitería del GD (**Figura 8**).



**Figura 8. Factores reguladores de la neurogénesis hipocámpica adulta.** La figura representa los distintos factores endógenos y ambientales que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas generadas en la adultez. Entre los factores endógenos, el GABA parece suprimir la proliferación, al tiempo que favorece la diferenciación y supervivencia de las nuevas neuronas. El glutamato, principal neurotransmisor excitador, también promueve la supervivencia celular. Otros neurotransmisores moduladores como la serotonina, la norepinefrina y la acetilcolina también ejercen una influencia positiva sobre diferentes estadios del proceso madurativo de las nuevas células. Además, la neurogénesis adulta también puede verse regulada por factores comportamentales. Por ejemplo, el ejercicio fomenta la proliferación de las células progenitoras neurales mientras que condiciones como el enriquecimiento ambiental tienen un efecto complementario, principalmente relacionado con la supervivencia de las nuevas neuronas. Por otro lado, factores como el estrés tienen un efecto nocivo suprimiendo la proliferación celular. Los efectos del aprendizaje son más complejos, ya que parece promover la supervivencia de las neuronas más maduras y al mismo tiempo suprime la proliferación de nuevas células.

Entre los factores endógenos que regulan la NHA, destacan aquellos relacionados con la propia actividad de la red hipocampal, ya sea a nivel local, por acción de interneuronas GABAérgicas, o bien por efecto de la invasión glutamatérgica procedente de otras zonas cerebrales. En este sentido, la actividad de los *inputs* GABAérgicos afecta negativamente a la proliferación de nuevas neuronas, interfiriendo con la división de las CTNs (Aimone et al., 2014), si bien al mismo tiempo facilita la diferenciación, maduración dendrítica e integración sináptica de nuevas neuronas en etapas más avanzadas del desarrollo celular (Ge et al., 2005; Pallotto & Deprez, 2014). Asimismo, la estimulación glutamatérgica de neuronas inmaduras del hipocampo adulto, mediada por la activación de receptores NMDA, ha demostrado favorecer su supervivencia, especialmente cuando ocurre durante el período crítico madurativo (Tashiro et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que las nuevas neuronas compiten con las neuronas maduras existentes por entradas sinápticas glutamatérgicas que fomentan su integración en el circuito hipocampal, dado que tienden a establecer contactos sinápticos ya ocupados por neuronas preexistentes en el sistema (Toda & Gage, 2018; Toni et al., 2007). Además, se ha demostrado que otros neurotransmisores regulan también la NHA, siendo el más estudiado la serotonina, cuyo aumento se relaciona de forma directa con la proliferación de nuevas neuronas del GD (Malberg et al., 2000). Asimismo, la noradrenalina, dopamina y acetilcolina parecen tener también un efecto pro-neurogénico en diversos estadios del desarrollo de las nuevas células hipocampales (Aimone et al., 2014). Por último, se conoce que ciertos factores neurotróficos (p. ej., BDNF, VEGF, IGF-I, IGF-II) actúan como promotores de la proliferación celular (Jin et al., 2002), la diferenciación y el desarrollo morfológico de las nuevas CGD (Chan et al., 2008; Wang et al., 2015) mientras que los factores neuroinflamatorios como algunas citoquinas (p. ej., interleuquina-6) se han visto relacionados con una inhibición de la NHA (Ekdahl et al., 2003). No obstante, cabe destacar que la relación entre estos factores endógenos y la NHA es en ocasiones compleja, ya que puede variar dependiendo de la presencia de ciertos factores ambientales o extrínsecos (Rossi et al., 2006; Yousef et al., 2015).

Con respecto a los factores ambientales que regulan la NHA, la mayoría de los estudios se han centrado en el efecto negativo que ejercen condiciones como el envejecimiento o el estrés, las cuales afectan principalmente a la proliferación de nuevas células hipocampales (Gould et al., 1997; Kuhn et al., 1996). No obstante, se han descrito otras estrategias conductuales capaces de incrementar la NHA, entre las que destaca el ejercicio físico, la realización de tareas de aprendizaje o el enriquecimiento ambiental (Gould et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Van Praag et al., 1999). En concreto, algunas de estas estrategias estimulan en mayor medida la proliferación de nuevas células (p. ej., ejercicio físico) y no necesariamente favorecen los procesos de supervivencia e integración celular (Van Der Borght et al., 2009), los cuales parecen ser más dependientes de una alta demanda de procesamiento hipocampal (Abrous & Wojtowicz, 2015). En este sentido, el enriquecimiento ambiental, que implica una mejora de la estimulación ambiental, tanto física, como social, no solo favorece la proliferación de células precursoras (Kronenberg et al., 2003) sino también y en mayor medida su supervivencia (Kempermann, 2019; Kempermann et al., 1997). La estimulación externa más específica, centrada en el aprendizaje, mediante tareas de aprendizaje asociativo como el condicionamiento palpebral de huella o espaciales como el MWM, que dependen de la integridad hipocampal, también parece tener efectos positivos sobre la supervivencia de nuevas células hipocampales que se encuentran en un período crítico madurativo (i. e., 1-2 semanas de edad; Gould et al., 1999; Leuner et al., 2004; Trouche et al., 2009). En respuesta al aprendizaje, estas células pueden ser integradas funcionalmente en los circuitos hipocampales y reclutadas para el procesamiento de información de naturaleza similar una vez alcanzan la maduración (Trouche et al., 2009). Durante este período

crítico, las nuevas células presentan propiedades plásticas incrementadas que incluyen un umbral de activación menor y un incremento en la PLP (Ge et al., 2007). Además, son más sensibles a la estimulación externa y su supervivencia puede regularse por la actividad de la red neuronal local (Bergami et al., 2015). En contraposición, las células generadas antes o después de esta ventana temporal de maduración no muestran esa predisposición a la supervivencia (Anderson et al., 2011) o incluso pueden ser proclives a ser eliminadas (Döbrössy et al., 2003) en respuesta al aprendizaje de tareas dependientes de hipocampo.

#### 3.4.2. *Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en el aprendizaje y la memoria dependiente de hipocampo*

Uno de los interrogantes centrales en el estudio de la neurogénesis adulta tiene que ver con su relevancia fisiológica, puesto que la cantidad de células generadas *de novo* en la etapa postnatal es relativamente pequeña (Aimone et al., 2014; Ge et al., 2007). En este sentido, existe cada vez más evidencia que sugiere que la NHA constituye un fenómeno neurobiológico relevante a nivel conductual y parece desempeñar múltiples funciones que dependen de la edad del animal y del número de neuronas recién nacidas (Abrous & Wojtowicz, 2015). En general, la literatura indica que la NHA es un sustrato neurobiológico relevante en diversas formas de aprendizaje que implican componentes de memoria espacial y/o asociativa complejas (Abrous & Wojtowicz, 2015; Deng et al., 2010) o para el uso flexible de la información adquirida (Dupret et al., 2008; Garthe et al., 2016) pero también tiene un papel relevante en procesos de regulación del estado de ánimo (Anacker & Hen, 2017), y recientemente se ha propuesto su implicación en la discriminación de información similar (separación de patrones; Clelland et al., 2009) y en la modificación de memorias previamente adquiridas (Ryan & Frankland, 2022).

La importancia de la NHA en el aprendizaje dependiente de hipocampo se ha determinado empleando modelos animales en los que se ha estudiado el rendimiento en determinadas tareas cognitivas bajo condiciones de supresión más o menos selectiva de este fenómeno. De esta forma, la ablación de la NHA inespecífica (p. ej., mediante fármacos antimetabólicos o irradiación intracraneal) provoca déficits en la realización de tareas que requieren de la función hipocampal como el condicionamiento palpebral de huella donde se observa una incapacidad en el aprendizaje de la tarea en aquellos animales tratados con una toxina que disminuye la proliferación de nuevas CGD (Shors et al., 2001). El uso de técnicas más selectivas (p. ej., técnicas genéticas que permiten el silenciamiento neuronal selectivo, como la optogenética, o la ablación genética de las células progenitoras en división) ha revelado efectos similares, de forma que, en tareas hipocampo-dependientes, como el condicionamiento del miedo, la inhibición selectiva de nuevas células del hipocampo adulto afecta a la adquisición y recuerdo del condicionamiento (Huckleberry et al., 2018). Muchos de estos estudios se han centrado en analizar el efecto de la reducción de la NHA sobre la ejecución del MWM como tarea paradigmática de aprendizaje dependiente de hipocampo. Sin embargo, los trabajos presentan una gran diversidad metodológica en lo relativo a los protocolos y parámetros empleados en la prueba (p. ej., distinta duración de los ensayos, señalización utilizada, tamaño de la piscina, etc.) y también en cuanto a la cohorte de nuevas células hipocampales objeto de estudio, lo cual ha dificultado la homogenización de los resultados (Garthe & Kempermann, 2013). En la versión clásica de la prueba, en la cual la localización de la plataforma se mantiene fija, los animales con una reducción neurogénica presentan dificultades para aprender la tarea (Martinez-Canabal et al., 2013; Zhang et al., 2008) así como déficits en la retención a largo plazo del aprendizaje (Jessberger et al., 2009; Snyder et al., 2005) y un uso reducido de estrategias de navegación espacial

alocéntrica (i. e., dependientes de hipocampo; Garthe et al., 2009; Zhang et al., 2008). Asimismo, la readquisición de la tarea tras trasladar la plataforma a una nueva localización, o tarea de inversión, también parece verse afectada en condiciones de supresión de la NHA (Garthe et al., 2009; Zhang et al., 2008). El aprendizaje de una nueva localización de la plataforma requiere de flexibilidad cognitiva y capacidad para discernir contextos similares, procesos que parecen verse influenciados por la NHA (Garthe & Kempermann, 2013). De hecho, algunos estudios indican que la supresión inespecífica o selectiva de la neurogénesis adulta provoca déficits en el procesamiento flexible de la información aprendida, tal y como se ha observado en tareas en las que los animales deben cambiar la respuesta previamente aprendida ante un mismo estímulo para completar la tarea correctamente (p. ej., aprender a evitar la nueva localización de un estímulo aversivo; (Burghardt et al., 2012; Swan et al., 2014). Por otro lado, la codificación distintiva de experiencias o *inputs* semejantes (i. e., separación de patrones) se ha visto ampliamente asociada con la actividad del GD (Baker et al., 2016; McHugh et al., 2007) y algunos estudios sugieren que las nuevas neuronas hipocampales favorecen la creación de representaciones discretas y, en consecuencia, el procesamiento diferencial de contextos que presentan estímulos similares y muy próximos en el espacio y/o el tiempo (Johnston et al., 2016). Esto ha sido comprobado en estudios en los que la ablación de la NHA inducida por irradiación provoca dificultades para resolver tareas espaciales como la versión del laberinto radial de emparejamiento demorado con la muestra, dónde los animales deben orientarse mediante claves espaciales externas y discriminar en qué brazo del laberinto se encontrará un reforzador (p. ej., comida). La ablación de la NHA provoca una incapacidad para discriminar los brazos del laberinto que presentan poca separación espacial, pero este deterioro no se produce cuando los lugares reforzados están más distanciados (Clelland et al., 2009). En contraposición, la mejora de la NHA por medios inespecíficos (p. ej., ejercicio) o selectivos (p. ej., líneas transgénicas) se asocia con mejor rendimiento en tareas dependientes de hipocampo, correlacionando con una mayor capacidad para distinguir entre contextos similares en paradigmas de discriminación contextual (Creer et al., 2010; Sahay et al., 2011) y también con una mayor flexibilidad cognitiva para aprender nueva información en paradigmas de inversión de la plataforma en el laberinto acuático (Berdugo-Vega et al., 2020).

Además de participar en la codificación de nueva información, las células generadas *de novo* en el hipocampo adulto podrían interferir con la recuperación de memorias consolidadas sobre experiencias previas. Por ejemplo, estudios recientes sugieren que la generación de nuevas neuronas y su desarrollo dentro de los circuitos hipocampales podría debilitar conexiones preexistentes debido a que competirían con las células maduras del GD por establecer conexiones sinápticas de entrada y salida (Akers et al., 2014; Frankland et al., 2013). Esta interferencia sináptica remodelaría la configuración de los circuitos del GD-CA3 provocando una modificación de la información mantenida en estas redes neurales (Ryan & Frankland, 2022). Por otro lado, se ha sugerido que las nuevas CGD podrían constituir una “reserva” de neuronas jóvenes y altamente plásticas, que podrían ser reclutadas por la circuitería hipocampal para favorecer la adquisición de nuevos aprendizajes, integrando contenidos novedosos en memorias contextuales previamente consolidadas, como ocurre precisamente en el caso del aprendizaje de extinción (Cleva et al., 2011). Aunque estas propuestas aun necesitan de una mayor investigación, su desarrollo podría conllevar importantes implicaciones en el tratamiento de ciertos trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo aquellos relacionados con el uso de drogas, en los cuales los mecanismos de aprendizaje asociativo droga-contexto desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de conductas desadaptativas de abuso y recaída.

### 3.4.3. *Implicación de la neurogénesis hipocampal adulta en el aprendizaje asociativo cocaína-contexto*

La mayor parte de los estudios sobre NHA y cocaína se han centrado en los efectos directos de la droga sobre la proliferación, supervivencia y maduración de nuevas CGD. Se ha observado que la administración de cocaína, tanto pasiva (p. ej., en jaula) como activa (i. e., autoadministración), tiene un efecto inhibitorio inmediato que afecta principalmente a la proliferación de nuevas neuronas hipocampales (Andersen et al., 2007; Blanco-Calvo et al., 2014; Noonan et al., 2008; Sudai et al., 2011; Yamaguchi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005) y que depende tanto del número de sesiones total como de la cantidad de cocaína suministrada (García-Fuster et al., 2010; Noonan et al., 2008; Yamaguchi et al., 2004). Otros estudios, sin embargo, indican que los procesos de diferenciación, maduración y supervivencia de las nuevas células hipocampales no se verían afectados por el efecto de la cocaína (Barr & Unterwald, 2015; Deschaux et al., 2014; Domínguez-Escribà et al., 2006; Yamaguchi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005), aunque los resultados son inconsistentes existiendo trabajos que apuntan a una disminución de la supervivencia celular, especialmente en respuesta a dosis de cocaína elevadas (Sudai et al., 2011) o cuando se trata de animales predispuestos al consumo de la droga (García-Fuster et al., 2011, 2017). En cualquier caso, el impacto directo de la cocaína sobre la NHA parece ser transitorio, produciéndose una recuperación (García-Fuster et al., 2011; Yamaguchi et al., 2005) e incluso un aumento de los niveles de proliferación de nuevas CGD tras períodos de abstinencia de entre 1-4 semanas (Noonan et al., 2008; Xie et al., 2010). Considerando que la NHA es un fenómeno dinámico y dependiente de la experiencia, resulta interesante determinar la manera en qué se ve afectado por la cocaína en condiciones de realización de ciertas tareas comportamentales. A este respecto, la administración de cocaína en el paradigma de PLC no parece afectar a los niveles de proliferación celular hipocampal, al contrario de lo que ocurre tras la administración de la droga en jaula (Barr & Unterwald, 2015; Mustroph et al., 2011). Sin embargo, algunos estudios sí han encontrado resultados significativos en relación con el efecto de la droga sobre aquellas nuevas CGD que se encuentran en la ventana temporal crítica de plasticidad aumentada. En este sentido, el entrenamiento en el modelo de PLC inducido por cocaína parece favorecer la maduración de estas células (Castilla-Ortega et al., 2016) y, posiblemente, su integración funcional en los circuitos hipocampales, puesto que se ha observado que se activan cuando los animales son expuestos de nuevo al contexto previamente asociado con la droga (Barr & Unterwald, 2015). Curiosamente, estos hallazgos son similares a los observados en tareas dependientes de hipocampo, ya mencionadas anteriormente, como las basadas en aprendizaje espacial (p. ej., MWM; Kee et al., 2007; Tronel, Charrier, et al., 2015; Trouche et al., 2009) o asociativo (p. ej., miedo condicionado contextual; Stone et al., 2011).

Los cambios observados en la regulación neurogénica en modelos de conducta relacionada con drogas sugieren que la NHA podría ser un mecanismo involucrado en el procesamiento de asociaciones droga-contexto. Aunque existe poca literatura al respecto, algunos estudios se han centrado en evaluar esta hipótesis, principalmente analizando el efecto de la modulación de este fenómeno sobre la conducta en los paradigmas de PLC y autoadministración. En este sentido, la inhibición de la NHA mediante irradiación intracraneal (Brown et al., 2010) o fármacos antimetabólicos (Castilla-Ortega et al., 2016) no parece afectar a la adquisición de asociaciones cocaína-contexto en el modelo de PLC, pero sí favorece la retención de las mismas a largo plazo, además de dificultar el aprendizaje de extinción y favorecer posteriormente la reinstauración de la

preferencia condicionada (Castilla-Ortega et al., 2016). En línea con estos resultados, la supresión (tanto inespecífica como selectiva) de la NHA promueve la conducta de autoadministración de cocaína y potencia la búsqueda de la droga elicitada por la presencia de claves estimulares asociadas (Deroche-Gamonet et al., 2019; Noonan et al., 2010). Por el contrario, cuando se implementan estrategias de aumento neurogénico (p. ej., ejercicio o enriquecimiento ambiental) antes de administrar la droga a los animales, estos se muestran más sensibles a los efectos de la cocaína y presentan mayor tendencia a la adquisición de una PLC (Smith et al., 2009) así como más resistencia a la extinción de la preferencia condicionada (Mustroph et al., 2011), si bien otros estudios sugieren que el aumento neurogénico no afectaría a la adquisición de la PLC (Galaj et al., 2017; Lespine & Tirelli, 2019) o incluso podría dificultar el establecimiento de asociaciones droga-contexto (Freese et al., 2018). Desde un punto de vista metodológico, la relación temporal entre la NHA y el entrenamiento en tareas de PLC o autoadministración parece ser crítico para entender los efectos de la modulación de este fenómeno sobre la persistencia de las asociaciones droga-contexto. En este sentido, cuando la inhibición de la proliferación de nuevas células hipocampales se produce después de la adquisición de la conducta de autoadministración, los animales muestran una mayor resistencia a la extinción de la misma y al mismo tiempo presentan mayor tendencia a la reinstauración inducida por *priming*, estrés o reexposición al contexto (Deschaux et al., 2014; Noonan et al., 2010). En contraposición, si se introduce una estrategia de aumento neurogénico, bien ambiental o farmacológica, tras el establecimiento de las asociaciones cocaína-contexto en el modelo del PLC, se observa una reducción en la retención a largo plazo de la preferencia condicionada, además de una facilitación del aprendizaje de extinción y una menor tendencia a la reinstauración de la conducta de PLC (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Mustroph et al., 2011; Solinas et al., 2008). El papel de la mejora de la NHA en estos beneficios conductuales es por el momento incierto, puesto que las estrategias de incremento neurogénico empleadas hasta el momento han sido inespecíficas y, por tanto, presentan otros efectos estructurales y funcionales que podrían mediar los cambios observados en la conducta de búsqueda de droga (Mustroph et al., 2016). No obstante, algunos estudios sugieren una implicación directa del aumento de nuevas CGD en la reducción de la persistencia de las asociaciones cocaína-contexto (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019), poniendo de manifiesto el potencial de este tipo de estrategias para debilitar el mantenimiento de conductas desadaptativas relacionadas con drogas.





# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





La recaída continúa siendo uno de los principales desafíos terapéuticos en el abordaje de los problemas relacionados con el consumo de cocaína. En muchos casos, estas recaídas son provocadas por la exposición a claves contextuales asociadas con los efectos gratificantes de la droga, las cuales son muy persistentes en el tiempo. Por el momento, las intervenciones centradas en promover la extinción de estas asociaciones cocaína-contexto han resultado poco exitosas y la búsqueda de alternativas sigue siendo un objetivo relevante. En este sentido, las estrategias conductuales basadas en estimulación física o cognitiva han demostrado potencial para reducir el deseo por consumir y también los síntomas cognitivos y emocionales que incrementan la vulnerabilidad a la recaída. No obstante, la utilidad real de estas intervenciones es incierta y el conocimiento de los procesos neurobiológicos implicados requiere de una mayor investigación. En este sentido, ambas estrategias se han asociado consistentemente con la mejora de la función hipocampal y, en particular, con la generación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto a través de procesos celulares distintos y probablemente complementarios. Sin embargo, se desconoce en qué medida esta mejora neurogénica representa un mecanismo explicativo del potencial del ejercicio y de la estimulación cognitiva para favorecer la abstinencia y reducir el riesgo de recaída en el consumo de cocaína. Precisamente, el hipocampo y la NHA han adquirido cada vez más relevancia como elementos relacionados con el circuito cerebral de la adicción, destacando su papel fundamental en la adquisición, mantenimiento, extinción y reinstauración de asociaciones cocaína-contexto en modelos animales. Por medio del uso de estrategias de inhibición o estimulación de la NHA, diversos estudios sugieren que las nuevas neuronas del GD adulto podrían tener un papel relevante sobre el control de numerosas conductas desadaptativas relacionadas con drogas. Sin embargo, por el momento carecemos de evidencia suficiente acerca de la implicación funcional de estas nuevas células en la modulación de las asociaciones desadaptativas cocaína-contexto.

Con base en el marco teórico disponible, esta Tesis Doctoral se fundamenta en la siguiente hipótesis general:

## **HIPÓTESIS**

La estimulación sinérgica de los procesos de proliferación, supervivencia, diferenciación/maduración e integración funcional de nuevas CGD, inducida por la combinación de ejercicio aeróbico y entrenamiento en una tarea de memoria espacial, favorecerá la extinción de una preferencia de lugar condicionada (PLC) inducida por cocaína, y reducirá su reinstauración en respuesta a una dosis *priming* de la droga.

Para comprobar esta hipótesis, la presente Tesis Doctoral se ha articulado en dos bloques experimentales que recogen estudios desarrollados en modelos murinos. El primer bloque se centra en la validación de un protocolo conductual que combina ejercicio aeróbico programado y una tarea de entrenamiento espacial dependiente de hipocampo, con el objetivo de favorecer de manera sinérgica la proliferación, supervivencia y diferenciación/maduración de un subconjunto de CGD. Por su parte, el segundo bloque experimental, aborda el efecto de esta estrategia combinada para reducir la retención, extinción y/o reinstauración de asociaciones cocaína-contexto en el modelo de PLC, incidiendo en el papel funcional de las nuevas CGD como potencial mecanismo explicativo.

A continuación, se presentan los objetivos específicos de cada uno de los dos bloques experimentales:

## **OBJETIVOS**

### **Primer bloque experimental**

1. Determinar si un protocolo de ejercicio programado breve incrementa la proliferación y/o la supervivencia de nuevas células en el GD del hipocampo adulto.
2. Determinar si la combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento espacial dependiente de hipocampo incrementa sinérgicamente la proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal/maduración de nuevas células en el GD del hipocampo adulto.

### **Segundo bloque experimental**

3. Evaluar si la combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento espacial dependiente de hipocampo favorece la extinción y/o reduce la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto en el paradigma de PLC.
4. Determinar si los efectos de la combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento espacial sobre la extinción y/o reinstauración de una PLC inducida por cocaína están mediados por la estimulación de la neurogénesis en el GD del hipocampo adulto.







# PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL

## **La combinación secuencial de ejercicio en cinta y entrenamiento cognitivo incrementan sinérgicamente la neurogénesis hipocampal adulta en ratón**

Ávila-Gámiz F, Pérez-Cano AM, Pérez-Berlanga JM, Mullor-Vigo RM, Zambrana-Infantes EN, Santín LJ, Ladrón de Guevara-Miranda D. (2023). Sequential treadmill exercise and cognitive training synergistically increase adult hippocampal neurogenesis in mice. *Physiology & Behavior*, 266:114184. doi: 10.1016/j.physbeh.2023.114184.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los factores que han demostrado un efecto modulador positivo sobre la NHA abarcan desde técnicas invasivas como el uso de fármacos (i. e., fluoxetina, Malberg et al., 2000) o determinadas sustancias (i. e., ácido lisofosfatídico, Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019) hasta estrategias ambientales como el ejercicio físico (Henriette Van Praag et al., 1999) y el entrenamiento en determinadas tareas de aprendizaje (Gould et al., 1999). El empleo de estas últimas aproximaciones en el tratamiento de ciertos trastornos resulta especialmente relevante dado que suponen alternativas de carácter no invasivo y fácil accesibilidad, siendo más viable su traslado y aplicación al contexto clínico. En este sentido, la participación en actividades de naturaleza física y cognitiva ha mostrado beneficios sobre la estructura y la función cerebral, lo cual puede tener posibles aplicaciones terapéuticas (Gubert & Hannan, 2021; Keshavan et al., 2014). Estudios preclínicos desarrollados en roedores indican que, en comparación con animales mantenidos en condiciones sedentarias, aquellos que son sometidos a protocolos de ejercicio físico presentan un mejor rendimiento en tareas de aprendizaje espacial (Henriette Van Praag et al., 2005) o de memoria de trabajo (Langdon & Corbett, 2012). Por otro lado, se ha descrito que los roedores entrenados en determinadas tareas cognitivas (p. ej., entrenamiento de inversión en el MWM o entrenamiento en tareas de control cognitivo) obtienen mejores resultados que los animales controles en subsiguientes tareas de aprendizaje similar (Alcalá et al., 2020) y/o en tareas de aprendizaje distintas a aquellas en las que han sido originalmente entrenados (Chung et al., 2021). En línea con estos resultados, las investigaciones en humanos han mostrado que la práctica de ejercicio aeróbico se asocia con un incremento en el rendimiento cognitivo del individuo, principalmente a través de una mejora en la capacidad de memoria y la función ejecutiva (Hoffmann et al., 2021). Asimismo, las condiciones de entrenamiento que requieren del uso de habilidades cognitivas también se han visto relacionadas con mejoras selectivas en la cognición humana, observadas especialmente en aquellos dominios cognitivos previamente entrenados (Bonnechère et al., 2021). Sobre la base de estos hallazgos, un número creciente de estudios indica que la combinación del entrenamiento físico y cognitivo puede producir resultados superiores en comparación con la aplicación de cualquiera de estos tratamientos por separado. Este enfoque multimodal resulta prometedor en la mejora del deterioro cognitivo, la rehabilitación del daño cerebral o el tratamiento de trastornos neurológicos, tanto en población humana (Dhir et al., 2021; Karssemeijer et al., 2017; Lauenroth et al., 2016) como en modelos animales (Farokhi-Sisakht et al., 2019; G. F. Hamilton et al., 2014; Kapgal et al., 2016) lo cual subraya el potencial clínico de esta aproximación multimodal.

A nivel neural, se sabe que tanto la estimulación física como cognitiva promueven fenómenos neuroplásticos que podrían, al menos en parte, explicar sus efectos positivos sobre el cerebro y la cognición (Hötting & Röder, 2013; Takeuchi et al., 2010). Precisamente, una de las estructuras más sensibles al efecto de este tipo de condiciones ambientales es el hipocampo (Bråthen et al., 2022; Erickson et al., 2011), el cual, como se ha fundamentado previamente, desempeña un papel clave como sustrato neurobiológico del aprendizaje y la memoria (Moser & Moser, 1998). La experiencia y la interacción con el entorno modifican estructural y funcionalmente el hipocampo a través de diversas adaptaciones entre las que se incluyen cambios consistentes en la regulación de la NHA (Gonçalves, Schafer, et al., 2016). En este sentido, existe abundante evidencia que sugiere que el ejercicio aeróbico regula al alza la NHA, principalmente promoviendo la generación de nuevas células precursoras en el GD (Kronenberg et al., 2006; Henriette Van Praag et al., 1999), lo cual a su vez podría contribuir a mejorar la capacidad del

aprendizaje y la memoria (Clark et al., 2008; Codd et al., 2020; Creer et al., 2010; Li et al., 2013). Por otro lado, las condiciones estimulares consideradas demandantes de actividad hipocampal, como el enriquecimiento ambiental o la participación en ciertas tareas de aprendizaje y memoria que dependen de esta región temporal (p. ej., entrenamiento en MWM), incrementan la NHA favoreciendo principalmente la supervivencia de las células generadas *de novo* en el GD adulto (Gould et al., 1999; Kempermann et al., 1997). Considerando las distintas vías por las que se puede obtener un incremento de la NHA (i. e., aumento de proliferación, diferenciación o supervivencia) se ha propuesto que la combinación secuencial de ejercicio físico y entrenamiento cognitivo dependiente de hipocampo podrían actuar de manera sinérgica para promover su estimulación (Curlik & Shors, 2013; Fabel et al., 2009). En este sentido, dado que el entrenamiento cognitivo estimula principalmente la supervivencia celular (Epp et al., 2007) sería interesante la introducción previa de estrategias complementarias que estimulen la proliferación de los precursores neurales y proporcionen un mayor número de células rescatables. A este respecto, el ejercicio físico constituiría un candidato prometedor por su efecto proliferativo celular y su sencilla implementación (Kronenberg et al., 2003; Henriette Van Praag et al., 1999). Aunque existe muy poca evidencia a este respecto, varios estudios apoyan esta hipótesis. De esta forma, la combinación en roedores de un protocolo de ejercicio libre en rueda que promueve la proliferación de células precursoras y de un protocolo de enriquecimiento ambiental que favorece la supervivencia de las nuevas células genera un mayor incremento neurogénico que cada una de las tareas por separado (Fabel et al., 2009). De forma similar, se ha observado que el efecto del entrenamiento en una tarea de MWM sobre la neurogénesis se ve incrementado si una semana antes los roedores son sometidos a un protocolo de ejercicio libre en rueda (Motta-Teixeira et al., 2016). No obstante, los estudios diseñados específicamente para determinar los efectos de la combinación de este tipo de estrategias sobre la regulación de la NHA son, por el momento, muy escasos.

Con respecto al impacto funcional de la NHA sobre la conducta, resulta intuitivo considerar que la mejora de este fenómeno no solo debería involucrar efectos cuantitativos, relacionados con un aumento bruto del número de nuevas CGD, sino que la mejora de los procesos neurogénicos debería ser duradera, favoreciendo la integración definitiva de estas nuevas células en circuitos funcionales (Curlik & Shors, 2013; Fabel & Kempermann, 2008). Para ello, es un requisito fundamental prevenir la muerte celular programada de las células generadas *de novo* en el GD adulto, un fenómeno natural que ocurre principalmente entre la primera y segunda semana de vida de estas CGD (Dayer et al., 2003). Se ha descrito que las tareas con elevadas demandas cognitivas (p. ej., el aprendizaje de tareas complejas) favorecen el rescate de las nuevas células del GD adulto que se encuentran inmersas en esta ventana crítica de supervivencia (Anderson et al., 2011; Döbrössy et al., 2003; Epp et al., 2007; Tashiro et al., 2007). En este estadio, la estimulación cognitiva podría beneficiarse de la expansión de las nuevas CGD inducida por el ejercicio aeróbico, para reclutar nuevas neuronas a la red hipocampal que podrían participar en el procesamiento de futuras demandas ambientales (Ambrogini et al., 2010; Ge et al., 2007; Ramirez-Amaya et al., 2006; Trouche et al., 2009).

Basándonos en la evidencia experimental disponible, el primer bloque experimental de esta Tesis Doctoral tiene como objetivo determinar si la combinación secuencial de entrenamiento físico y cognitivo mejora de manera sinérgica la NHA y la plasticidad hipocampal. En concreto, se pretende testar si la combinación de ambas estrategias es capaz de expandir de forma duradera una población de nuevas células del GD adulto durante la ventana crítica de supervivencia neuronal (i. e., entre una y dos semanas de edad). Con este objetivo, se emplearon ratones que fueron sometidos a un

protocolo de ejercicio aeróbico programado para incrementar la proliferación de una cohorte de precursores neurales del GD adulto, y que fueron identificadas mediante la administración de BrdU durante las primeras sesiones de ejercicio. Cuando estas nuevas CGD marcadas con BrdU alcanzaron aproximadamente una semana de edad (8-10 días), los animales fueron entrenados en una tarea de memoria de trabajo espacial en MWM, la cual ha demostrado ser efectiva para incrementar la supervivencia de las nuevas CGD en comparación con la versión clásica de la tarea (i. e., memoria de referencia; Aasebø et al., 2018).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Animales

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se emplearon únicamente ratones macho debido a varios factores. En primer lugar, todos los datos previos del grupo se derivaban del uso de ratones macho C57BL6/J. Asimismo, estudios previos sugieren que el sexo de los animales puede influir sobre la extinción (Hilderbrand & Lasek, 2014) y la reinstauración (Bobzean et al., 2010) de la preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína, por lo que la inclusión de ambos sexos en estos estudios habría implicado un mayor tamaño muestral, difícil de abarcar por las limitaciones de tiempo y recursos, aunque la futura replicación de estos experimentos en ratonas hembras es de sumo interés para verificar si los tratamientos propuestos podrían ser implementados en ambas poblaciones.

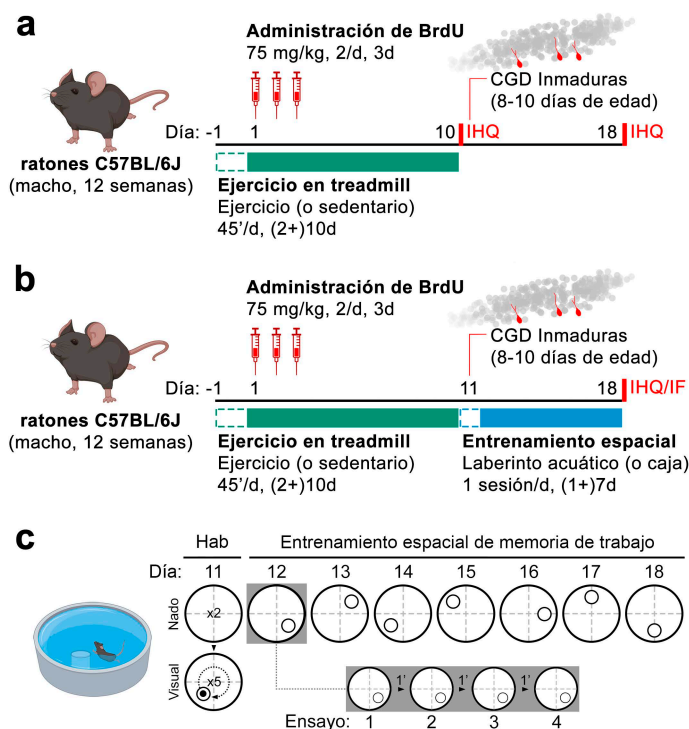
En concreto, en el desarrollo de este bloque experimental se emplearon un total de 36 ratones macho de la cepa C57BL/6J de 12 semanas de edad (Janvier; Le Genest-St-Isle, Francia), que al comienzo de los estudios experimentales fueron estabulados en las instalaciones del centro de Experimentación y Conducta Animal (CECA) de la Universidad de Málaga. Tras un periodo de aclimatación al CECA, los animales fueron agrupados en grupos de 3/4 animales en jaulas de laboratorio estándar que incluían material de enriquecimiento (tubos y material de nido), así como comida y agua *ad libitum*. Durante la duración de los experimentos, los ratones fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas de duración (luces encendidas a las 8:00) en una habitación con control de ventilación, temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad (~40%). Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo entre las 8:00 y las 15:00 en salas habilitadas para la evaluación conductual con iluminación regulada. Antes de la realización de cualquier protocolo conductual, los animales recibieron un periodo de habituación a las salas de experimentación de, al menos, 30 minutos de duración. Todos los procedimientos con animales se realizaron de conformidad con las regulaciones europeas (Directiva 2010/63/UE) y españolas (Real Decreto 53/2013 y 1386/2018, y la Ley 32/2007) para la investigación animal y fueron aprobados por el comité ético de experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA no. 29-2017-A) así como por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía (05/11/2018/153).

### 2.2. Diseño experimental

El estudio se dividió en dos fases. En una primera fase (**Figura 9a**) se evaluaron los efectos a corto y largo plazo del ejercicio aeróbico sobre la proliferación y la supervivencia de nuevas células del GD adulto. Para ello, se emplearon animales que fueron asignados

aleatoriamente a una de las siguientes condiciones experimentales: ratones que fueron sometidos a un protocolo de ejercicio programado en cinta de correr de 12 días de duración (2 días de habituación seguidos de 10 días de ejercicio de intensidad moderada) y que fueron sacrificados 24 horas (*EJE+24h*,  $n = 6$ ) o 9 días (*EJE+CAJA*,  $n = 6$ ) después de la última sesión de ejercicio; animales mantenidos en condiciones sedentarias durante la duración del protocolo de ejercicio y que fueron sacrificados 24 horas (*SED+24h*,  $n = 6$ ) o 9 días (*SED+CAJA*,  $n = 6$ ) después de la última sesión de ejercicio. Durante las tres primeras sesiones de ejercicio de intensidad moderada, todos los animales recibieron administraciones intraperitoneales (i.p.) de BrdU (2 inyecciones por día durante 3 días consecutivos, 75 mg/kg/inyección) con el objetivo de marcar las cohortes de CGD en fase de división durante esta fase del procedimiento. Tras el sacrificio de los animales, se realizaron procedimientos inmunohistoquímicos para detectar la expresión hipocampal de marcadores celulares relacionados con la proliferación y la supervivencia de nuevas CGD.

En una segunda fase (**Figura 9b**), se evaluaron los efectos de un entrenamiento espacial con demandas de memoria de trabajo en MWM (**Figura 9c**), aplicado de forma independiente o precedido de ejercicio en cinta de correr, sobre la proliferación y/o la supervivencia de nuevas células del GD adulto. Para ello, se emplearon animales que fueron asignados aleatoriamente a una de las siguientes condiciones experimentales: animales entrenados en la tarea de MWM durante 8 días (un día de habituación seguido de 7 días de entrenamiento), y previamente mantenidos en condiciones sedentarias (*SED+MWM*,  $n = 6$ ) o sometidos a ejercicio programado (*EJE+MWM*,  $n = 6$ ); animales que no recibieron entrenamiento en la tarea de MWM y que fueron previamente mantenidos en condiciones sedentarias (*SED+CAJA*) o sometidos a ejercicio en cinta de correr (*EJE+CAJA*). Los cuatro grupos experimentales fueron sacrificados 24 horas después de la última sesión de entrenamiento en MWM. Tras el sacrificio, se realizaron estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para detectar la expresión hipocampal de marcadores celulares relacionados con la proliferación, la supervivencia y la diferenciación/maduración celular de nuevas CGD.



**Figura 9. Diseño experimental del primer bloque.** Esquema de los procedimientos para la evaluación de los efectos a corto y largo plazo del ejercicio programado en cinta de correr (**a**) y los efectos de la combinación del ejercicio forzado y el entrenamiento espacial (**b**) sobre la neurogénesis hipocampal adulta.

Las líneas discontinuas en la línea temporal de los tratamientos representan las sesiones de habituación (días). **c**) Diagrama del protocolo de entrenamiento en el laberinto acuático. Abreviaturas: BrdU, bromodesoxiuridina; CGD, células del giro dentado; d, día; Hab, habituación; IF, inmunofluorescencia; IHQ, inmunohistoquímica.

## 2.3. Intervenciones conductuales

### 2.3.1. Ejercicio aeróbico programado

Para llevar a cabo el protocolo de ejercicio programado se empleó una cinta de correr (modelo 47300, Ugo Basile, Varese, Italia: **Figura 10**) con seis carriles independientes (45 cm de largo; 5.5 cm de ancho) y una inclinación fijada en 0°. Durante los dos primeros días del procedimiento, los animales recibieron habituación al aparato para minimizar el posible estrés derivado de la novedad ante la exposición al aparato y evaluar la posible necesidad de exclusión de aquellos animales con una baja motivación para correr. En un primer día de habituación, los ratones podían explorar la cinta de correr (detenida) durante 5 minutos y, a continuación, eran sometidos a ejercicio de intensidad creciente durante 30 minutos, comenzando a una velocidad baja que fue incrementada paulatinamente a lo largo de la sesión (de 3 m/min a 12 m/min). En un segundo día de habituación, los animales fueron expuestos a la cinta de correr a una velocidad de nuevo paulatinamente incrementada en un rango levemente superior al del día anterior (9 m/min a 15 m/min). Habitualmente se utiliza como método de aumento de la motiva-



**Figura 10. Cinta de correr para ratón.** Imagen de la cinta de correr con seis carriles independientes utilizada para el protocolo de ejercicio programado.

ción para correr una leve descarga eléctrica que los animales reciben cuando entran en contacto con la rejilla de choque situada en la parte trasera de la cinta de correr. Sin embargo, con el objetivo de evitar el posible estrés derivado de los shocks eléctricos, los animales fueron, en su lugar, entrenados para que evitaran la rejilla de choque mediante el contacto de una pipeta de plástico con la cola del animal cuando alcanzaban la misma tal y como se ha llevado a cabo en trabajos previos (Sampedro-Piquero et al., 2020). Ningún animal cumplió con los criterios de exclusión durante los días de habituación.

Tras la habituación al aparato y al procedimiento, los animales de las condiciones de ejercicio aeróbico fueron sometidos durante 10 días consecutivos a sesiones de carrera en cinta de 45 minutos de duración y a una velocidad constante de 15 m/min. Este protocolo de ejercicio en cinta de correr fue seleccionado basándonos en la literatura científica que indica que provoca una demanda aeróbica de intensidad moderada en ratones adultos C57BL/6J no entrenados (~75-80% del consumo máximo de oxígeno del

animal; Castellani et al., 2018; Schefer & Talan, 1996). Inmediatamente después de cada tanda de animales, la cinta de correr se limpió con una solución de etanol al 30% para evitar posibles efectos de interferencia relacionados con señales olfativas. A su vez, los animales de los grupos sedentarios fueron mantenidos en sus jaulas dentro de la sala de experimentación durante las sesiones de habituación y ejercicio programado.

### 2.3.2. Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris

El entrenamiento en la tarea de MWM se desarrolló en una sala de experimentación independiente dotada de numerosas claves espaciales distales y cuyo objetivo fue facilitar la orientación espacial de los animales durante la realización de la tarea. Las jaulas de los ratones se situaban en una habitación adyacente a la sala de la piscina para evitar su exposición a las claves espaciales antes y después de ser expuestos a los ensayos experimentales. El aparato utilizado consistía en una piscina circular (Panlab, Harvard Apparatus, Barcelona, España) de 120 cm de diámetro, 60 cm de altura y cubierta con agua ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en la cual se situaba una plataforma de escape de 11 cm de diámetro. Para evitar que los animales pudiesen localizar visualmente la plataforma durante los ensayos de entrenamiento, el agua fue teñida de blanco utilizando una pintura no tóxica. Asimismo, y con el objetivo de evitar el desarrollo de estrategias de aprendizaje egocéntrico de búsqueda de la plataforma, se asignó a cada ensayo una de ocho localizaciones pseudoaleatorias (Norte, Sur, Este, Oeste, Noreste, Sudeste, Noroeste y Sudoeste) que determinaban el lugar en el cual los animales eran introducidos en la piscina. Todas las sesiones de MWM fueron grabadas mediante una cámara digital fijada en el techo de la sala de experimentación y conectada a un sistema computarizado de registro (RECORD-IT! MEDIA; Panlab) que se encontraba en la sala adyacente a la piscina. Los datos fueron analizados usando el software Ethovision XT 12 (Noldus, Wageningen, Países Bajos) y el paquete de software Rtrack (Overall et al., 2020). El protocolo empleado de aprendizaje en el MWM se muestra representado en la **Figura 9c** y constaba de las siguientes fases:

1. *Habituación.* durante el primer día, los animales recibieron exposiciones al aparato y al procedimiento para favorecer su habituación al entorno novedoso de la piscina y a la manipulación requerida para la ejecución de los ensayos de aprendizaje. En primer lugar, fueron sometidos a dos ensayos consecutivos de exploración de la piscina sin presencia de la plataforma de escape, cada uno de ellos de 60 segundos de duración. Concretamente, los animales eran extraídos de su jaula (situada en la sala adyacente), colocados encima de una rejilla y trasladados cuidadosamente a la sala en la que se encontraba la piscina. A continuación, eran introducidos en la piscina con el cuerpo orientado hacia la pared del laberinto, en la localización pseudoaleatoria correspondiente. Tras introducir al ratón en la piscina, la investigadora se mantenía en la sala adyacente durante todo el ensayo para evitar posibles interferencias en la conducta del animal (p. ej., nado hacia la investigadora para escapar, etc.). Una vez finalizado cada ensayo, el ratón se extraía de la piscina mediante el uso de la rejilla, se secaba y permanecía en su jaula durante un intervalo de tiempo de 1 minutos (intervalo entre ensayos).
2. *Aprendizaje visual.* Tras la finalización de los ensayos de habituación, los ratones fueron sometidos a 5 sesiones consecutivas de entrenamiento “visual” en las cuales la plataforma de escape estaba presente y visible dentro de la piscina. Con estos ensayos se pretendía comprobar la habilidad de los animales para nadar hacia la plataforma y su motivación para escapar, así como favorecer que los ratones aprendieran a subir a la plataforma. Durante los ensayos, los animales podían explorar la

piscina hasta que encontraban la plataforma o como máximo durante 60 s. Aquellos animales que no conseguían subir a la plataforma en el tiempo límite de 60 segundos eran guiados manualmente hasta ella y permanecían sobre su superficie 30 segundos adicionales para favorecer la consolidación del aprendizaje. Durante estos ensayos, la plataforma se encontraba elevada sobre la superficie del agua y, para aumentar su visibilidad desde cualquier punto de la piscina, se colocó sobre su superficie un objeto negro de poliestireno de 12 cm de altura. Una vez finalizado cada ensayo, se modificaba la ubicación de la plataforma, situándose en el centro de cada uno de los cuadrantes virtuales en los que se dividió el laberinto.

3. *Aprendizaje espacial con demandas de memoria de trabajo.* La fase de entrenamiento en la tarea se llevó a cabo aplicando un protocolo de aprendizaje diseñado para evaluar la memoria de trabajo espacial o aprendizaje dependiente de ensayo (Aasebø et al., 2018). Durante los siete días posteriores a la habituación, los animales fueron entrenados en esta tarea recibiendo cuatro ensayos por día. Durante esta fase de entrenamiento, la plataforma se encontraba sumergida 1 cm bajo la superficie del agua para impedir ser vista por los ratones. Además, su ubicación se modificaba cada día, pero se mantenía fija en el mismo lugar durante los cuatro ensayos de cada sesión. Al comienzo de cada ensayo, los animales eran introducidos en la piscina desde una de las localizaciones pseudoaleatorias y se les permitía nadar hasta encontrar la plataforma o por un máximo de 60 segundos. Una vez encontrada la plataforma, los animales permanecían en su superficie durante 15 segundos antes de ser extraídos de la piscina. Los ratones que no podían encontrar la plataforma en 60 segundos eran guiados manualmente y se les permitía permanecer sobre ella durante 30 segundos adicionales para favorecer la orientación espacial.

Para el análisis comportamental del laberinto acuático de Morris, en la fase de habituación, con el objetivo de estudiar la actividad exploratoria de los animales, la piscina fue dividida en cinco zonas (cuatro cuadrantes: N, S, E y O; y una zona circular externa; **ver Figura 13**) y se registró el tiempo de permanencia en cada una de las zonas, la distancia total recorrida (cm) y la velocidad media (cm/s). Durante la fase de aprendizaje visual se registró la latencia de escape (segundos) o tiempo que tarda el animal en subirse a la plataforma. Finalmente, durante la fase de aprendizaje espacial, se registraron y analizaron, la latencia de escape (segundos), y velocidad media (cm/s). Dado que la plataforma cambiaba de localización cada día, se analizó asimismo la distancia acumulada (total de la distancia mínima entre el animal y la plataforma a lo largo del ensayo) con respecto a la localización de la plataforma en cada uno de los días y con respecto a la localización de la plataforma el día previo para evaluar perseverancia o flexibilidad. Complementariamente, se llevó a cabo un análisis de las estrategias de búsqueda de la plataforma utilizadas por los animales, registrándolas automáticamente a través del paquete de software *Rtrack* (Overall et al., 2020). La frecuencia de uso de estrategias aloécnicas (i. e., búsqueda dirigida a un objetivo, búsqueda corregida, trayectoria directa, o perseverancia; categorizadas como estrategias “espaciales”) y estrategias egocéntricas (i. e., tigmotaxis, bucles repetitivos, aleatoria, escaneo, o encadenamiento; categorizadas como estrategias “no espaciales”) fue calculada para cada uno de los ensayos.

#### 2.4. Administración de bromodeoxiuridina

Durante los tres primeros días del protocolo de ejercicio programado en cinta, todos los animales recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de BrdU. Las administraciones de BrdU tuvieron lugar durante tres días consecutivos a razón de 2 dosis diarias (75

mg/kg, diluida en una solución de NaCl al 0,9%) separadas por un intervalo de 6 horas. El objetivo de este procedimiento era el de identificar una cohorte de células del GD en proceso de división celular al inicio del procedimiento experimental (**Figura 9a,b**).

## 2.5. Perfusión intracardiaca y obtención de tejido cerebral fijado

Una vez finalizados los procedimientos conductuales (ejercicio y/o entrenamiento en MWM), se procedió a la fijación y recolección del tejido cerebral de los animales empleando el método de perfusión intracardiaca. El procedimiento se realizó en condiciones de anestesia profunda de los ratones mediante una dosis i.p. de pentobarbital sódico (200 mg/kg, diluida al 20% en suero fisiológico; Vétoquinol Especialidades Veterinarias, S.A., Madrid, España). Tras alcanzar el nivel adecuado de anestesia, el ratón era colocado en posición de cúbito supino practicándose una incisión en la caja torácica y seccionando el diafragma para exponer el corazón. A continuación, se realizó una incisión en la aurícula derecha para promover el vaciado sanguíneo del animal y se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo que estaba conectada a una bomba peristáltica (modelo D-25V, DINTER SA-DINKO Instruments, Barcelona). En primer lugar, se realizó un lavado del aparato circulatorio mediante perfusión de un tampón fosfato salino (0,01 M, pH 7,4) durante aproximadamente 2-3 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la fijación del tejido mediante perfusión de una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino durante aproximadamente 8-10 minutos. Una vez finalizado el procedimiento, se decapitó al animal y se realizaron incisiones en el cráneo hasta liberar y finalmente poder extraer el tejido cerebral completo. Las muestras de tejido permanecieron incluidas en paraformaldehído al 4% y mantenidas a una temperatura de 4°C durante 48 horas. Tras el periodo de postfijación, las muestras de tejido se transfirieron a una solución de sacarosa (Panreac Química S.L.U.; Barcelona, España) al 30% en tampón fosfato salino con un 0,02% de azida sódica, donde se preservaron a 4°C durante aproximadamente 72 horas hasta su posterior corte y seriación.

## 2.6. Corte y seriación del tejido cerebral

Para el corte y seriación del tejido cerebral, las muestras obtenidas fueron primero divididas por medio de una incisión en la cisura interhemisférica. A continuación, se realizó una incisión coronal en la porción más caudal del cerebro para crear una base estable y se incluyó el tejido en una solución de agar (Panreac Química S.L.U) al 4% en agua destilada para crear un bloque sólido que posteriormente era fijado con pegamento instantáneo a la platina del aparato de corte. Una vez fijado el bloque, este se incluía en tampón fosfato salino y se realizaban cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor mediante vibratomo (Microm H650V; Thermo Fisher Scientific, Massachussets, EEUU). Las secciones de tejido cerebral fueron distribuidas en seis series equivalentes (seriación 1/6, espaciadas en 240  $\mu\text{m}$ ) y mantenidas en tampón fosfato salino hasta su posterior tratamiento histológico. Se seleccionó aleatoriamente el hemisferio izquierdo para la realización de estudios de marcadores neurogénicos, empleándose el hemisferio derecho para el desarrollo de estudios de marcadores de plasticidad cerebral.

## 2.7. Inmunohistoquímica

### 2.7.1. Procedimientos de inmunohistoquímica por DAB

Se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos (IHQ) para la detección de marcadores relacionados con la NHA (CGD BrdU<sup>+</sup>, PCNA<sup>+</sup> y DCX<sup>+</sup> en GD) y otros relacionados con la plasticidad hipocampal (detección del factor neurotrófico derivado del cerebro - BDNF- y sinapsina I -SYN- en hipocampo). Los procedimientos de IHQ se realizaron en

secciones en flotación siguiendo protocolos previamente publicados por el grupo de investigación (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). En primer lugar, se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena por medio de la incubación de las secciones en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. A continuación, las secciones fueron incubadas *overnight* a 4°C en uno de los siguientes anticuerpos primarios (recogidos en la **Tabla 1**): anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU para detectar las células BrdU<sup>+</sup>; anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA para detectar las células en división; anticuerpo policlonal de conejo anti-DCX para detectar las neuronas inmaduras de aproximadamente 3/4 semanas de edad; anticuerpo monoclonal de conejo anti-factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinapsina Ia/b para detectar la expresión de BDNF y sinapsina I (SYN), respectivamente. En el caso de la detección de BrdU, este paso fue precedido por un proceso de desnaturalización del ADN (necesario para exponer las moléculas de BrdU al anticuerpo primario), para lo cual se incluyeron las secciones en 2N HCl (Panreac Química, S.L.U) durante 15 minutos a 37° y, posteriormente, en una solución de tampón borato (pH 8,5) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, las secciones fueron incubadas durante 90 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado apropiado: anti-rata, anti- ratón o anti-conejo; **Tabla 1**).

**Tabla 1.** Anticuerpos y reactivos utilizados en el primer bloque experimental.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti-BrdU	Abcam (ab6326)	IgG, monoclonal obtenido en rata	1:500 en PST
Anti-PCNA	MERCK-Sigma (P8825)	IgG2a, monoclonal obtenido en ratón	1:1500 en PST
Anti-DCX	Abcam (ab18723)	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:400 en PST
Anti-BDNF	Abcam (ab108319)	IgM, monoclonal obtenido en conejo	1:500 en PST
Anti-sinapsina-Ia/b	Santa Cruz (sc376623)	IgG, monoclonal obtenido en ratón	1:500 en PST
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti IgG de rata biotinilado	Amersham (RPN1002)	IgG, monoclonal obtenido en oveja	1:500 en PST
Anti IgG de ratón biotinilado	Dako (E0433)	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:500 en PST
Anti IgG de conejo biotinilado	Dako (E0353)	IgG, policlonal obtenido en cerdo	1:500 en PST
OTROS REACTIVOS DE DETECCIÓN	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Peróxido de hidrógeno	Merck (1072100250)	-	3% en agua destilada
Extravidina®	Sigma-Aldrich (E2886)	Conjugada a peroxidasa	1:1000 en tampón fosfato
DAB	Sigma-Aldrich (D5637)	-	0,05% en agua destilada

Posteriormente, las secciones se incubaron en una solución de Extravidina® conjugada a peroxidasa diluida 1:1000 en tampón fosfato salino durante 45 minutos en condiciones de oscuridad. Por último, se llevó a cabo el revelado con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 5% en tampón fosfato y peróxido de hidrógeno al 0,05%. En las secciones empleadas para la detección de BrdU y PCNA se realizó una tinción de contraste con galocianina cromoalumbre (Panreac Química, S.L.U) durante dos horas a 56°C para facilitar la identificación del GD y los cuerpos celulares. En el caso de la detección de sinapsina-1, se intensificó la señal de revelado agregando 0,02 g de Níquel a la solución de DAB. Todos los anticuerpos primarios y secundarios biotinilados fueron diluidos en una solución de tampón fosfato salino que contenía un 2,5% de suero de burro, un 0,25% de Triton X-100 y un 0,1% de azida sódica (PST). Finalmente, todos los cortes fueron deshidratados y montados con el medio de montaje EUKITT® (ORSATEC, GmbH, Bobingen, Alemania). Todos los pasos descritos en el procedimiento fueron intercalados con tres lavados de tampón fosfato salino de 5 minutos de duración cada uno.

### 2.7.2. Procedimientos de inmunofluorescencia

En el caso de las condiciones experimentales SED+CAJA, SED+MWM, EJE+CAJA Y EJE+MWM, se analizó la diferenciación/maduración de las células BrdU<sup>+</sup> del GD mediante doble inmunofluorescencia (IF) para la detección conjunta de los marcadores BrdU y DCX. El procedimiento se realizó en secciones en flotación siguiendo protocolos previamente publicados por el grupo de investigación (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). Tras la desnaturalización del ADN con HCl (descrita anteriormente), las secciones fueron incubadas *overnight* a 4°C en una solución de PST que incluía los anticuerpos primarios correspondientes para la detección de BrdU y DCX (**Tabla 2**). A continuación, el tejido fue incubado durante 90 minutos en una solución que contenía los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa Fluor® (**Tabla 2**). Inmediatamente después, las secciones fueron montadas en portaobjetos y preservadas utilizando el medio de montaje Fluoromount™ (MERCK Sigma-Aldrich).

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en los procedimientos de inmunofluorescencia del primer bloque experimental.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti-BrdU	Abcam (ab6326)	IgG, monoclonal obtenido en rata	1:500 en PST
Anti-DCX	Abcam (ab18723)	IgG, policlonal obtenido en conejo	1:400 en PST
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti IgG de rata conjugado Alexa Fluor® 488	Abcam (ab150157)	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:500 en tampón fosfato salino
Anti IgG de conejo conjugado Alexa Fluor® 594	Abcam (ab150076)	IgG, policlonal obtenido en burro	1:500 en tampón fosfato salino

## 2.8. Procedimientos de cuantificación celular

El número de CGD BrdU<sup>+</sup> y PCNA<sup>+</sup> se determinó manualmente empleando un microscopio Olympus BX41 (Olympus, Solms, Alemania) con un objetivo 100X de inmersión en aceite. La cuantificación se realizó en una de cada seis secciones del GD distinguiendo entre las porciones dorsal (desde -1,34 mm hasta -2,80 mm con respecto a Bregma; Paxinos & Franklin, 2001) y ventral (desde -2,94 mm hasta -3,80 mm con respecto a Bregma). Los resultados preliminares de esta cuantificación de células no revelaron diferencias significativas entre el número de CDG BrdU<sup>+</sup> o PCNA<sup>+</sup> de ambos hemisferios, por lo que se seleccionó de forma aleatoria el hemisferio izquierdo para la cuantificación del resto de marcadores relativos a la NHA, mientras que el hemisferio derecho se reservó para el análisis de marcadores de plasticidad hipocampal (i. e., BDNF y SYN). El área de la CCG del GD fue calculada empleando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) a partir de imágenes de alta resolución tomadas con un objetivo de 10X aumentos en un microscopio Olympus BX53 equipado con una cámara Olympus DP73 (Olympus). Los datos se expresaron como número de CGD por área (mm<sup>2</sup>).

La cuantificación de neuronas DCX<sup>+</sup> hipocampales se realizó mediante planimetría digital en seis secciones representativas del GD a lo largo del eje dorsoventral del GD (desde -1,46 mm hasta -3,40 mm con respecto a Bregma) empleando el software ImageJ. Para ello, se obtuvieron imágenes de alta resolución tomadas a 10X aumentos obtenidas mediante el equipamiento Olympus BX53/DP73 (Olympus). Considerando su morfología dendrítica, las neuronas DCX<sup>+</sup> fueron clasificadas en tres categorías diferentes siguiendo referencias publicadas (Plümpe et al., 2006): estadio proliferativo (tipo-1), estadio intermedio (tipo-2) y estadio postmitótico (tipo-3). Las categorías fueron diferenciadas en función de la presencia y la forma de las dendritas apicales de las células. En este sentido, las neuronas DCX<sup>+</sup> categorizadas dentro del estadio proliferativo (tipo-1) se caracterizaban por la ausencia total o por la escasa presencia de procesos dendríticos cortos que presentaban aproximadamente un tamaño menor al de un núcleo neuronal. Las neuronas DCX<sup>+</sup> clasificadas en el estadio intermedio (tipo-2) se caracterizaban por presentar procesos dendríticos de longitud intermedia y morfología inmadura, que se introducían en la CCG sin llegar a alcanzar la capa molecular del GD. Las neuronas DCX<sup>+</sup> clasificadas en el estadio postmitótico (tipo-3) debían presentar una apariencia esencialmente madura con una dendrita gruesa que alcanzaba la capa molecular del GD y un árbol dendrítico desarrollado. El área de la CCG del GD fue obtenida empleando el software ImageJ. Los datos se expresaron como número de células por área (mm<sup>2</sup>).

La expresión conjunta de los marcadores BrdU y DCX se analizó en seis secciones representativas del GD a lo largo del eje dorsoventral (desde -1,46 mm a -3,40 mm con respecto a Bregma) empleando un microscopio confocal Stellaris 8 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) con un objetivo 40X de inmersión en aceite. Los resultados se presentaron como el porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup> que expresaban al mismo tiempo DCX, el cual se estimó sobre la base de, al menos 40 CGD BrdU<sup>+</sup> contadas por animal.

La expresión cuantitativa de BDNF y SYN en hipocampo fue estimada mediante densitometría en cuatro secciones por animal (desde -1,46 a -3,40 con respecto a Bregma) a partir de imágenes de alta resolución obtenidas a 10X aumentos con el equipo Olympus BX53/DP73 (Olympus) empleando el software ImageJ. Para ello, las imágenes fueron primero convertidas a escala de grises. A continuación, se calculó la densidad óptica relativa [i. e., resultado de transformar los valores de intensidad mediante la fórmula:  $\log_{10} \times (255/\text{valor del píxel})$ ] en las distintas zonas de la formación hipocampal (incluyendo todas las capas de CA1, CA3 y GD). Esta densidad óptica se expresó como el

valor gris promedio de la región de interés. Para controlar posibles artefactos relacionados con diferencias en la intensidad base de las tinciones, en cada imagen se tomó un valor de referencia (i. e., valor gris promedio en una porción del cuerpo calloso), el cual se restó al valor gris promedio de la región de interés. Los datos se expresaron como densidad óptica promedio para cada marcador.

## 2.9. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando los paquetes estadísticos Statistica 8 (StatSoft Power Solutions Inc., Oklahoma, EEUU) e IBM SPSS 20 (IBM, Nueva York, EEUU). La representación gráfica de la media y error estándar de la media (SEM) fue realizada con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software LLC, Massachusetts, EEUU). El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$  en todos los casos.

La existencia de diferencias entre grupos e intra-grupos se determinó mediante el contraste de medias basado en las pruebas *t* de Student para muestras independientes (para contrastes entre dos medias) o el análisis de la varianza (ANOVA) uni/factorial con/sin medidas repetidas (para contrastes de más de dos medias), según resultase apropiado. En aquellos casos en los que la prueba *F* del ANOVA resultó significativa, se realizaron análisis *post hoc* de comparaciones múltiples utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan (DMRT). En caso de resultados significativos, se calcularon medidas de tamaño del efecto basadas en los coeficientes *d* de Cohen (para contrastes entre dos medias) y eta cuadrado parcial ( $\eta_p^2$ , para contrastes entre más de dos medias). Las relaciones entre variables se determinaron mediante el análisis de correlaciones bivariadas de Pearson. Asimismo, se aplicó el análisis de componentes principales (ACP) con rotación varimax para extraer dimensiones independientes (i. e., componentes principales, CP) a partir de los datos obtenidos en MWM e IHQ. La solución de CP a extraer se determinó estableciendo como criterio autovalores  $\geq 1$ . Las puntuaciones factoriales (i. e., valores estandarizados indicativos de la posición relativa de cada animal en cada CP) se determinaron mediante el método de regresión.

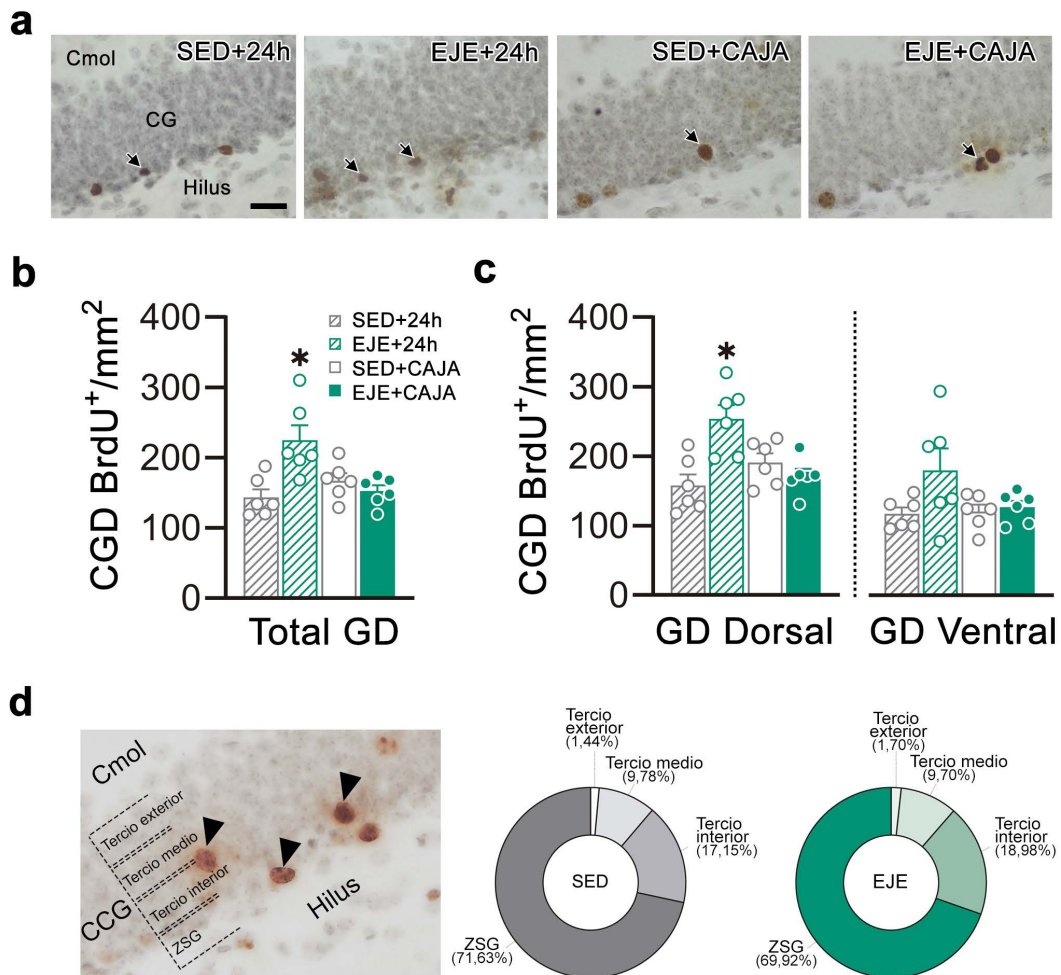
## 3. RESULTADOS

### 3.1. Efectos del ejercicio aeróbico programado sobre la neurogénesis hipocampal adulta

Con el objetivo de evaluar los efectos a corto y largo plazo del protocolo de carrera en cinta sobre la proliferación y la supervivencia de nuevas CGD, se analizó la expresión de los marcadores BrdU y PCNA en grupos de animales sedentarios o ejercitados que fueron sacrificados 24 horas después de la última sesión de ejercicio (grupos SED+24h y EJE+24h), cuyos resultados fueron comparados con los observados en animales sedentarios o ejercitados sacrificados nueve días después de la última sesión de ejercicio (grupos SED+CAJA y EJE+CAJA; **Figura 9a**).

Con respecto a los datos relativos al marcador BrdU, se realizó un ANOVA factorial de dos vías (EJE  $\times$  tiempo) que reveló un efecto de interacción significativo [ $F_{EJE \times tiempo}(1,20) = 12,009$ ,  $p = 0,002$ ,  $\eta_p^2 = 0,375$ ]. Los análisis *post hoc* revelaron que los animales ejercitados y sacrificados un día después de la última sesión de carrera en cinta mostraron un mayor número de CGD BrdU<sup>+</sup> en comparación con las demás condiciones experimentales ( $p < 0,01$ ), no hallándose diferencias significativas entre el resto de los grupos (**Figura 11b,c**). Seguidamente, se realizaron ANOVAs de dos vías (EJE  $\times$  tiempo)

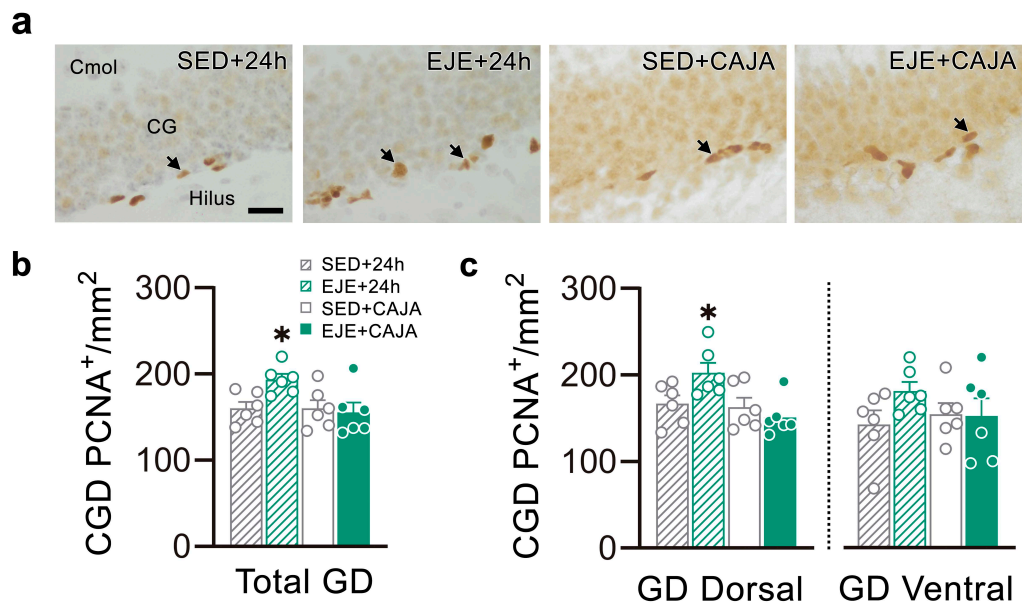
adicionales que revelaron que este incremento en la cantidad de CGD BrdU<sup>+</sup> en los animales de la condición EJE+24h resultó significativa en la porción dorsal del GD [ $F_{EJE \times tiempo}(1,20) = 14,253$ ,  $p = 0,001$ ,  $\eta_p^2 = 0,416$ ] pero no en la porción ventral. Las comparaciones múltiples *post hoc* revelaron que los animales del grupo EJE+24h mostraron más células BrdU<sup>+</sup> en el GD dorsal en comparación con el resto de las condiciones experimentales ( $p < 0,01$ ), no encontrándose diferencias significativas entre el resto de los grupos (Figura 11b).



**Figura 11. Efectos a corto y largo plazo del ejercicio programado en cinta de correr sobre la neurogénesis hipocampal adulta.** **a)** El ejercicio programado provocó un incremento a corto plazo en el número de células del giro dentado (CGD) positivas para bromodeoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>). Las barras de escala representan 20  $\mu$ m. Los ejemplos de marcaje positivo se indican mediante flechas negras. **b)** El ejercicio generó un incremento agudo en la expresión de BrdU<sup>+</sup> que resultó significativo en la porción dorsal del giro dentado (GD). **c)** Imágenes representativas de la inmunotinción con BrdU en el GD de cada grupo experimental. **d)** Distribución topográfica de las células BrdU<sup>+</sup> en la capa celular granular (CCG) del GD en los animales sedentarios (SED) y ejercitados (EJE) 24 horas después tras el cese del ejercicio. Independientemente de la condición experimental, la mayoría de las células marcadas con BrdU se localizaban en la zona subgranular (ZSG) del GD, y en menor medida (en orden de frecuencia) en los tercios interior, medio y exterior de la CCG del GD. Los datos se encuentran representados como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencias en comparación con el resto de los grupos:  $*p < 0,05$ . Abreviaturas: Cmol, capa molecular.

Adicionalmente, se analizó la distribución topográfica de las nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> en la CCG, observándose una localización y migración similar de las células BrdU<sup>+</sup> desde la ZSG hasta la capa exterior de la CCG en los grupos SED+24h y EJE+24h (**Figura 11d**). En conjunto, estos resultados indican que el ejercicio en la cinta de correr favoreció de manera transitoria la proliferación y/o la supervivencia de nuevas CGD del hipocampo adulto, especialmente en la porción dorsal del mismo, aunque este efecto se revirtió tras un periodo de, al menos, 9 días de reposo del animal en jaula.

A continuación, se estudió el efecto específico del protocolo en cinta de correr sobre la proliferación de nuevas CGD. Para ello, se analizó el nivel de expresión del marcador de proliferación celular PCNA a las 24 horas o a los 9 días desde la última sesión de ejercicio. El ANOVA factorial de dos vías (*EJE* × *tiempo*) mostró un efecto de interacción significativo [ $F_{EJE \times tiempo}(1,20) = 4,458, p = 0,048, \eta_p^2 = 0,182$ ]. Los análisis de comparaciones múltiples *post hoc* mostraron que los animales ejercitados y sacrificados un día después de la última sesión de carrera en cinta presentaban un mayor número de células PCNA<sup>+</sup> en el GD en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ), no observándose diferencias significativas entre el resto de las condiciones experimentales (**Figura 12b,c**).



**Figura 12. Efectos agudos del ejercicio programado en cinta de correr sobre la proliferación de células en el hipocampo.** a) Imágenes representativas de la inmunotinción del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en el giro dentado (GD) de cada grupo experimental. Las barras de escala representan 20  $\mu\text{m}$  y los ejemplos de marcaje positivo se indican mediante flechas negras. b) La proliferación de células del giro dentado (CGD) se encontraba incrementada poco después del cese del ejercicio (EJE), pero no tras 9 días de reposo en jaula. c) El ejercicio aeróbico incrementó de forma aguda la proliferación celular en la porción dorsal del GD. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencias en comparación con el resto de los grupos: \* $p < 0,05$ . CG, capa granular; CGD, Cmol, capa molecular; SED, sedentario.

Nuevamente, el análisis detallado de los datos en las porciones dorsal y ventral del GD corroboró que los efectos del ejercicio, en este caso para incrementar el número de células proliferativas PCNA<sup>+</sup>, se circunscribían al GD dorsal [ $F_{EJE \times tiempo}(1,20) = 5,423$ ,  $p = 0,031$ ,  $\eta_p^2 = 0,213$ ], no encontrándose efectos significativos en relación con la porción ventral de esta estructura. Las comparaciones múltiples *post hoc* mostraron un aumento del número de células PCNA<sup>+</sup> en el GD dorsal de los ratones del grupo EJE+24h en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ), en ausencia de diferencias entre el resto de las condiciones experimentales (**Figura 12c**). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el ejercicio en cinta de correr estimula de manera transitoria la proliferación de nuevas CGD, particularmente en su región dorsal, y que este efecto pro-neurogénico fue revertido tras un periodo de, al menos, 9 días de reposo del animal en jaula.

### 3.2. Efecto del ejercicio programado sobre el aprendizaje de la tarea de laberinto acuático

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los animales para aprender la tarea de memoria de trabajo espacial en MWM, así como el posible efecto facilitador del ejercicio programado sobre este proceso, se analizó el rendimiento de los animales sedentarios y ejercitados durante las sesiones de entrenamiento de la prueba, con base en las medidas registradas durante el desarrollo de la tarea (latencia de escape, distancia acumulada con respecto a la plataforma y velocidad media).

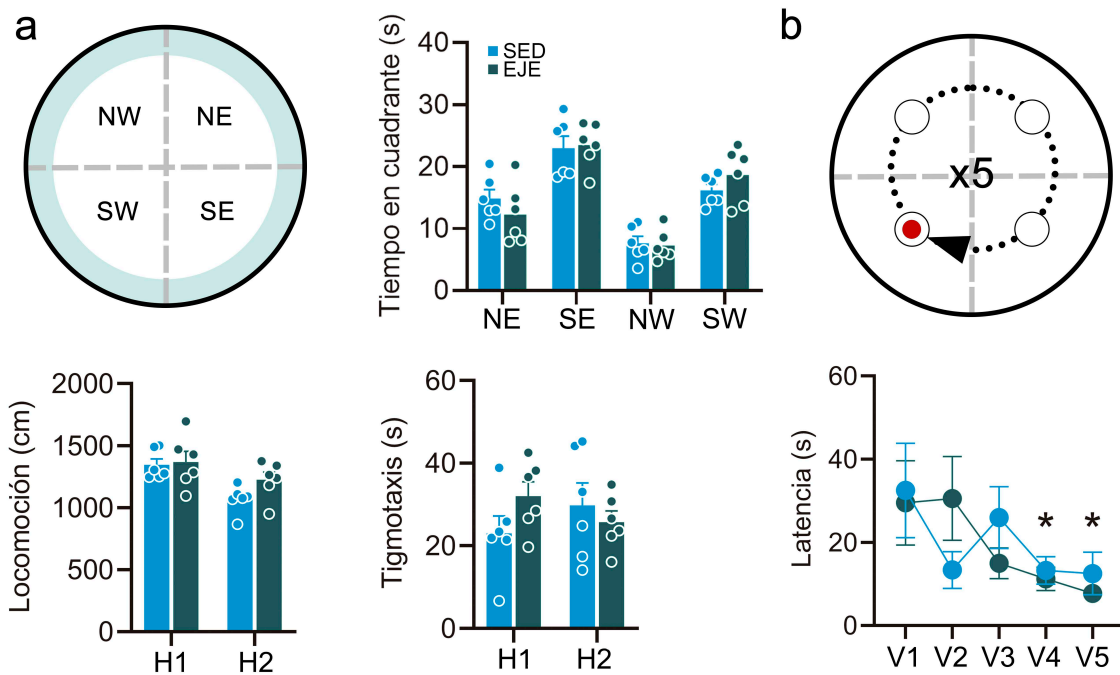
En primer lugar, se evaluó la conducta de exploración de la piscina durante los ensayos de habituación y aprendizaje visual. En los ensayos de habituación, los animales de ambos grupos experimentales (SED y EJE) mostraron un tiempo de nado similar en cada uno de los cuadrantes virtuales en los que fue dividida la piscina (**Figura 13a**). Igualmente, no se observaron diferencias entre ambas condiciones experimentales ni en la distancia total recorrida ni en el tiempo de permanencia en la zona periférica de la piscina (tigmotaxis; **Figura 13a**). A continuación, se realizó un ANOVA unifactorial de medidas repetidas para analizar el nivel de aprendizaje con respecto a las reglas de la tarea a lo largo de los cinco ensayos de aprendizaje visual.

Los resultados revelaron que ambos grupos de animales requirieron menos tiempo para alcanzar la plataforma [ $F_{ensayo}(4, 40) = 3,150$ ,  $p = 0,024$ ,  $\eta_p^2 = 0,239$ ] en los últimos dos ensayos (V4-5) con respecto al ensayo V1 ( $p < 0,05$ ), lo que sugiere un aprendizaje correcto de las reglas básicas de la tarea. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre-grupos en la latencia para alcanzar la plataforma en la fase de aprendizaje visual (**Figura 13b**).

A continuación, se pretendía analizar el rendimiento de los ratones en la tarea de memoria de trabajo espacial en MWM. Para ello, se realizaron ANOVAs unifactoriales de medidas repetidas incluyendo las medidas de latencia de escape y distancia acumulada con respecto a la plataforma. Los análisis no mostraron un efecto significativo de la triple interacción *Día × Ensayo × Grupo*, pero sí efectos de interacción *ensayo x grupo* significativos. Por lo tanto, y en aras de facilitar la comprensión de los datos, se representaron los resultados de los ensayos 1-4 promediados a lo largo de los siete días del periodo de entrenamiento. En concreto, los animales de ambas condiciones experimentales (SED y EJE) mostraron una reducción significativa en el tiempo requerido para alcanzar la plataforma en el ensayo 4 en comparación con el ensayo 1 [ $F_{ensayo \times grupo}(3,30) = 3,412$ ,  $p = 0,030$ ,  $\eta_p^2 = 0,254$ ] lo que sugiere un aprendizaje correcto de la tarea.

No se encontraron diferencias significativas entre-grupos, aunque se observó una tendencia no significativa de los animales ejercitados para encontrar la plataforma más rápido en los ensayos 1 ( $p = 0,090$ ) y 4 ( $p = 0,163$ ; **Figura 14a,b**).

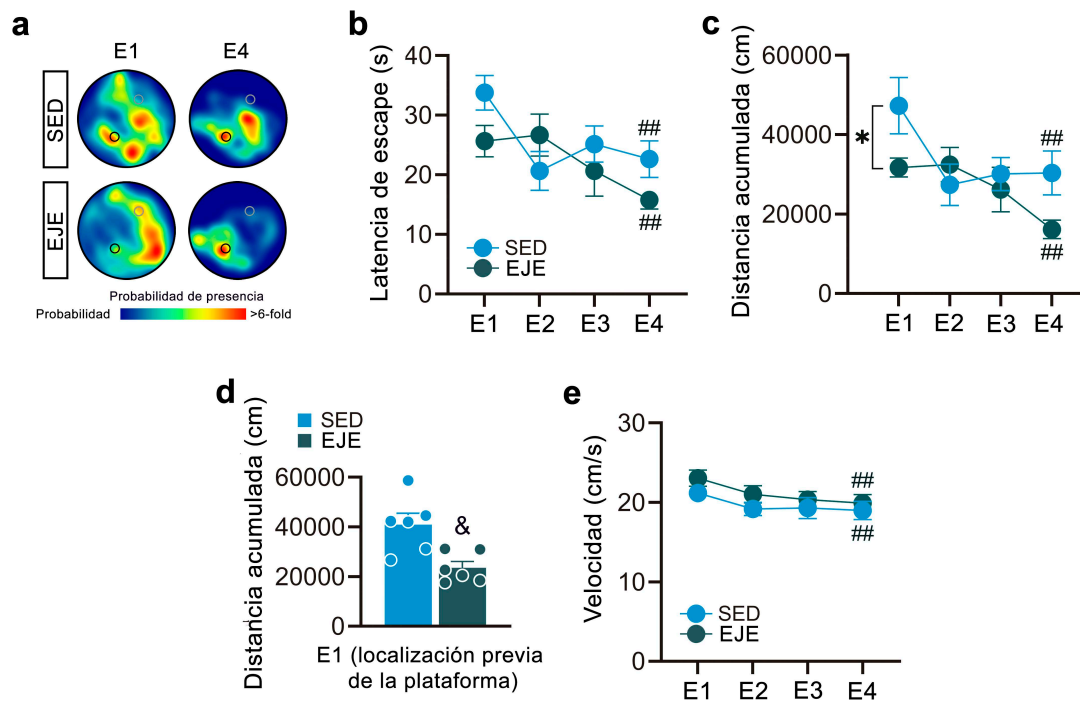
Con respecto al análisis de la distancia acumulada, ambas condiciones experimentales mostraron una reducción de la misma en el ensayo 4 en comparación con el ensayo 1 [ $F_{\text{ensayo} \times \text{grupo}}(3,30) = 3,528$ ,  $p = 0,027$ ,  $\eta_p^2 = 0,261$ ; **Figura 14a,c**]. Los análisis *post hoc* revelaron que los animales del grupo ejercicio mostraron una menor distancia acumulada con respecto a la plataforma durante el ensayo 1 ( $p = 0,039$ ), así como una tendencia no significativa a presentar una menor distancia acumulada respecto de la plataforma en el ensayo 4 ( $p = 0,073$ ) en comparación con el grupo de animales SED (**Figura 14c**).



**Figura 13. Resultados de las sesiones de habituación y aprendizaje visual de la tarea en el MWM.** a) Representación de la piscina circular. Se muestra en color azul la región periférica, así como los cuatro cuadrantes imaginarios en los que fue dividida para el análisis de la conducta (NW, NE, SW, SE). Para el tiempo de nado en cada uno de los cuadrantes virtuales de la piscina se representa el promedio de las dos sesiones de habituación. Ambos grupos realizaron una exploración similar de la piscina. b) Sesión de entrenamiento “visual”. En la figura se muestra una representación de la piscina circular y las distintas posiciones de la plataforma en cada uno de los 5 ensayos. El círculo rojo representa el objeto utilizado para aumentar la visibilidad de la plataforma. Ambos grupos alcanzaron la plataforma significativamente más rápido en los ensayos 4 y 5 en comparación con el primer ensayo. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): \*diferencias con respecto a V1 en el mismo grupo:  $p < 0,05$ . Abreviaturas: EJE, ejercicio; H1-2, ensayos 1-2 de habituación; V1-4, ensayos 1-4 de visual; NE, cuadrante noreste; NW, cuadrante noroeste; s, segundos; SE, cuadrante sureste; SED, sedentario; SW, cuadrante suroeste.

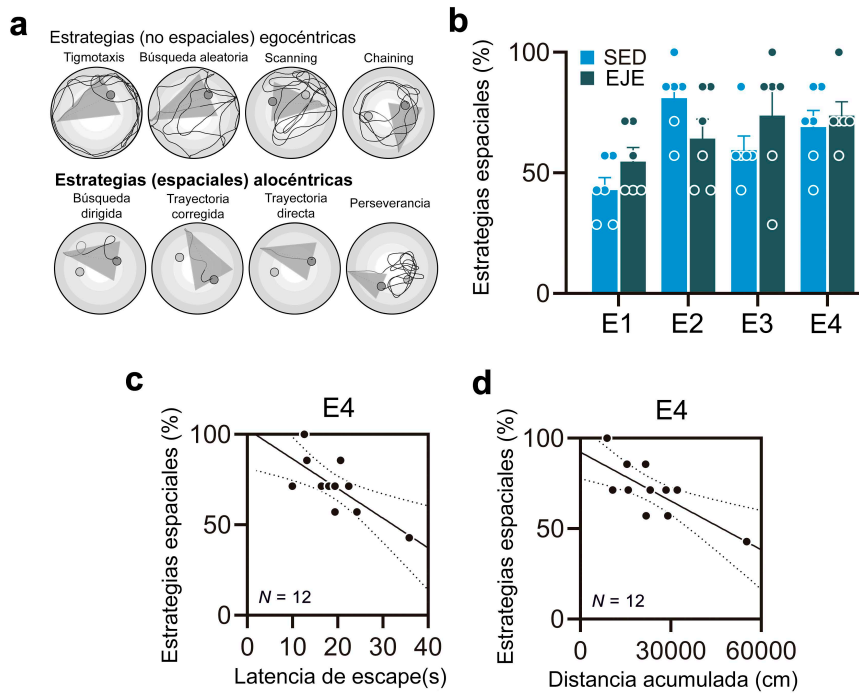
Asimismo, se observó que los animales del grupo EJE mostraron una menor distancia acumulada con respecto a la localización de la plataforma del día anterior durante el ensayo 1 [ $t(10) = 3,331$ ,  $p = 0,008$ ,  $d = 1,923$ ; **Figura 14d**], lo cual sugiere una mayor capacidad de los ratones ejercitados para retener la información aprendida a largo plazo. En términos generales, los resultados del entrenamiento espacial en MWM sugieren que ambas condiciones experimentales fueron capaces de aprender la tarea, si bien los animales sometidos al protocolo de ejercicio mostraron una cierta tendencia a

rendir mejor en comparación con los animales mantenidos en condiciones sedentarias. Por último, se analizaron otras medidas adicionales registradas en la prueba, mediante un ANOVA de medidas repetidas que reveló una reducción general en la velocidad de nado en los ensayos 2-4 en comparación con el ensayo 1 [ $F_{\text{ensayo}}(3,30) = 12,157, p < 0,001, \eta_p^2 = 0,549$ ; **Figura 14e**], en ausencia de efectos significativos de grupo o de interacción. Este resultado sugiere que la condición física de los animales SED y EJE era similar durante el entrenamiento en el MWM y, por lo tanto, no explicaría por sí sola las diferencias observadas en el rendimiento en la tarea.



**Figura 14. Rendimiento de los animales en la versión de memoria de trabajo del laberinto acuático.** **a)** Mapa de calor representativo de los animales sedentarios (SED) y ejercitados (EJE) en E1 y E4. La escala de color representa la probabilidad de que los ratones se encuentren presentes en una localización determinada. **(b-c)** Los animales de ambas condiciones requirieron significativamente menos tiempo para alcanzar la plataforma al final de las sesiones de entrenamiento **(b)** y mostraron una reducción significativa en la distancia acumulada a la plataforma al final de las sesiones de entrenamiento **(c)**. **d)** Los animales del grupo EJE mostraron menos distancia acumulada para alcanzar la localización previa de la plataforma durante los primeros ensayos diarios. **e)** No se encontraron diferencias entre grupos en la velocidad de nado durante el entrenamiento en el laberinto acuático. Los datos en **(b-e)** se encuentran representados como media  $\pm$  SEM. Los puntos en **(d)** representan valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencia entre variables conectadas por líneas: \* $p < 0,05$ ; diferencia entre E1 y E4 en el mismo grupo: ## $p < 0,01$ . Prueba t de Student: & diferencia entre grupos:  $p < 0,05$ . Abreviaturas: E1-4, ensayo 1-4 (promedio de los 7 días de entrenamiento).

Finalmente, se analizaron las distintas estrategias de navegación empleadas por los animales para encontrar la plataforma durante la prueba (**Figura 15a**), dado que proporcionan información valiosa acerca del nivel de implicación del hipocampo en el desempeño de los animales en la tarea MWM (Garthe & Kempermann, 2013). Para ello, se realizó un ANOVA de medidas repetidas ( $EJE \times \text{ensayo}$ ) que reveló que ambas condiciones experimentales presentaban un porcentaje similar de uso de las estrategias espaciales (i. e., aloécnicas) durante los ensayos 1-4 (**Figura 15b**). Sin embargo, análisis adicionales revelaron una correlación significativa entre el uso de las estrategias aloécnicas y las medidas de latencia ( $r = -0,735, p = 0,007$ ; **Figura 15c**) y distancia



**Figura 15. Evaluación de las estrategias de navegación utilizadas en el laberinto acuático.** **a)** Imágenes representativas de las estrategias de búsqueda analizadas en el entrenamiento en el laberinto acuático (la estrategia “circling” no se muestra ya que los animales no utilizaron esta estrategia durante este entrenamiento). **b)** No se observaron diferencias en el uso de estrategias espaciales en E1-4 entre los animales sedentarios (SED) y ejercitados (EJE). **(c-d)** El uso de estrategias espaciales correlacionaba de forma inversa con la latencia de escape de la piscina **(c)** y la distancia acumulada para alcanzar la plataforma **(d)** en E4. Los datos en **(b)** se encuentran representados como media  $\pm$  SEM y los puntos representan valores individuales. Abreviaturas: E1-4, ensayos 1-4 (promedio de los 7 días de entrenamiento).

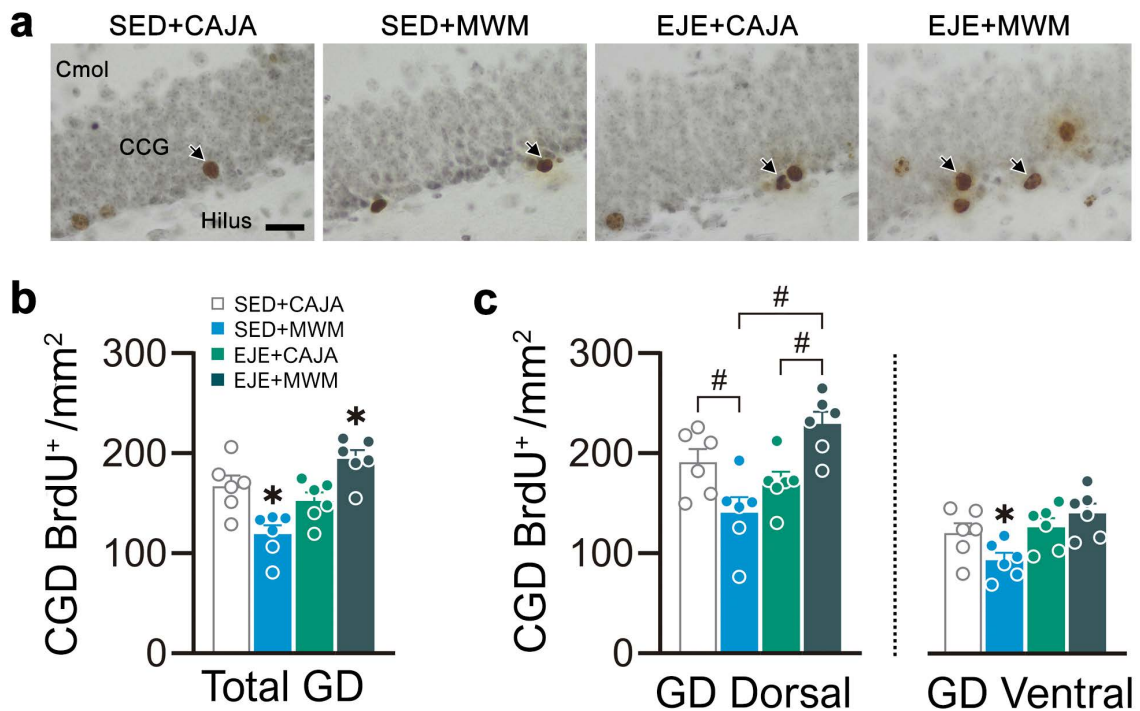
acumulada con respecto a la plataforma ( $r = -0,747$ ,  $p = 0,005$ ; **Figura 15d**) registradas durante el ensayo 4. Por tanto, estos resultados sugieren que la mejora en el rendimiento en la tarea de MWM se asociaba con un mayor uso de estrategias de búsqueda espacial (i. e., dependientes de hipocampo).

### 3.3. Efecto de la combinación del ejercicio programado y el entrenamiento en el laberinto acuático sobre la NHA y la plasticidad hipocampal

Con el objetivo de determinar si la aplicación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento en el laberinto acuático presentaba efectos sinérgicos para estimular la NHA, se llevaron a cabo ANOVAs factoriales (EJE  $\times$  MWM) para analizar la presencia de diferencias entre grupos en relación con la expresión de BrdU, BrdU/DCX y de los marcadores endógenos PCNA y DCX.

En primer lugar, los análisis relacionados con la detección de CGD BrdU<sup>+</sup> mostraron un efecto de interacción significativo [ $F_{\text{EJE} \times \text{MWM}}(1,20) = 23,739$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta_p^2 = 0,543$ ]. Las comparaciones múltiples *post hoc* revelaron que los animales ejercitados y posteriormente entrenados en la tarea de MWM mostraron un mayor número de CGD marcadas con BrdU en comparación con el resto de condiciones experimentales ( $p < 0,05$ ), mientras que en los ratones sedentarios entrenados en la tarea de MWM se

observó una reducción significativa en esta población celular con respecto a las demás condiciones ( $p < 0,05$ ), no encontrándose diferencias significativas entre el resto de los grupos (Figura 16a,b).



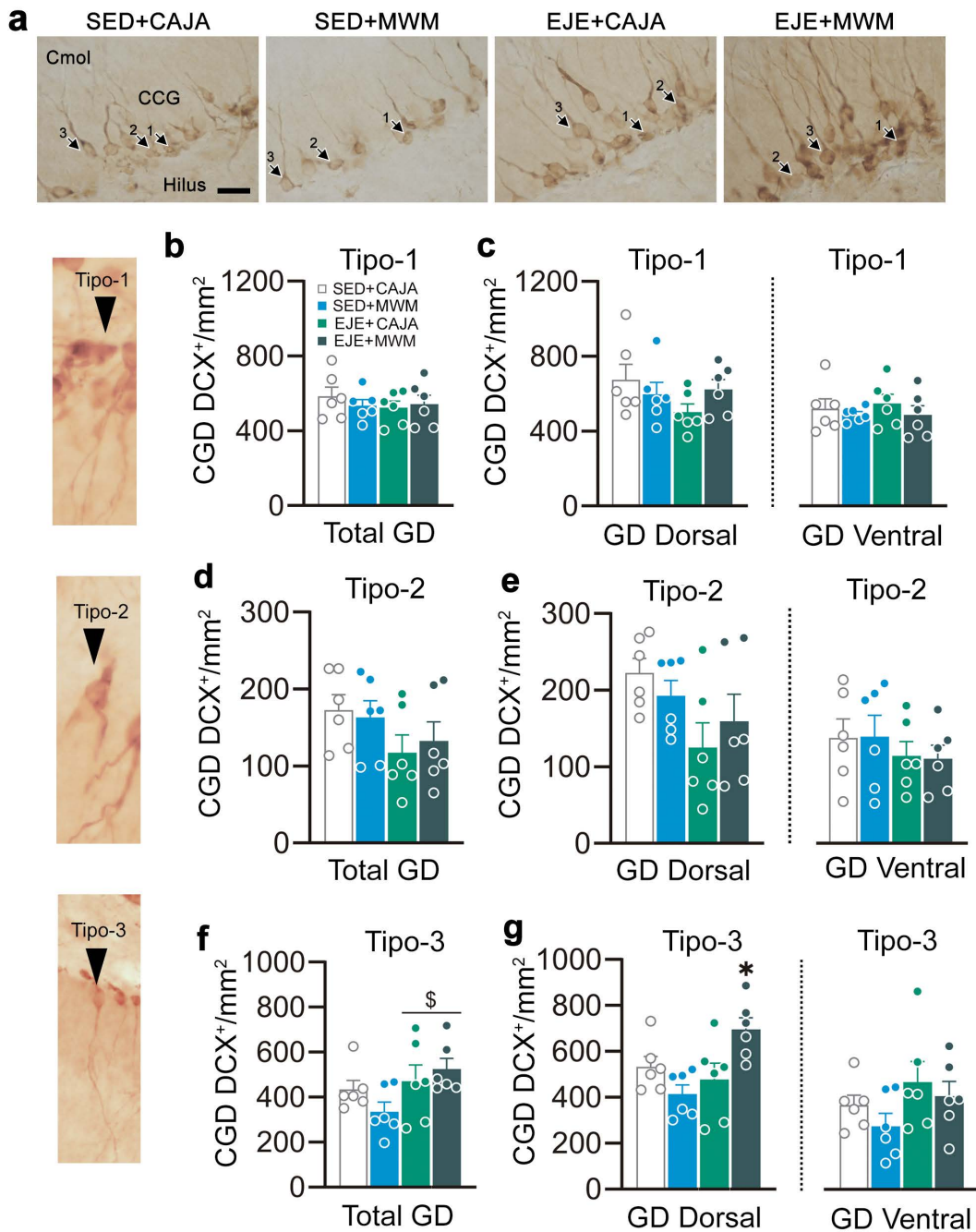
**Figura 16. Efectos de la combinación del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento de memoria de trabajo espacial sobre la proliferación/supervivencia de nuevas células en el hipocampo.** a) Imágenes representativas de la inmunotinción con bromodeoxiuridina (BrdU) en el giro dentado (GD) del hipocampo. Los ejemplos de señal positiva se indican mediante flechas negras. Las barras de escala representan 20  $\mu\text{m}$ . b) La combinación del ejercicio (EJE) y el entrenamiento en el laberinto acuático (MWM) incrementó significativamente la supervivencia de nuevas células BrdU<sup>+</sup> en el GD, observándose el efecto opuesto tras la aplicación de la tarea de memoria espacial en ratones sedentarios (SED). c) Los animales que recibieron ejercicio seguido de entrenamiento en MWM mostraron más células BrdU<sup>+</sup> en el GD dorsal, mientras que los ratones sedentarios que fueron entrenados en la tarea de memoria espacial mostraron una reducción en la expresión de BrdU en las dos porciones del GD. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencias en comparación con el resto de los grupos: \* $p < 0,05$ ; diferencias entre variables conectadas por líneas: # $p < 0,05$ ; Abreviaturas: CCG, capa granular celular; Cmol, capa molecular.

Estos resultados sugieren que la combinación secuencial de ejercicio aeróbico y entrenamiento espacial en MWM provocaba efectos sinérgicos sobre la supervivencia de nuevas CGD, superiores a los de cada tratamiento aplicado de forma individual. De hecho, los resultados indicaron que el entrenamiento en el MWM, aplicado de forma aislada, tuvo un impacto negativo en la supervivencia de nuevas CGD.

Para estudiar en mayor detalle estos resultados, se llevaron a cabo análisis detallados de los niveles de BrdU en las porciones dorsales y ventrales del GD. Estos análisis revelaron una interacción significativa en la expresión de BrdU<sup>+</sup> tanto en el GD dorsal [ $F_{\text{EJE} \times \text{MWM}}(1,20) = 17,413$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta_p^2 = 0,465$ ] como en el GD ventral [ $F_{\text{EJE} \times \text{MWM}}(1,20) = 5,067$ ,  $p = 0,036$ ,  $\eta_p^2 = 0,202$ ]. Los análisis *post hoc* revelaron un incremento general en la cantidad de células BrdU<sup>+</sup> en el GD dorsal de los animales sometidos a la combinación de ejercicio y MWM con respecto a los grupos que recibieron solo uno de los

tratamientos ( $p < 0,01$ ), presentando un nivel de significación marginal ( $p = 0,052$ ) con respecto al grupo SED+CAJA (**Figura 16c**). Por otro lado, los ratones que únicamente recibieron entrenamiento en MWM mostraron un menor número de CGD BrdU<sup>+</sup> en el GD dorsal en comparación con los animales de los grupos SED+CAJA ( $p = 0,016$ ) y EJE+MWM ( $p < 0,001$ ), no presentando diferencias significativas con respecto al grupo EJE+CAJA (**Figura 16c**). Con respecto al análisis realizado en el GD ventral, se evidenció una reducción del número de CGD BrdU<sup>+</sup> en los animales que recibieron únicamente entrenamiento en MWM con respecto al resto de los grupos ( $p < 0,05$ ), no encontrándose efectos de la combinación de ejercicio y entrenamiento en MWM para incrementar la cantidad de CGD BrdU<sup>+</sup> en esta porción del GD, ni diferencias significativas entre el resto de las condiciones experimentales (**Figura 16c**). En conjunto, estos resultados sugieren efectos dinámicos del entrenamiento en MWM a lo largo del eje dorsoventral del GD dependiendo de la presencia o ausencia de ejercicio previo.

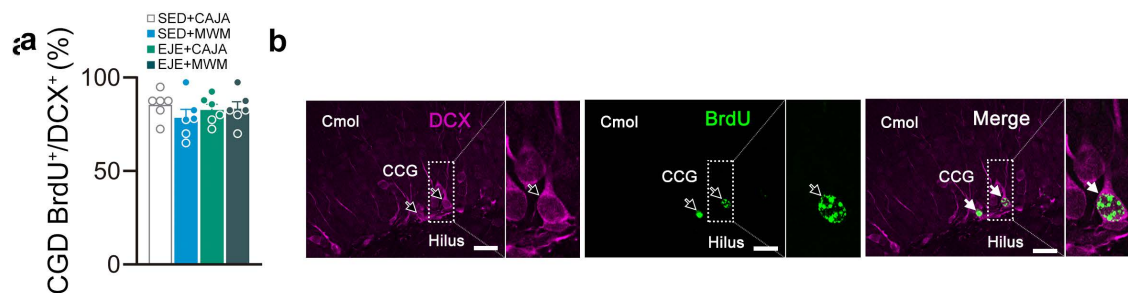
Con respecto al análisis inmunohistoquímico de DCX, se analizó la presencia de diferencias entre grupos con respecto al total de células DCX<sup>+</sup>, así como en relación con los subtipos establecidos según el perfil morfológico (células DCX<sup>+</sup> tipo-1, tipo-2 o tipo-3). Los resultados no mostraron efectos significativos de interacción o efectos principales de cada factor con respecto al número total de células DCX<sup>+</sup>. Tampoco se encontraron diferencias entre grupos con respecto a la población general de CGD DCX<sup>+</sup> tipo-1 o tipo-2, indicando que las poblaciones de células DCX<sup>+</sup> en estadio proliferativo (i. e., tipo-1) o todavía inmaduras (i. e., tipo-2) se encontraban inalteradas en los distintos grupos al final del procedimiento experimental (**Figura 17a-e**).



**Figura 17. Efectos de la combinación del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento de memoria de trabajo espacial sobre la diferenciación/maduración neuronal de nuevas células del hipocampo adulto. a)** Imágenes representativas de la inmunotinción de doblecortina (DCX) en el giro dentado (GD) de las distintas condiciones experimentales. Los ejemplos de marcaje positivo se encuentran indicados con flechas negras y los números representan ejemplos de los tipos celulares DCX<sup>+</sup> (1-3). La barra de escala representa 20  $\mu$ m. **(b-e)** La aplicación de ejercicio (EJE) y/o entrenamiento en laberinto acuático (MWM) no afectó al nivel de expresión de células de DCX<sup>+</sup> en estadio proliferativo (tipo-1) o intermedio (tipo-2). **f)** Las condiciones EJE mostraron una mayor cantidad de células DCX<sup>+</sup> en estadio maduro (tipo-3). **g)** Los animales ejercitados y entrenados en MWM mostraron más células DCX<sup>+</sup> tipo-3 en la porción dorsal del GD con respecto al resto de grupos, mientras que no se encontraron diferencias significativas en relación con la porción ventral del GD. Los datos se encuentran representados como media  $\pm$  SEM y los puntos indican valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): \*diferencias en comparación con el resto de los grupos:  $p < 0,05$ ; §diferencias en comparación con los grupos sedentarios (SED):  $p > 0,05$ . Abreviaturas: CGC, capa granular celular; Cmol, capa molecular.

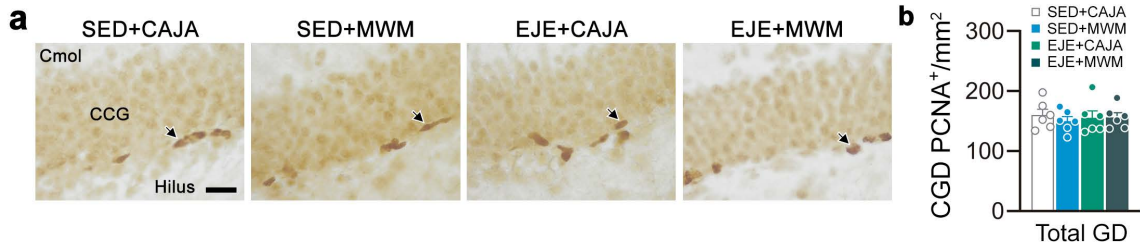
Sí se encontró un efecto significativo del ejercicio para incrementar la población general de células DCX<sup>+</sup> tipo-3 en GD [ $F_{EJE}(1,20) = 4,649, p = 0,043, \eta_p^2 = 0,189$ ] en ausencia de efectos de interacción o efectos simples del entrenamiento en MWM. Las comparaciones múltiples *post hoc* revelaron que, en general, los animales ejercitados mostraron una mayor cantidad de CGD DCX<sup>+</sup> con fenotipo maduro en comparación con los ratones mantenidos en condiciones sedentarias ( $p = 0,044$ ; **Figura 17f**). Sin embargo, cuando el ANOVA se restringió al GD dorsal, se encontró un efecto de interacción significativo [ $F_{EJE \times MWM}(1,20) = 9,903, p = 0,005, \eta_p^2 = 0,331$ ]. Los análisis *post hoc* mostraron que la población de CGD DCX<sup>+</sup> tipo-3 se vio incrementada en la porción dorsal (pero no la ventral) del GD de los animales sometidos a la combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento en MWM en comparación con el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ), no encontrándose diferencias significativas entre las demás condiciones experimentales (**Figura 17g**). Esta aparente discrepancia podría deberse al hecho de que los dos grupos entrenados en MWM mostraban un patrón inverso en cuanto al número de CGD DCX<sup>+</sup> tipo-3, lo cual podría haber enmascarado un efecto de interacción global que, sin embargo, alcanzó significación estadística en la porción dorsal del GD.

En cuanto al estudio de inmunofluorescencia de los marcadores BrdU<sup>+</sup> y DCX<sup>+</sup>, los resultados del ANOVA factorial no arrojaron significación estadística del efecto de interacción ni tampoco de los efectos simples del ejercicio o el entrenamiento en MWM. En general, los datos indicaban que, independientemente de la condición experimental, las nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> se diferenciaron principalmente en neurona, en tanto que coexpresaban en su mayoría (~80%) el marcador endógeno DCX (**Figura 18a,b**).



**Figura 18. Efectos de la combinación del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento de memoria de trabajo espacial sobre la diferenciación/maduración neuronal de células marcadas con bromodesoxiuridina (BrdU).** a) No se encontraron efectos del ejercicio (EJE) y/o el entrenamiento en laberinto acuático (MWM) sobre la diferenciación y/o maduración neuronal de las CGD BrdU<sup>+</sup>. Los datos se encuentran representados como media  $\pm$  SEM y los puntos indican valores individuales. b) Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia de los marcadores BrdU y doblecortina (DCX). Los ejemplos de marcaje positivo (canales de DCX y BrdU) y de co-marcaje (canales fusionados) se encuentran indicados mediante flechas negras y blancas, respectivamente. Las barras de escala representan 20  $\mu$ m. Abreviaturas: CCG; capa celular granular; Cmol, capa molecular; SED, sedentario.

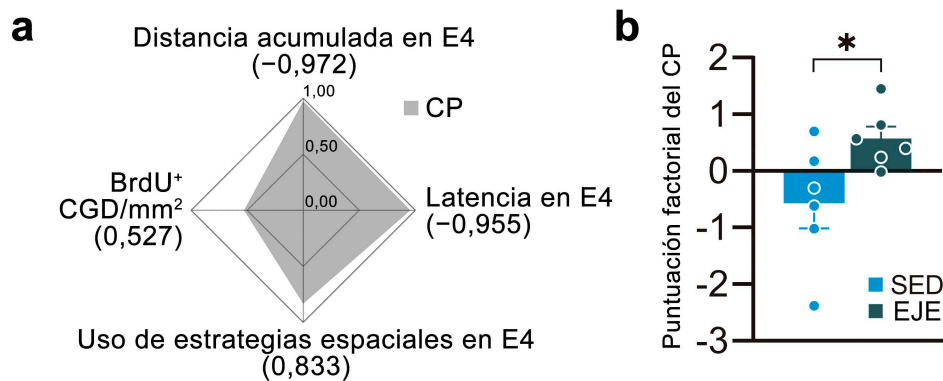
Por último, se estudiaron los efectos de los distintos tratamientos conductuales sobre la proliferación de CGD al final del procedimiento, analizando la expresión del marcador endógeno PCNA 24 horas después de la última sesión de entrenamiento en MWM (precedido o no por el ejercicio). El ANOVA factorial no arrojó significación con respecto al efecto de interacción o los efectos simples de cada factor con respecto al número de nuevas CGD PCNA<sup>+</sup> (**Figura 19b**), sugiriendo que el entrenamiento en MWM, independientemente de la presencia o ausencia de ejercicio previo, no influyó sobre la proliferación de nuevas células hipocampales a tiempo final.



**Figura 19. Efectos de la combinación del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento de memoria de trabajo espacial sobre la proliferación de células en el hipocampo.** a) Imágenes representativas de la inmunotinción para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en las distintas condiciones experimentales. Los ejemplos de marcaje positivo se encuentran indicados mediante flechas negras. Las barras de escala representan 20 μm. b) No se encontraron diferencias entre grupos en la proliferación de nuevas células en el GD al final del experimento. Los datos se encuentran representados como media ± SEM y los puntos indican valores individuales. Abreviaturas: CCG, capa celular granular; Cmol, capa molecular; EJE, ejercicio; SED, sedentario.

Para comprender mejor la relación entre el ejercicio en cinta de correr, el rendimiento en la tarea MWM, la demanda hipocampal (i. e., uso de estrategias de naturaleza espacial en MWM) y la supervivencia de las nuevas CGD del hipocampo adulto, se llevó a cabo un ACP en el que se incluyeron las siguientes variables: latencia de escape en el ensayo 4, distancia acumulada con respecto a la plataforma en el ensayo 4, porcentaje de uso de estrategias espaciales en el ensayo 4 y número de nuevas CGD BrdU<sup>+</sup>.

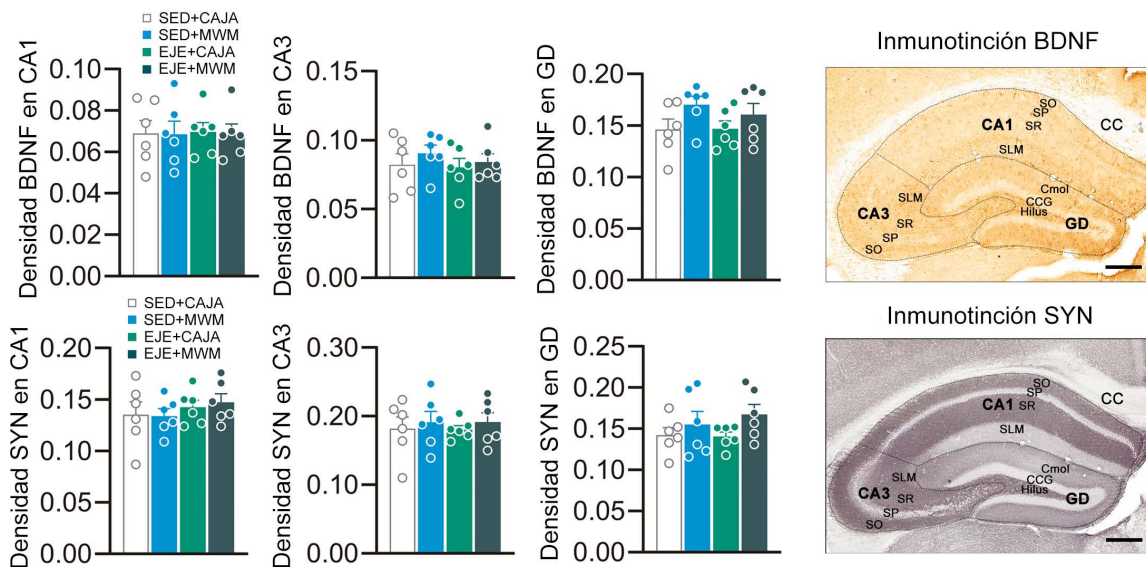
En primer lugar, se realizaron pruebas sobre adecuación de la muestra que revelaron que los datos eran adecuados para la realización de este tipo de análisis [test de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) = 0,678; test de Bartlett:  $X^2(6) = 32,716$ ,  $p < 0,001$ ]. El ACP extrajo un único CP que representaba el 70,76% de la varianza, con puntuaciones altas en el CP indicando valores bajos en las medidas de latencia de escape y distancia acumulada con respecto a la plataforma en el ensayo 4, porcentajes altos de uso de estrategias espaciales en el ensayo 4 y mayor cantidad de nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> (Figura 20a).



**Figura 20. Relación entre el rendimiento en la tarea de memoria espacial y la neurogénesis hipocampal adulta en los animales sedentarios y ejercitados.** a) El análisis de componentes principales reveló un componente principal (CP) indicativo de una latencia y distancia acumulada bajas en E4, un uso elevado de estrategias espaciales en E4 y un incremento de células del giro dentado (CGD) marcadas con bromodesoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>). La escala se representa valores absolutos. Los números representan las cargas factoriales de cada variable. b) Los animales ejercitados (EJE) mostraron puntuaciones más altas que los ratones sedentarios (SED) en el CP extraído indicando, en general, un mejor rendimiento en el laberinto acuático, un mayor uso de estrategias de navegación hipocampales y una mayor supervivencia de CGD. Los datos se representan como media ± SEM y los puntos indican valores individuales. \*Diferencias entre grupos:  $p < 0,05$ . Abreviaturas: CP, componente principal; E4, ensayo 4 (promedio de los 7 días de entrenamiento).

Análisis adicionales revelaron que los ratones sometidos a la combinación secuencial de ejercicio en cinta y entrenamiento en MWM mostraban puntuaciones factoriales significativamente superiores con respecto a sus homólogos sedentarios [ $t(10) = 2,374$ ,  $p = 0,039$ ;  $d = 1,371$ ; **Figura 20b**]. Este dato sugiere una interrelación consistente entre la combinación de ejercicio y entrenamiento en MWM y la supervivencia de nuevas CGD que se encontraban en una fase crítica de muerte celular cuando los animales tuvieron que enfrentarse a la tarea dependiente de actividad hipocampal.

Por último, con el objetivo de evaluar los posibles efectos de los tratamientos experimentales sobre los niveles de plasticidad hipocampal, se llevaron a cabo ANOVA factoriales (EJE x MWM) para determinar la existencia de diferencias entre grupos con respecto a la expresión inmunohistoquímica de los marcadores BDNF y SYN en CA1, CA3 y el GD del hipocampo. Los resultados no arrojaron significación estadística del efecto de interacción ni tampoco de los efectos simples de cada factor (**Figura 21**), sugiriendo que ni el ejercicio ni el entrenamiento en MWM, aplicados de forma individual o combinada, provocaron cambios a tiempo final en la expresión de estos factores relacionados con la plasticidad.



**Figura 21. Efectos de la combinación del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento de memoria de trabajo espacial sobre la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad hipocampal.** No se encontraron diferencias entre grupos en relación con la expresión hipocámpal del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o sinapsina (SYN). Las barras de escala en las imágenes representan 200  $\mu\text{m}$ . Para su evaluación, las imágenes fueron convertidas a escala de grises, y se analizó la densidad óptica relativa de cada zona. Los datos indican la densidad óptica promedio de cada marcador en cada región de interés y se encuentran representados como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. CC, corpus callosum; CG: capa granular; Cmol, capa molecular; GD, giro dentado; EJE, ejercicio; MWM, laberinto acuático de Morris; SED, sedentario; SLM, stratum lacunosum moleculare; SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum.

## 4. DISCUSIÓN

El análisis global de los resultados de este bloque experimental indica que la combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento de memoria dependiente del hipocampo produce efectos sinérgicos para incrementar la NHA en ratones. En este sentido, el resultado principal de este estudio indica que los animales sometidos a 10 días de ejercicio aeróbico en cinta de correr y posteriormente entrenados en una tarea de memoria de trabajo en MWM mostraron una supervivencia significativamente superior de nuevas CGD (BrdU<sup>+</sup>, generadas 8-10 días antes del entrenamiento cognitivo) en comparación con animales sometidos únicamente a una de estas estrategias conductuales. Asimismo, la combinación de ambos tratamientos también incrementó la cantidad de neuronas postmitóticas DCX<sup>+</sup> (tipo-3) en el GD dorsal, lo cual sugiere una mayor supervivencia de las poblaciones de neuronas jóvenes (incluyendo aquellas marcadas con BrdU) en esta región, aunque no se puede descartar que este resultado responda a un posible incremento en la velocidad de maduración de las neuronas generadas antes o durante los tratamientos conductuales implementados. Hasta el momento, muy pocos estudios han sido diseñados específicamente para evaluar los efectos de estrategias comportamentales combinadas, aplicadas secuencialmente, sobre la NHA. En un trabajo previo, Fabel et al. (2009) describieron que la combinación secuencial de ejercicio voluntario y enriquecimiento ambiental (empleado como método para incrementar la actividad hipocampal) generaba efectos aditivos sobre la NHA en ratones, incrementando la supervivencia de nuevas CGD en mayor medida que en aquellos casos en los que se aplicaba cada tratamiento de forma aislada. Sin embargo, en la forma clásica del paradigma de enriquecimiento ambiental la “complejidad” de la estimulación, y por tanto su variabilidad potencial, dificulta la discriminación entre los efectos de los diferentes factores que conforman la complejidad del ambiente enriquecido (i. e., aprendizaje cognitivo, mayor actividad física, interacción social; novedad; Kempermann, 1999; Kempermann et al., 2010). Asimismo, sus efectos sobre la neurogénesis parecen ser más heterogéneos que los de la aplicación de tareas cognitivas ya que no solo se limitan a un aumento de la supervivencia de las nuevas neuronas, sino que cuando es aplicado a largo plazo parece ejercer un efecto proliferativo sobre los precursores neurales (Kempermann, 1999; Kempermann, 2002) de forma similar al del ejercicio (Kronenberg et al., 2006). Hasta el momento, ningún estudio había analizado en qué medida el aprendizaje dependiente de hipocampo complementa los efectos pro-neurogénicos del ejercicio en ratones. En relación con esto, Motta-Teixeira et al. (2016) desarrollaron un estudio en ratas en el que observaron que la combinación secuencial de ejercicio en rueda y entrenamiento de memoria de trabajo en MWM también presenta beneficios sinérgicos sobre la NHA. En concreto, esta combinación parecía favorecer la supervivencia de una población de nuevas CGD (8-10 días de edad en el momento de iniciar el entrenamiento espacial) en mayor medida que cada estrategia aplicada por separado, y también con respecto a aquellas condiciones en las que la implementación de la tarea espacial se retrasa por más de una semana después de finalizado el protocolo de ejercicio voluntario o en las que la tarea en MWM no dependía de actividad hipocampal. Los hallazgos de este primer bloque son consistentes con esta evidencia previa y suponen una primera descripción de los efectos sinérgicos de esta aproximación multimodal para incrementar la NHA en ratones, la especie animal más empleada en la investigación neurobiológica actualmente (Ellenbroek & Youn, 2016).

Los resultados de este bloque apoyan la hipótesis de que los efectos positivos del ejercicio sobre la NHA podrían ser potenciados si se proporciona una estimulación hipocampal adecuada durante la ventana crítica de supervivencia de estas nuevas

células del hipocampo adulto. La cohorte de nuevas CGD marcadas con BrdU fue generada aproximadamente de 8 a 10 días antes del comienzo de la tarea de entrenamiento en MWM, coincidiendo con la fase crítica de muerte celular programada (i. e., 1-2 semanas tras el nacimiento de las neuronas) en la cual los estímulos cognitivos, relacionados con la actividad del hipocampo, pueden promover mecanismos de supervivencia celular (Tashiro et al., 2007; Trouche et al., 2009). En torno a la primera semana de edad, las nuevas células inmaduras del GD comienzan a establecer contactos sinápticos dentro de la red hipocampal y expresan una mayor plasticidad sináptica en comparación con las neuronas maduras preexistentes (Ge et al., 2007; Schmidt-Hieber et al., 2004). Estas propiedades hacen que las nuevas células del GD sean particularmente proclives a ser rescatadas de la muerte y posteriormente reclutadas para afrontar experiencias de aprendizaje dependientes de hipocampo (Tashiro et al., 2007; Trouche et al., 2009). Por su parte, el ejercicio podría generar un microambiente altamente plástico en el hipocampo, incluyendo un reservorio ampliado de células nuevas, que podría dotar a esta estructura de más recursos y “prepararlo” para responder ante estímulos relevantes en el futuro (Fabel et al., 2009). Sin embargo, los datos de este primer bloque experimental revelaron que este beneficio del ejercicio es transitorio y desaparece si el individuo no recibe estímulos relevantes que promuevan la supervivencia de las nuevas células hipocampales. Tal y como reflejan nuestros resultados, la introducción secuencial de un entrenamiento espacial dependiente de hipocampo podría beneficiarse del incremento neuroplástico inducido por el ejercicio. Esta combinación generaría un aumento neto en la supervivencia de nuevas CGD, las cuales podrían ser posteriormente reclutadas para afrontar nuevas demandas funcionales de carácter cognitivo que presenten una clara implicación hipocampal.

Los hallazgos de este bloque experimental también revelaron una aparente contradicción con respecto a los efectos aislados del entrenamiento en MWM sobre la supervivencia de nuevas CGD. En este sentido, se observó una reducción significativa en la supervivencia de las nuevas células del GD en los ratones sedentarios entrenados en el MWM (grupo SED+MWM), en contraste con los datos mostrados por los animales entrenados y previamente ejercitados (grupo EJE+MWM). En parte, nuestra aproximación en este bloque experimental tomó como referencia un estudio reciente, desarrollado en ratas, que sugería que la tarea de memoria de trabajo propuesta promovía la supervivencia neuronal en mayor medida que la versión clásica de la tarea de MWM (i. e., memoria de referencia espacial), siendo esta diferencia atribuida a un mayor incremento de las demandas cognitivas asociadas a este protocolo de memoria de trabajo espacial (Aasebø et al., 2018). Una posible explicación para esta aparente contradicción podría relacionarse con la dificultad para transferir directamente los resultados obtenidos en ratas a ratones, ya que se han documentado diferentes dinámicas de la NHA entre especies de roedores (Snyder et al., 2009). No obstante, otros estudios en los que se emplea una metodología similar en ratas, no han observado diferencias en los niveles de supervivencia celular entre animales sometidos a un entrenamiento de memoria de trabajo en el MWM (de 10 días de duración) y aquellos no entrenados (Motta-Teixeira et al., 2016) lo que complica la obtención de conclusiones sólidas. Incluso se ha observado que los paradigmas de memoria de trabajo en MWM podrían reducir la NHA en ratas, pero solo cuando el aprendizaje es extendido en el tiempo (Mohapel et al., 2006). En línea con los resultados obtenidos en el grupo SED+MWM, Xu y colaboradores (2011) observaron que 8 días de un entrenamiento de emparejamiento demorado con la muestra en MWM podría ser suficiente para reducir la supervivencia de las nuevas CGD de aproximadamente 1 semana de edad, quizás como medida para evitar una posible interferencia derivada del aprendizaje de información espacial de naturaleza muy similar pero que se encuentra en constante cambio (Saxe et al., 2007; Xu et al., 2011). Sin

embargo, esto no explicaría por qué en nuestro trabajo o en el desarrollado por Motta-Teixeira et al. (2016) se observa el efecto opuesto en animales previamente ejercitados. Las inconsistencias metodológicas entre estudios, (i. e., las diferentes especies de animales empleadas, los diferentes protocolos de memoria de trabajo etc.) dificultan la comparación de los datos obtenidos. Hasta el momento, se desconoce cómo el entrenamiento en el MWM interactúa con la NHA.

La compleja interrelación temporal entre el nacimiento de nuevas neuronas hipocampales y la implementación de la tarea de aprendizaje espacial (Döbrössy et al., 2003; Dupret et al., 2007; Epp et al., 2007) podría explicar por qué se han observado incrementos (Gould et al., 1999; Trouche et al., 2009) pero también reducciones (Ambrogini et al., 2004) o ausencia de efectos del entrenamiento sobre la supervivencia de nuevas CGD (Trincheri et al., 2015; Van Praag et al., 1999), principalmente bajo paradigmas de memoria de referencia. Precisamente, esta interrelación podría explicar por qué, en nuestro estudio, los animales sedentarios entrenados en MWM no mostraron cambios con respecto al resto de los grupos en relación con la expresión de CGD inmaduras (DCX<sup>+</sup>) de un amplio rango de edad.

En cualquier caso, de los resultados obtenidos se puede concluir de manera sólida que el entrenamiento en el MWM interactuó con el ejercicio físico para regular al alza la NHA. Este hallazgo es consistente con la evidencia que indica que este tipo de entrenamiento favorece la supervivencia celular en ratas sometidas previamente a ejercicio físico, pero no en aquellas mantenidas en condiciones sedentarias (Motta-Teixeira et al., 2016). Una posible explicación es que el entrenamiento en MWM causase efectos nocivos sobre la NHA, derivados del estrés propio de la evaluación conductual (Ehninger & Kempermann, 2006; Mohapel et al., 2006), los cuales podrían haber sido contrarrestados por la aplicación previa del protocolo de ejercicio aeróbico (Castilla-Ortega et al., 2014; Li et al., 2013). Sin embargo, es poco probable que los efectos potenciales del estrés expliquen por sí solo los resultados obtenidos, puesto que se ha descrito que protocolos breves de MWM no generan diferencias en los niveles de corticosterona en comparación con protocolos que regulan al alza o a la baja la NHA (Xu et al., 2011). Asimismo, en nuestro estudio los ratones recibieron una habituación adecuada a la tarea de MWM, y se ha descrito que este proceso previene los efectos potencialmente estresantes del entrenamiento en la prueba (Ehninger & Kempermann, 2006). Por otro lado, el incremento en la NHA mostrado por los ratones sometidos a la combinación de ejercicio y entrenamiento en MWM también podría responder a una actividad aeróbica sostenida derivada de la conducta de nado en la piscina tras el cese del ejercicio. Sin embargo, los efectos descritos de incremento sinérgico de la NHA no parecen replicarse cuando se emplean otros protocolos de aprendizaje espacial independientes de hipocampo, sugiriendo que estos efectos aditivos dependen precisamente de la existencia de una demanda cognitiva y no de la propia actividad en la piscina (Motta-Teixeira et al., 2016). Otra explicación, no excluyente, tiene que ver con el efecto del ejercicio para promover fenómenos neuroplásticos en el hipocampo que son relevantes para el aprendizaje (p. ej., liberación de neurotrofinas o incremento de la plasticidad sináptica; O'Callaghan et al., 2007; Vivar et al., 2012, 2016). En este estudio, preveíamos encontrar un aumento en la expresión hipocampal del factor de crecimiento BDNF y/o de componentes de la membrana vesicular presináptica como la sinapsina-1 (SYN), los cuales se han relacionado con un aumento en niveles de NHA (entre otros cambios neuroplásticos) en roedores sometidos a ejercicio (Vaynman et al., 2004; Vaynman et al., 2006) o a demandas cognitivas (Gómez-Pinilla et al., 2001). Sin embargo, nuestros resultados no evidencian cambios en la expresión hipocampal de BDNF y/o sinapsina I inducidos por el ejercicio, un resultado que es consistente con algunos trabajos publicados (Ferreira et al., 2011).

Es posible que la metodología empleada en el presente estudio explique estos resultados aparentemente contradictorios, ya que la recogida de muestras se realizó al menos 24 horas tras la última intervención conductual, un aspecto relevante puesto que la regulación al alza de estos marcadores puede ser transitoria e indetectable en un corto periodo de tiempo (2-3 horas; Huang et al., 2006; Schaaf et al., 2000).

Por otro lado, en la relación entre aprendizaje y NHA no solo es relevante el grado de demanda cognitiva, sino también la experiencia individual durante la tarea y el grado de aprendizaje alcanzado por los animales (Curlik et al., 2013). En nuestro estudio, fueron más capaces de retener información en comparación con los ratones sedentarios. Una posibilidad es que el entrenamiento físico proporcionase a los animales ejercitados más recursos neurocognitivos para afrontar con éxito el entrenamiento en el MWM, lo cual podría haber cambiado el procesamiento de la tarea, su grado de aprendizaje, y, por tanto, la regulación de la NHA. Por ejemplo, correr facilita procesos relacionados con la separación de patrones de tipo espacial (Creer et al., 2010), el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Henriette Van Praag et al., 2005), los cuales se encuentran a su vez vinculados con un aumento de la NHA (Gould et al., 1999; Sahay et al., 2011a; Van Praag et al., 2005). En apoyo a esta hipótesis, el análisis multivariado de los datos reveló que la mejora en el rendimiento en el MWM, junto con el uso de estrategias hipocampales y la supervivencia de las nuevas CGD, integraban una única dimensión que resultó modulada diferencialmente por la presencia o ausencia de actividad física previa, siendo significativamente mayor en los animales ejercitados.

Los resultados obtenidos también corroboraron que 10 días de ejercicio de intensidad moderada en cinta de correr provocan un aumento de la NHA a corto plazo, tal y como había sido descrito previamente (Ferreira et al., 2011). Poco después del cese del ejercicio (aproximadamente 24 horas), se observó un incremento significativo en el número de CGD recientemente divididas (PCNA<sup>+</sup>) en los animales ejercitados, en línea con estudios que indican que el ejercicio promueve la proliferación celular en el hipocampo (Ferreira et al., 2011; Li et al., 2013; Van Praag et al., 1999). También se encontró un incremento en el número de CGD BrdU<sup>+</sup> con una edad aproximada de 8-10 días. No obstante, no está claro si este aumento de células BrdU<sup>+</sup> refleja un efecto adicional del ejercicio sobre la supervivencia celular, o más bien un aumento neto de la NHA como resultado de una mayor proliferación de nuevas células (Snyder, Glover, et al., 2009; Van Praag et al., 1999). En cualquier caso, nuestros resultados muestran una disminución significativa en la expresión de PCNA y BrdU 9 días después del cese del ejercicio. Este hallazgo sugiere que los efectos derivados del ejercicio sobre la proliferación/supervivencia de nuevas células hipocampales son transitorios y probablemente dependientes de la propia actividad. Aunque se ha sugerido que el ejercicio mantenido contribuye a mantener altas tasas de neurogénesis adulta (Li et al., 2013; Snyder, Glover, et al., 2009), por el momento es algo incierto ya que otros estudios han observado efectos no acumulativos (Cahill et al., 2018; Kronenberg et al., 2006) o incluso negativos (Naylor et al., 2005; Nguemeni et al., 2018) sobre la NHA tras periodos sostenidos de ejercicio aeróbico. Cabe destacar que las CGD generadas *de novo* en condiciones de ejercicio programado en cinta podrían ser proclives a la muerte tras el cese del ejercicio (Nishijima et al., 2013, 2017), algo que pone en cuestión la relevancia funcional de la NHA inducida por ejercicio de cara a futuras demandas cognitivas. De esta forma, para generar un incremento sostenido de la NHA, es posible que este tipo de protocolos de actividad física deban complementarse con una estimulación adicional, más específica a nivel hipocampal (Fabel & Kempermann, 2008; Kronenberg et al., 2006). En este sentido, se ha demostrado que las CGD que sobreviven en respuesta a la implementación de demandas cognitivas (p. ej., aprendizaje de tipo espacial) participan de forma consistente en

experiencias de aprendizaje posteriores (Gu et al., 2012; Lods et al., 2021; Trouche et al., 2009), lo cual sugiere su integración funcional en la red hipocampal local. Por tanto, la tarea de MWM empleada en nuestro estudio podría actuar promoviendo mayores beneficios a largo plazo sobre la NHA en comparación con situaciones en las que el ejercicio se aplica de manera aislada.

En general, los hallazgos de este bloque experimental apoyan la noción de que la combinación de intervenciones basadas en entrenamiento físico y cognitivo promueven beneficios sinérgicos sobre la NHA. Los estudios en modelos animales han revelado que el incremento de este fenómeno neuroplástico podría ser útil para contrarrestar el deterioro cognitivo (Codd et al., 2020; Sahay et al., 2011; Henriette Van Praag et al., 2005) o condiciones patológicas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Richetin et al., 2015), cambios del estado de ánimo (Hill et al., 2015; Mateus-Pinheiro et al., 2013) o abuso de sustancias (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). En este sentido, el desarrollo de estrategias más eficaces y duraderas para mejorar la NHA es un objetivo primordial. En este primer bloque experimental, se propone un método conductual y no invasivo para abordar esta cuestión, el cual aporta ventajas notables en tanto que no estaría asociado con posibles efectos secundarios y además presenta un gran potencial traslacional hacia la investigación y la práctica clínica en humanos. Si bien las intervenciones basadas en entrenamiento físico o cognitivo han demostrado tener efectos positivos para favorecer la función cognitiva tanto en poblaciones sanas como en personas con deterioro cognitivo (Hötting & Röder, 2013; Keshavan et al., 2014) es importante destacar que la combinación de ambas estrategias parece producir beneficios aún mayores en este sentido (Dhir et al., 2021; Karssemeijer et al., 2019; Oswald et al., 2006). Estos beneficios, además, podrían estar relacionados con cambios funcionales en las redes cerebrales implicadas en el aprendizaje espacial, incluyendo la formación hipocampal (Holzschneider et al., 2012). Por el momento, se desconoce si la NHA desempeña un papel en estos efectos sinérgicos pro-cognitivos en humanos. No obstante, los estudios en roedores sugieren que el aumento de la NHA puede subyacer a los beneficios de la combinación del entrenamiento físico y cognitivo para tratar lesiones cerebrales o trastornos neurocognitivos (Farokhi-Sisakht et al., 2019; Hamilton et al., 2014; Kapgal et al., 2016). Aunque el papel y las características de la NHA humana siguen siendo objeto de un intenso debate científico, no hay motivos para descartar que la mejora de este fenómeno pueda tener implicaciones funcionales relevantes a nivel neurobiológico, cognitivo y conductual (Kempermann et al., 2018), lo cual abre una vía de investigación interesante de cara a estudios futuros.

En definitiva, en este primer bloque experimental se describen efectos sinérgicos de la combinación secuencial de entrenamiento físico y cognitivo para incrementar la NHA en ratones. Esta aproximación novedosa se presenta como una herramienta efectiva para incrementar de manera coordinada la proliferación de los precursores neuronales, así como la supervivencia y diferenciación/maduración neuronal de dicha cohorte de nuevas células (1-2 semanas de edad). Numerosos estudios demuestran el papel relevante de la NHA en el desarrollo y mantenimiento de diversos trastornos psicopatológicos, incluyendo el abuso de sustancias, mientras que el ejercicio y el entrenamiento cognitivo han cobrado relevancia como estrategias coadyuvantes en la terapia del trastorno por uso de sustancias. A continuación, se desarrolla un segundo bloque experimental en el que se pretende comprobar si la combinación propuesta entre ejercicio y entrenamiento espacial, a través de una mejora global de la NHA, constituye una alternativa para modular la persistencia de asociaciones cocaína-contexto previamente establecidas.



# SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL

## **LA COMBINACIÓN SECUENCIAL DE EJERCICIO FÍSICO Y ENTRENAMIENTO NEUROCOGNITIVO MODULA LA EXTINCIÓN Y LA REINSTAURACIÓN DE LAS ASOCIACIONES COCAÍNA-CONTEXTO: IMPLICACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA**

Ávila-Gámiz, F., Pérez-Cano, A., Pérez-Berlanga, JM., Zambrana-Infantes, EN., Mañas-Padilla, MC., Gil-Rodríguez, S., Santín, LJ., Ladrón de Guevara-Miranda, D. Sequential physical and cognitive training disrupts cocaine-context associations via multi-level stimulation of adult hippocampal neurogenesis. (submitted)



## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de cocaína supone un grave riesgo para la sociedad y la salud pública mundial, ocasionando graves problemas a los consumidores y sus familiares (OEDT, 2022; UNODC, 2022). Una proporción significativa de consumidores de cocaína experimenta dificultades para controlar el consumo y mantener la abstinencia, lo que deriva en solicitudes de tratamiento, a menudo de forma recurrente (OEDT, 2022). Precisamente, esta búsqueda recurrente de terapia refleja las enormes dificultades que existen para gestionar las altas tasas de abandono y recaída en el consumo de cocaína. En este sentido, contrarrestar las claves contextuales que predicen la disponibilidad y los efectos de la droga es una cuestión de relevancia clínica, ya que estos estímulos ambientales desempeñan un importante papel en la aparición y el pronóstico del trastorno por consumo de sustancias al desencadenar la búsqueda e ingesta descontrolada de drogas (Kosten et al., 2006; LeCocq et al., 2020; Regier et al., 2021; Vafaie & Kober, 2022). Por lo general, los programas de tratamiento son principalmente de naturaleza psicosocial, incluyendo algunos de ellos estrategias centradas en reducir la influencia de estos factores sobre el consumo de drogas (Kampman, 2019). En concreto, la terapia de exposición a claves, basada en el fenómeno de extinción, ha demostrado un éxito clínico modesto a la hora de suprimir de forma fiable y duradera las asociaciones droga-estímulo, por lo que se siguen explorando alternativas más eficaces (Conklin & Tiffany, 2002; Martin et al., 2010). Como posibles coadyuvantes del tratamiento, las intervenciones basadas en entrenamiento físico o cognitivo han demostrado potencial para el control no solo del *craving* provocado por las claves contextuales sino también de otros fenómenos que dificultan la remisión (p. ej., deterioro cognitivo o síntomas negativos de la abstinencia; Alcorn et al., 2017; Wang et al., 2014). Cabe destacar que la combinación de ambas estrategias puede ser un complemento aún más prometedor en la terapia del trastorno por uso de sustancias, ya que este enfoque se ha relacionado con beneficios sinérgicos sobre la función cognitiva (Oswald et al., 2006; Shah et al., 2014) y la salud mental (Bo et al., 2019; Montero-Odasso et al., 2023; Nuechterlein et al., 2023) aunque por el momento se sabe muy poco acerca de los mecanismos subyacentes a estas mejoras. Precisamente, hemos demostrado que la combinación secuencial de ejercicio y entrenamiento cognitivo promueve de manera sinérgica la NHA en ratones. En este sentido, aproximaciones recientes empleando herramientas genéticas (p. ej., farmacogenética y optogenética) han revelado que la mejora de la NHA a múltiples niveles (i. e., incrementando de manera coordinada el número, la maduración y la integración funcional de nuevas CGD) optimiza la función del hipocampo (Li et al., 2022, 2023), estructura que a su vez es fundamental para la extinción (Burgdorf et al., 2017; Hitchcock & Lattal, 2018) y la reinstauración (Fuchs et al., 2005; Otis et al., 2014; Rogers & See, 2007) de las asociaciones cocaína-contexto.

Tal y como se comentó en el marco teórico de esta Tesis Doctoral, la NHA ha recibido cada vez más interés en el campo de la investigación sobre drogas dado su papel en el comportamiento motivado y en el aprendizaje asociativo (Castilla-Ortega et al., 2017). En roedores, la eliminación de CGD generadas en la adultez incrementa la vulnerabilidad a los efectos reforzantes de la cocaína (Deroche-Gamonet et al., 2018; Noonan et al., 2010) mientras que promueve la resistencia a la extinción (Noonan et al., 2010) y la reinstauración de los comportamientos condicionados a la cocaína previamente adquiridos (Deroche-Gamonet et al., 2018; Deschaux et al., 2014; Noonan et al., 2010). En contrapartida, las intervenciones típicamente pro-neurogénicas (p. ej., el ejercicio o el enriquecimiento ambiental), cuando son aplicadas durante la abstinencia a las drogas, se relacionan con una retención atenuada de las asociaciones cocaína-contexto

(Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Mustroph et al., 2016), promueven la extinción (Mustroph et al., 2011) y reducen la reinstauración de la conducta de búsqueda de la droga (Lynch et al., 2010; Solinas et al., 2008). Sin embargo, y hasta el momento, no está claro si estas nuevas células hipocampales participan (y en su caso, cómo lo hacen) en la actualización de contingencias entre los efectos de la cocaína y las claves contextuales asociadas a la droga. En apoyo a esta premisa, existe evidencia que indica que las CGD nacidas en la adultez experimentan actividad en respuesta a la exposición ante estímulos contextuales relacionados con la cocaína (Barr & Unterwald, 2015), pero se desconoce qué cohorte o cohortes celulares concretas están implicadas en este proceso. A este respecto, se sabe que la gran mayoría de nuevas CGD se somete a procesos de muerte celular programada en fases tempranas de su desarrollo, mientras que las que se encuentran en la ventana crítica de supervivencia (aproximadamente 1-2 semanas) son proclives no solo a ser rescatadas en respuesta a demandas específicas de aprendizaje (p. ej., aprendizaje espacial), sino también a ser reclutadas funcionalmente por la red local para responder ante retos cognitivos similares (Lods et al., 2021; Trouche et al., 2009). Por ello, ampliar este subconjunto de nuevas células en fase crítica constituye una alternativa de gran potencial funcional.

Considerando todo lo anterior, en este segundo bloque experimental pretendemos determinar si el incremento de la NHA a múltiples niveles (proliferación, supervivencia, diferenciación neuronal e integración funcional) facilita la extinción y previene la reinstauración de los comportamientos de búsqueda de la droga previamente establecidos. Para ello, utilizamos la aproximación conductual desarrollada y estudiada en el bloque experimental anterior, basada en la combinación secuencial de ejercicio aeróbico y entrenamiento cognitivo dependiente de hipocampo, como estrategia para expandir una subpoblación de nuevas CGD en periodo crítico que podrían ser reclutadas preferentemente durante la formación y posterior recuperación de la memoria de extinción de asociaciones cocaína-contexto.

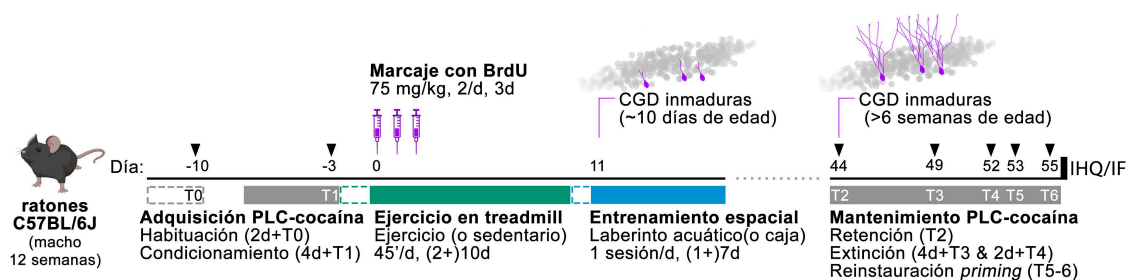
## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Animales

Para este experimento se empleó un total de 37 ratones macho C57BL/6J de 12 semanas de edad (Janvier) al comienzo de los estudios experimentales que fueron agrupados en jaulas de 3/4 animales tras un periodo de aclimatación al CECA. De manera similar a lo descrito en el bloque experimental anterior, los animales fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 8 de la mañana), en una habitación con ventilación, temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad (aproximadamente 40%) controladas y en jaulas de laboratorio estándar con material de nido, agua y comida *ad libitum*. Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo entre las 8:00 y las 15:00 y los ratones recibieron habituación a las salas de experimentación correspondientes durante al menos 30 minutos antes del comienzo de los protocolos conductuales. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en acuerdo con las regulaciones europeas (Directiva 2010/63/UE) y españolas (Real Decreto 53/2013 y Ley 32/2007) para la experimentación animal y fueron aprobados por el comité ético de experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA no. 29-2017-A) así como por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía (05/11/2018/153).

## 2.2. Diseño experimental

En la **Figura 22** se representa en forma de diagrama el diseño experimental seguido en el estudio. Tras el periodo de aclimatación al CECA, todos los animales fueron sometidos a un protocolo de adquisición de la PLC inducida por cocaína y, a continuación, recibieron intervenciones pro-neurogénicas consistentes en ejercicio programado y/o entrenamiento en MWM según lo descrito en el primer bloque experimental. Brevemente, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos que realizaron el protocolo de ejercicio aeróbico en cinta de correr (i. e., 2 días de habituación seguidos de 10 días de carrera de intensidad moderada; EJE,  $n = 18$ ) o que permanecieron en reposo en jaula dentro de la sala de comportamiento (SED,  $n = 19$ ). Nuevamente, se administraron seis dosis i.p. de BrdU (2/día, 75 mg/kg) durante las primeras tres sesiones de ejercicio en cinta, con el objetivo de marcar y posteriormente detectar un subgrupo de células en división durante las primeras fases del tratamiento. Posteriormente, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos que recibieron entrenamiento en la versión de memoria de trabajo del MWM (i. e., 1 día de habituación seguidos de 7 días de entrenamiento; SED+MWM,  $n = 10$ ; EJE+MWM,  $n = 9$ ) o mantenidos en reposo en jaula dentro de la sala de comportamiento (SED+CAJA,  $n = 9$ ; EJE+CAJA,  $n = 9$ ). Aproximadamente cuatro semanas después de la finalización de las intervenciones conductuales, todos los animales fueron de nuevo expuestos al aparato de PLC para evaluar la retención, extinción y la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto. Noventa minutos después de la realización de la última prueba de reinstauración los animales fueron sacrificados y el tejido cerebral fue recolectado para su posterior procesamiento histológico.



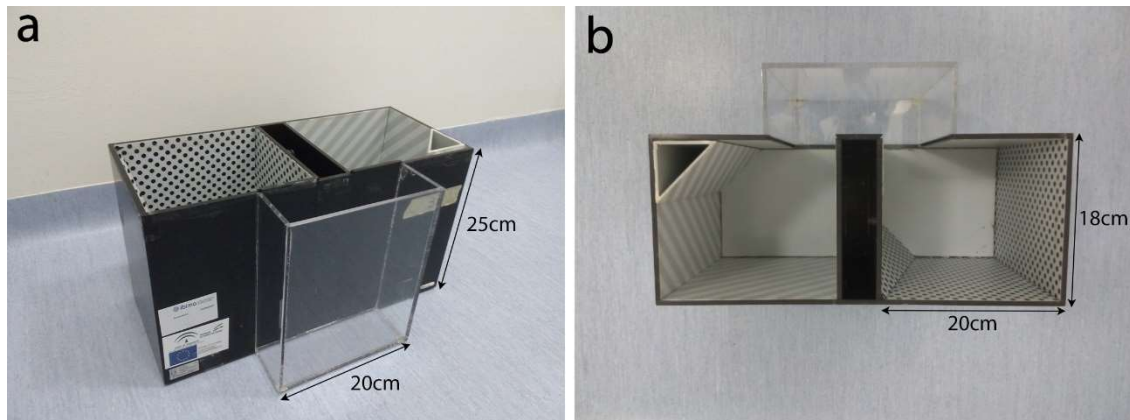
**Figura 22. Diseño experimental del segundo bloque.** Esquema del diseño experimental. Las líneas discontinuas de los tratamientos representan las sesiones de habituación. Las flechas negras indican los días test de preferencia de lugar condicionada (PLC; T0-6). Abreviaturas: BrdU, bromodeoxiuridina; CGD, células del giro dentado; d, día; IF, inmunofluorescencia; IHQ, inmunohistoquímica.

## 2.3. Intervenciones conductuales

### 2.3.1. Protocolo de preferencia de lugar condicionada

Con el objetivo de estudiar las asociaciones cocaína-contexto se utilizó el paradigma de PLC siguiendo protocolos previamente publicados por nuestro grupo de investigación y otros (Conrad et al., 2013; Itzhak & Anderson, 2012; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). Se emplearon un total de tres cajas de PLC (Panlab; **Figura 23**), cada una de ellas compuesta por dos compartimentos del mismo tamaño (20 cm ancho × 18 cm largo × 25 cm altura) que mostraban diferentes claves visoespaciales, ya sea por los motivos de las paredes (líneas grises o puntos negros) o la distribución estructural en las esquinas de cada compartimento (pirámide y/o prisma de base triangular). Los compartimentos se encontraban conectados por un pasillo rectangular transparente de plexiglás (20 cm ancho × 7 cm largo × 25 cm de altura) separado de los compartimentos mediante puertas de guillotina extraíbles. Durante todas las sesiones de PLC, los animales recibieron

habituaación a la sala de comportamiento durante al menos 30 minutos, y se utilizó un biombo para aislar visualmente el aparato de PLC del resto de animales y del experimentador.



**Figura 23. Cajas de preferencia de lugar condicionada.** a) Vista lateral de la caja de PLC con las puertas de guillotina colocadas. b) Vista superior de la caja de PLC con las puertas de guillotina retiradas. En ambas imágenes se indican las dimensiones del aparato.

El protocolo de PLC empleado incluía las siguientes fases:

1. *Pre-condicionamiento*: el objetivo de esta fase era permitir la habituación del animal al aparato y estudiar su preferencia inicial o espontánea por los compartimentos. El pre-condicionamiento se desarrolló en tres sesiones consecutivas (1/día) de 15 minutos cada una, en las que los animales recibían una inyección intraperitoneal de salino de 10ml/kg (NaCl 0,9%) justo antes de ser ubicados en el centro del pasillo de la caja de PLC con las puertas de guillotina retiradas, de forma que el ratón podía acceder libremente a ambos compartimentos. El desempeño en la última sesión de pre-condicionamiento (T0) se tomó como referencia de la preferencia basal de los animales por las distintas zonas del aparato, con base en el tiempo que permanecieron en cada uno de los compartimentos de este. En esta prueba, aquellos animales que presentaron aversión (menos del 33% del tiempo total de sesión) o preferencia incondicionada (más del 67% del tiempo total de sesión) por uno de los compartimentos fueron excluidos del experimento.
2. *Condicionamiento*: el objetivo de esta fase fue la administración contingente de la droga junto con la permanencia en uno de los compartimentos del aparato, con el objetivo de establecer una asociación droga-compartimento. El condicionamiento tuvo lugar dos días después de T0 y constó de cuatro días consecutivos con dos sesiones diarias de 30 minutos cada una. Ambas sesiones fueron separadas por al menos 4 horas y contrabalanceadas en orden diariamente para evitar artefactos relacionados con momentos concretos del día. En una de las sesiones, los animales recibieron una inyección i.p. de cocaína inmediatamente antes de ser confinados en uno de los compartimentos del aparato (compartimento condicionado o EC<sup>+</sup>). En contrapartida, en sesión salino recibieron una inyección i.p. de suero fisiológico (10 ml/kg, NaCl al 0,9%) y a continuación fueron confinados en el compartimento opuesto del aparato (compartimento neutro o EC<sup>-</sup>). La asignación de los compartimentos EC<sup>+</sup>/EC<sup>-</sup> se realizó siguiendo un procedimiento insesgado. La cocaína (Alcaliber S.A., Madrid, España; diluida en NaCl al 0,9% en un volumen de 10ml/kg) fue administrada en dosis crecientes (2 mg/kg el primer día, 4 mg/kg el segundo día, 8

mg/kg el tercer día y 16 mg/kg el cuarto día). Se optó por la administración de una dosis ascendente de la droga en lugar del protocolo convencional de administración de una dosis fija ya que este enfoque refleja de manera más fiel el patrón progresivo de consumo de drogas observado en los seres humanos.

3. *Adquisición*: para estudiar la adquisición de la PLC, un día después de la última sesión de condicionamiento se llevó a cabo una prueba de exploración libre del aparato (T1) de 15 minutos de duración. En concreto, los animales recibieron una inyección de salino e inmediatamente fueron ubicados en la zona del pasillo con las puertas de guillotina retiradas.
4. *Retención*: para estudiar el mantenimiento de la PLC después de las intervenciones de ejercicio y/o entrenamiento en MWM, aproximadamente 4 semanas después de la finalización de las mismas se llevó a cabo una prueba de exploración libre del aparato (T2) idéntica a lo descrito en T1. Un total de 4 animales no cumplieron los criterios de retención de la PLC (i. e., permanecieron más tiempo en EC<sup>-</sup> en T2), y fueron excluidos de los análisis de PLC.
5. *Extinción*: para estudiar la extinción de la PLC se llevaron a cabo sesiones de extinción forzada similares a las sesiones de condicionamiento. En primer lugar, se llevaron a cabo 4 sesiones de extinción forzada (1/día) consistentes en dos sesiones separadas por un intervalo de 4 horas. En estas sesiones, cada animal recibió inyecciones i.p. de suero fisiológico antes de ser confinados durante 30 minutos en cada uno de los comportamientos del aparato. Un día después del último ensayo de extinción forzada, se evaluó la PLC en un test (T3) idéntico a T1/T2. En los dos días siguientes, los animales fueron sometidos a sesiones adicionales de extinción forzada y posteriormente evaluados en un test de extinción tardía (T4) siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Un total de 3 animales no cumplieron con los criterios de extinción (i. e., permanecieron más tiempo en EC<sup>+</sup> en T4 en comparación con T2) siendo excluidos de los análisis relacionados con la PLC.
6. *Reinstauración*: un día después de T4, se evaluó la reinstauración de la PLC inducida por dosis de cebado (*priming*) de cocaína. Se realizaron dos pruebas de reinstauración, separadas por un intervalo de 24 horas, empleando en primer lugar una dosis subumbral de la droga (2 mg/kg; T5) y posteriormente una dosis moderada de cocaína (8 mg/kg; T6). La selección de ambas dosis se realizó tomando como referencia la dosis mínima (2 mg/kg) y promedio (8 mg/kg) con respecto a las administradas durante la fase de condicionamiento. Al principio de cada test, los ratones recibieron la dosis *priming* de la droga e inmediatamente después fueron introducidos en el pasillo del aparato con las puertas de guillotina retiradas.

Todas las sesiones de PLC fueron grabadas con una videocámara acoplada al techo de la habitación y procesadas mediante el uso del programa de análisis comportamental Ethovision XT12 (Noldus). Se registró y analizó el tiempo transcurrido por cada animal en cada compartimento (segundos). Para análisis adicionales se calculó el índice de PLC utilizando la siguiente fórmula:  $[\text{tiempo en EC}^+ - \text{tiempo en EC}^- / \text{tiempo total en compartimentos}] \times 100$ .

### 2.3.2. *Protocolos de ejercicio aeróbico programado y aprendizaje en el laberinto acuático de Morris*

Con el objetivo de fomentar de manera no invasiva la proliferación, supervivencia e integración funcional de nuevas CGD tras la adquisición de la PLC inducida por cocaína, se sometió a los animales a intervenciones consistentes en ejercicio programado (12 días) y/o entrenamiento en MWM (8 días) que se llevaron a cabo según lo descrito en el apartado de material y métodos del primer bloque experimental. Las sesiones de entrenamiento en MWM fueron grabadas, y procesadas mediante el uso del programa de análisis comportamental Ethovision XT12 (Noldus) y el rendimiento de los animales en la tarea fue evaluado mediante las medidas de latencia de escape (segundos) y distancia acumulada a la plataforma (cm).

## 2.4. **Administración de bromodeoxiuridina**

Tal y como se describió en el primer bloque experimental, se administró BrdU para marcar una cohorte de CGD generadas *de novo* durante las primeras tres sesiones de ejercicio en la cinta de correr, las cuales alcanzaron un periodo crítico de supervivencia (9-11 días de edad) coincidiendo con el comienzo del protocolo de entrenamiento en MWM. La BrdU se inyectó i.p. a razón de 2 dosis diarias (75 mg/kg) separadas por un intervalo de 6 horas.

## 2.5. **Procesamiento del tejido e Inmunohistoquímica**

Los animales fueron perfundidos 90 minutos después de la última sesión de reinstauración de la PLC. Los procedimientos de perfusión intracardiaca, corte y seriación del tejido cerebral e inmunohistoquímica biotinilada para detección de BrdU fueron realizados tal y como se describió en el apartado de material y métodos del primer bloque experimental.

### 2.5.1. *Estudios de inmunofluorescencia*

Se realizaron estudios para analizar la diferenciación neuronal de las CGD BrdU<sup>+</sup> mediante doble IF para la detección conjunta de BrdU y el marcador de neurona madura NeuN. Asimismo, con el objetivo de estudiar el nivel de activación de las CGD BrdU<sup>+</sup> durante el test de reinstauración de la PLC, se realizó una doble IF para la detección de BrdU y la proteína c-Fos. El procedimiento se realizó en secciones en flotación. Tras la desnaturalización del ADN con HCl (descrita anteriormente), las secciones fueron incubadas *overnight* a 4°C en una solución de PST que incluía los anticuerpos primarios correspondientes para la detección de BrdU y NeuN o de BrdU y c-Fos, respectivamente (**Tabla 3**). Al día siguiente, el tejido fue incubado durante 90 minutos en una solución de tampón fosfato salino que contenía los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a Alexa Fluor® (**Tabla 3**). Inmediatamente después, las secciones fueron montadas en portaobjetos y preservadas utilizando el medio de montaje Fluoromount™ (MERCK Sigma-Aldrich). En el caso de la doble inmunofluorescencia BrdU/c-Fos, antes del montaje, las secciones fueron incubadas durante 10 minutos en una solución de tampón fosfato salino que contenía la molécula de contratinción nuclear DAPI para el marcaje de todos los núcleos celulares, con el objetivo de facilitar la visualización de la morfología del GD.

**Tabla 3.** Anticuerpos y reactivos utilizados.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti-BrdU	Abcam (ab6326)	IgG, monoclonal obtenido en rata	1:500 en PST
Anti-NeuN	Abcam (ab104224)	IgG, monoclonal obtenido en ratón	1:500 en PST
Anti-c-Fos	Abcam (ab222699)	IgG, monoclonal obtenido en conejo	1:2000 en PST
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
Anti IgG de rata conjugado Alexa Fluor ® 594	Abcam (ab150160)	IgG, policlonal obtenido en cabra	1:500 en tampón fosfato
Anti IgG de ratón conjugado Alexa Fluor ® 488	Abcam (ab150105)	IgG, policlonal obtenido en burro	1:500 en tampón fosfato
Anti IgG de conejo conjugado Alexa Fluor ® 488	Abcam (ab150073)	IgG, policlonal obtenido en burro	1:500 en tampón fosfato
OTROS REACTIVOS DE DETECCIÓN	ORIGEN	TIPO	DILUCIÓN
4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI)	Sigma-Aldrich (D9542)	-	1:1000

## 2.6. Procedimientos de cuantificación celular

El número de CGD BrdU<sup>+</sup> se determinó manualmente empleando un microscopio Olympus BX41 (Olympus) con un objetivo 100X de inmersión en aceite. La cuantificación se realizó en una de cada seis secciones del GD, cubriendo todo el eje dorsoventral del GD del hipocampo (coordenadas relativas a bregma: -1,34 mm a -3,80 mm; (Paxinos & Franklin, 2001). Teniendo en cuenta la ausencia de diferencias interhemisféricas en los marcadores analizados en el primer bloque experimental, la cuantificación de la expresión de BrdU<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> se realizó aleatoriamente en el tejido del hemisferio cerebral izquierdo. El área de la CCG del GD fue calculada empleando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) a partir de imágenes de alta resolución tomadas con un objetivo de 10X aumentos en un microscopio Olympus BX53 equipado con una cámara Olympus DP73 (Olympus). Los datos se expresaron como número de CGD por área (mm<sup>2</sup>). Los niveles de co-marcaje de BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> se determinaron en ocho/nueve secciones (respectivamente) que contenían el GD usando un microscopio confocal Stellaris 8 (Leica Microsystems) con un objetivo 40X de inmersión en aceite. Los resultados se presentaron como el porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup> que expresaban al mismo tiempo NeuN o c-Fos, en cada caso. Esta cuantificación de CGD BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> se realizó con base en, al menos, el 35-40% (de media) del total de CGD BrdU<sup>+</sup> contadas por animal.

## 2.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando los paquetes Statistica 8 (StatSoft Power Solutions Inc.) e IBM SPSS 20 (IBM). La representación gráfica de la media y error estándar de la media (SEM) fue realizada con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software LLC). El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$  en todos los casos.

La existencia de diferencias entre-grupos e intra-grupos se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una/dos vías con o sin medidas repetidas, según resultase apropiado. Ante valores significativos de la prueba F se realizaron análisis de comparaciones múltiples post hoc utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan (DMRT). Para las comparaciones contra el valor 0 se emplearon pruebas t de una muestra. Asimismo, se calcularon medidas de tamaño del efecto basadas en los coeficientes  $d$  de Cohen (para contrastes entre dos medias) y  $\eta_p^2$  (para contrastes entre más de dos medias).

Similar a lo descrito en el primer bloque experimental, se llevó a cabo un ACP con rotación varimax para extraer dimensiones independientes de los datos de extinción y reinstauración de la PLC. En concreto, se incluyeron como variables las puntuaciones del índice de la PLC en T3, T5 y T6. La solución de componentes principales fue seleccionada con base a un autovalor  $\geq 1$  y se obtuvieron puntuaciones factoriales empleando el método de regresión.

Asimismo, para evaluar el papel de la NHA en la relación entre las intervenciones conductuales (ejercicio y/o MWM) y la extinción/reinstauración de la PLC se realizaron modelos de mediación moderada basados en regresión utilizando la macro PROCESS v.4.1 para SPSS (Hayes, 2013). Se implementó el modelo 14 (**Figura 24**), que tiene por objetivo comprobar si una variable (M) media la relación entre un predictor (X) y un resultado (Y) en función del nivel de una variable moderadora (W). Este modelo consta de dos submodelos que implican la regresión de M sobre X (1) y de Y sobre X, M, W y MW (**Figura 23**). Las ecuaciones de los modelos son:

$$M = i_M + aX + e_M$$

$$Y = i_Y + c'X + b_1M + b_2W + b_3MW + e_Y$$

La pendiente de regresión para X - Y refleja el efecto directo ( $c'$ ) del predictor sobre el resultado cuando M se mantiene constante. Por otro lado, la pendiente de regresión para MW - Y refleja el efecto indirecto condicional (es decir, moderado) de W sobre la relación M - Y, y si es significativa indica que la fuerza de la relación entre M e Y varía dependiendo de los niveles de W. Como se recomienda para tamaños de muestra pequeños, se utilizó el estimador de error estándar consistente en la heteroscedasticidad (Huber-White, HC0). Las variables continuas que definían los productos (M y W) fueron centradas en la media (media = 0,  $\pm 1$  DT) antes de realizar los análisis. Se aplicó un método de *bootstrap* basado en 10.000 muestras para evaluar la significancia de los efectos directos e indirectos condicionales, utilizando intervalos de confianza del 95% (IC<sub>95%</sub>). Los resultados *bootstrap* se consideraron significativos cuando el intervalo de confianza no incluía el valor 0.

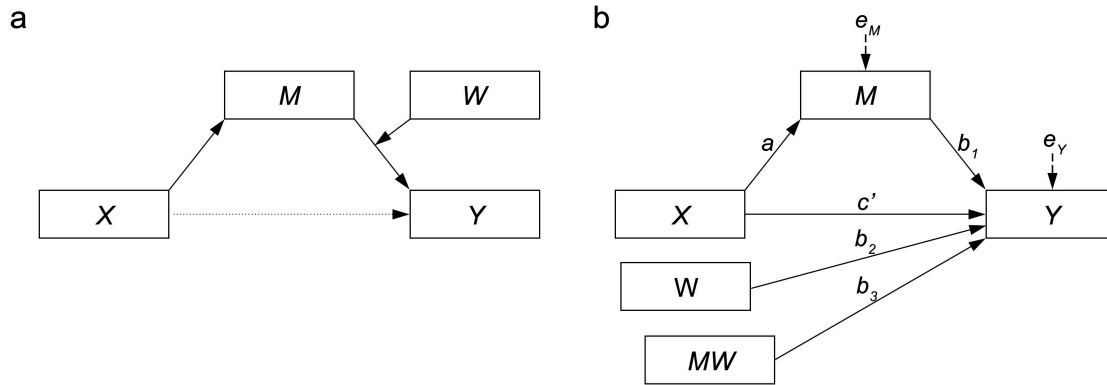
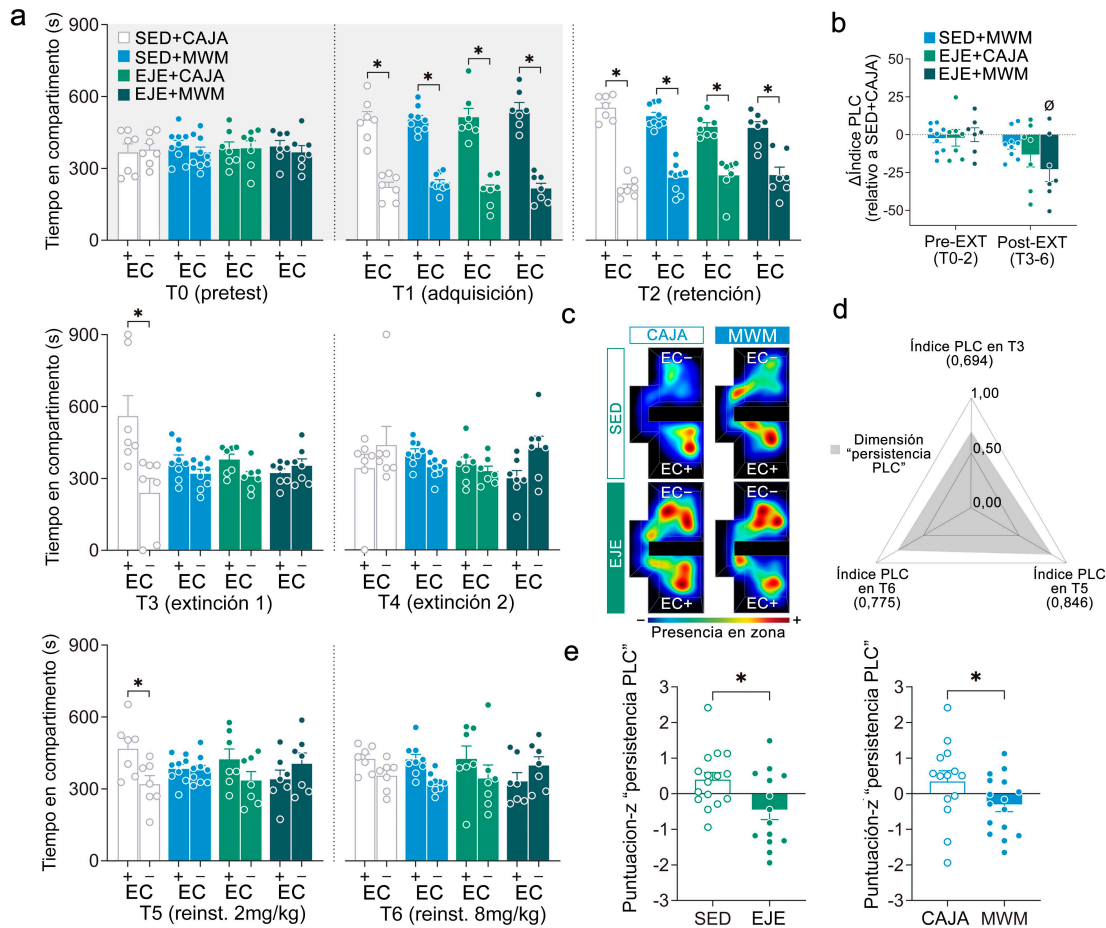


Figura 24. Diagramas conceptual (a) y estadístico (b) del modelo de mediación moderada.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efecto del ejercicio programado y el entrenamiento espacial sobre la extinción y reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto

En primer lugar, se evaluó si el ejercicio en cinta de correr y/o el entrenamiento espacial modularon la respuesta a largo plazo ante las claves espaciales asociadas con la cocaína en el modelo de la PLC. Se realizó un ANOVA factorial de medidas repetidas que arrojó un efecto significativo de interacción  $Test \times EC \times EJE \times MWM$  [ $F(6,156) = 2,21$ ,  $p = 0,045$ ,  $\eta^2_p = 0,078$ ; los análisis *post hoc* se muestran en la **Figura 25a**]. En el precondicionamiento (T0), los animales no mostraron preferencia significativa por ninguno de los compartimentos ( $p = 0,706$  a  $0,961$ ). Sin embargo, tras la fase de condicionamiento se observó una preferencia general por el EC<sup>+</sup> en T1 ( $p < 0,05$  vs. EC<sup>-</sup>), lo cual sugiere que los ratones adquirieron la PLC. A continuación, se implementaron los protocolos de ejercicio y/o entrenamiento en el MWM. No se observaron efectos sobre el recuerdo a largo plazo de la PLC aproximadamente 4 semanas después de finalizadas estas intervenciones, ya que todos los grupos retuvieron la preferencia por el EC<sup>+</sup> en T2 ( $p < 0,05$  vs. EC<sup>-</sup>), reflejando que las claves asociadas a la cocaína seguían teniendo propiedades motivacionales recompensantes. Sin embargo, sí se observó un efecto de facilitación de la extinción derivado de los tratamientos conductuales. En concreto, los ratones sometidos a ejercicio y/o al entrenamiento en MWM dejaron de mostrar preferencia por el EC<sup>+</sup> en T3 ( $p = 0,462$  a  $0,670$  vs. EC<sup>-</sup>), mientras que el grupo SED+CAJA permaneció significativamente más tiempo en este compartimento ( $p < 0,05$  vs. EC<sup>-</sup>) y requirió un 50% más de sesiones de extinción forzada para eliminar la PLC. Ningún grupo mostró PLC en T4 (EC<sup>+</sup> vs. EC<sup>-</sup>:  $p = 0,095$  a  $0,977$ ), por lo que se procedió a evaluar el fenómeno de reinstauración de la PLC. En este sentido, los datos de T5 revelaron que la dosis *priming* subumbral de cocaína (2 mg/kg) reinstauró la preferencia por el EC<sup>+</sup> en el grupo SED+CAJA ( $p < ,05$  vs EC<sup>-</sup>) pero no en los ratones que habían sido sometidos al protocolo de ejercicio en cinta de correr y/o al entrenamiento en MWM ( $p = 0,395$  a  $0,931$  vs. EC<sup>-</sup>), lo cual sugiere que los tratamientos comportamentales (combinados o aislados) redujeron la sensibilidad a los efectos reforzantes de la droga.



**Figura 25. Efectos del ejercicio programado y del entrenamiento en laberinto acuático, aislados o en combinación, sobre la persistencia a largo plazo de la preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína.** **a** Los tratamientos de ejercicio (EJE) y de entrenamiento en el laberinto acuático (MWM), aislados y en combinación aceleraron la extinción de la preferencia de lugar condicionada (PLC) y previnieron la reinstauración de dicha preferencia en respuesta a una dosis priming de cocaína (2 mg/kg). **b** En comparación con los ratones sedentarios (SED) y no entrenados en MWM, sólo los animales sometidos a los tratamientos combinados (pero no aislados) mostraron una reducción significativa en el índice de PLC tras la extinción forzada (promedio T3-T6). En el gráfico, el valor 0 representa la puntuación del índice de PLC media del grupo SED+CAJA. **c** Mapa de calor representativo de la permanencia en compartimentos durante las pruebas de extinción temprana y de reinstauración de la PLC. **d** Se extrajo un componente principal indicativo de la preferencia por el compartimento condicionado del aparato de PLC (EC<sup>+</sup>) durante los tests de extinción temprana (T3) y reinstauración (T5-T6). La escala representa valores absolutos y los números indican la carga factorial de cada variable. Valores positivos equivalen a una preferencia mayor por el EC<sup>+</sup> durante T3, T5 y T6. **e** Tanto los animales ejercitados como aquellos entrenados en el MWM mostraron puntuaciones factoriales más bajas que las condiciones de control en la dimensión "persistencia de la PLC". Los datos se representan como media ± SEM, con los puntos indicando valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencia entre datos conectados por líneas: \**p* < 0,05; diferencia vs. 0:  $\phi p$  < 0,05. Abreviaturas: EC<sup>-</sup>, estímulo neutro.

En contra de lo esperado, los resultados de la segunda prueba de reinstauración (T6) empleando una dosis moderada de *priming* de cocaína (8 mg/kg) reflejaron ausencia de PLC significativa no solo en los animales tratados, sino también en el grupo SED+CAJA (EC<sup>+</sup> vs. EC<sup>-</sup>: *p* = 0,205 a 0,887), un resultado que podría atribuirse a la interferencia causada por la exposición a ambos compartimentos bajo los efectos de la cocaína en T5. En un análisis general del rendimiento en la prueba de PLC, solo los ratones del grupo EJE+MWM mostraron una reducción global significativa del índice de PLC

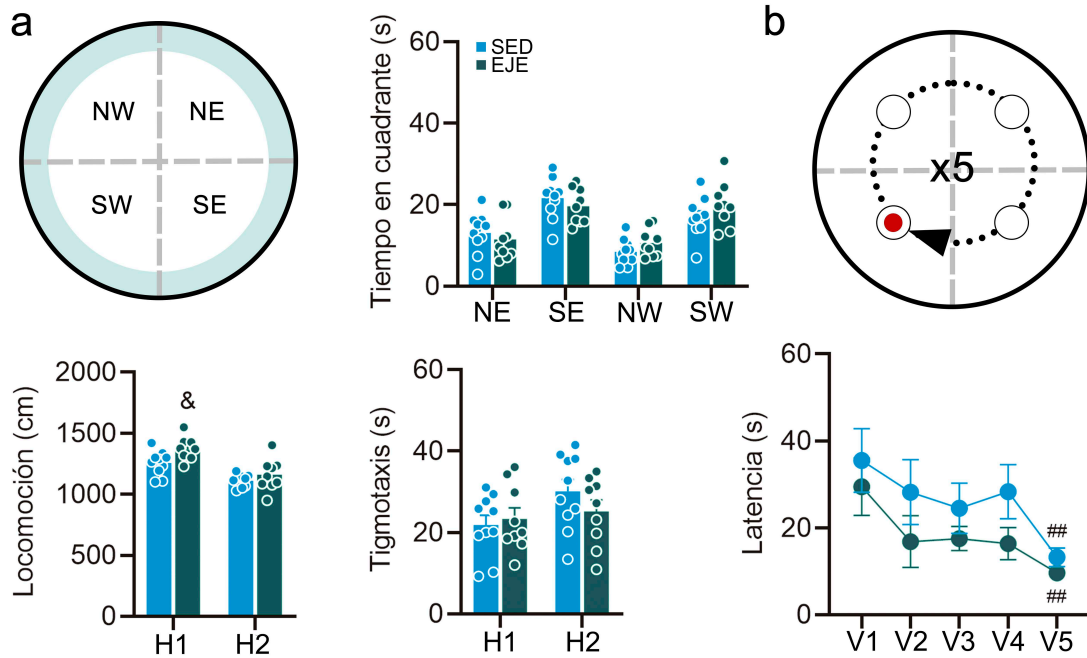
tras la extinción forzada (promedio T3-T6) con respecto al grupo SED+CAJA [prueba t para una muestra:  $t(6) = -2,466$ ,  $p = 0,049$ ], lo que indicaba un mayor beneficio derivado de la doble intervención conductual. En general, todos los tratamientos redujeron las puntuaciones del índice de PLC tras el aprendizaje de extinción en comparación con el grupo SED+CAJA ( $F_{EXT}(1,20) = 11,064$ ,  $p = 0,003$ ,  $\eta^2_p = 0,356$ ; **Figura 25b**). Sin embargo, esta disminución en la PLC solo resultó significativa en el grupo EJE+MWM [prueba t de Student para una muestra:  $t(6) = -2,466$ ,  $p = 0,049$ ; **Figura 25b**], sugiriendo un mayor efecto en la reducción de la PLC tras la intervención conductual combinada.

Para comprender exhaustivamente el efecto de los tratamientos comportamentales sobre la persistencia a largo plazo de la PLC inducida por cocaína, se llevó a cabo un ACP que incluía como variables las puntuaciones del índice de preferencia de la PLC en T3, T5 y T6. Las pruebas de adecuación muestral indicaron que los datos eran apropiados para la realización del ACP [test de Kaiser-Meyer-Olkin = 0,612; test de Barlett:  $X^2(3) = 13,207$ ,  $p = 0,004$ ]. Se observó una única dimensión que explicaba aproximadamente el 60 % de la varianza (“persistencia de la PLC”; **Figura 25b**), con puntuaciones factoriales altas indicando una preferencia global por el EC<sup>+</sup> durante la extinción temprana (T3) y la reinstauración de la PLC (T5/6). Análisis posteriores revelaron efectos principales del ejercicio [ $F_{EJE}(1,26) = 7,743$ ,  $p = 0,010$ ,  $\eta^2_p = 0,229$ ] y del entrenamiento en el MWM [ $F_{MWM}(1,26) = 4,680$ ,  $p = 0,040$ ,  $\eta^2_p = 0,153$ ] para reducir las puntuaciones factoriales de “persistencia de la PLC” (**Figura 25c**), lo cual apoya la noción de que ambos tratamientos atenuaron la respuesta a las claves contextuales de la cocaína tras el entrenamiento de extinción.

### 3.2. Aprendizaje de la tarea de entrenamiento espacial

Con el objetivo de evaluar el grado de aprendizaje durante la tarea de memoria de trabajo espacial en MWM, se analizó el rendimiento de los animales sedentarios y ejercitados durante las sesiones de entrenamiento de la prueba, con base en las medidas registradas durante el desarrollo de la tarea (latencia de escape y distancia acumulada con respecto a la plataforma).

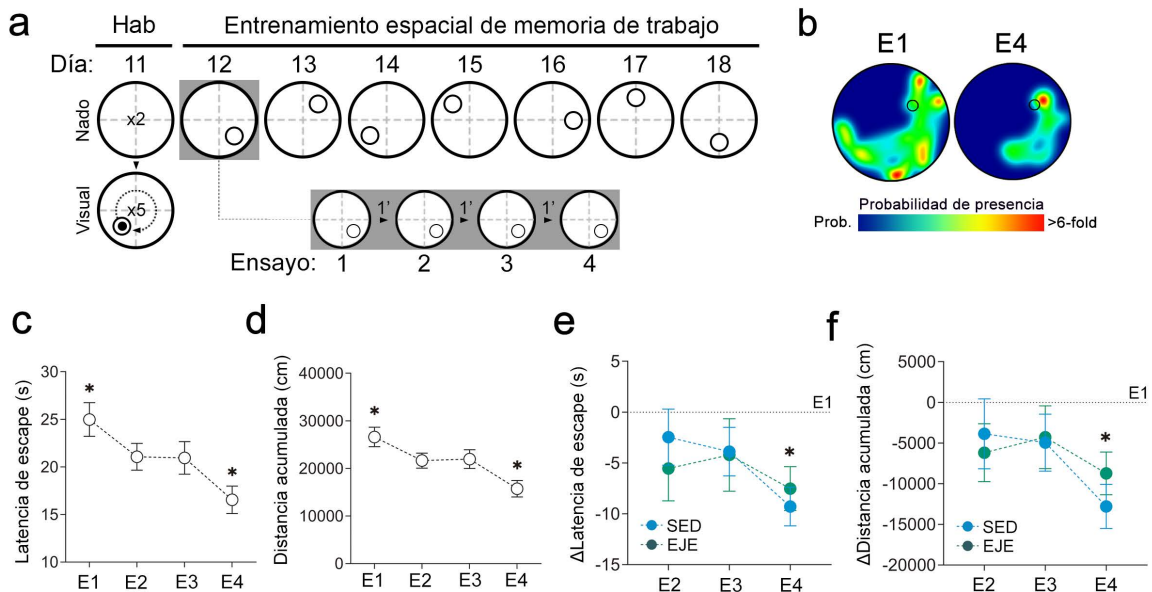
En primer lugar, se evaluó la exploración de la piscina en los ensayos de habituación y entrenamiento visual. El análisis de la conducta durante los ensayos de habituación mostró un tiempo de nado similar entre ambos grupos en cada uno de los cuadrantes virtuales en los que fue dividida la piscina (**Figura 26**). Igualmente, ambos grupos mostraron niveles de tigmotaxis (o tiempo en la zona periférica de la piscina) similares (**Figura 26**). En el caso de la distancia recorrida, los análisis mediante la prueba t de Student para muestras independientes revelaron que los animales del grupo EJE mostraron una distancia recorrida significativamente mayor durante el primer ensayo de habituación ( $t(17) = -2,505$ ,  $p = 0,022$ ,  $d = -1,091$ ), si bien esta diferencia desapareció durante el segundo ensayo ( $t(17) = -1,111$ ,  $p = 0,281$ ). Asimismo, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas para analizar el aprendizaje de las reglas de la tarea a lo largo de los cinco ensayos de entrenamiento “visual”. La prueba arrojó un efecto significativo de ensayo [ $F_{ensayo}(4, 68) = 4,3437$ ,  $p = 0,003$ ,  $\eta^2_p = 0,203$ ], y el análisis post hoc reveló que ambos grupos de animales requirieron menos tiempo para alcanzar la plataforma en el último ensayo con respecto al primer ensayo ( $p < ,05$ ), lo que indica un aprendizaje de las reglas básicas de la tarea (**Figura 26**).



**Figura 26. Sesiones de habituación y aprendizaje visual de la tarea de laberinto acuático.** a) En la figura se muestra una representación de la piscina circular, con la región periférica (en color azul) y los cuatro cuadrantes virtuales en los que fue dividida para el análisis de la conducta (NW, NE, SW, SE). Para el tiempo de nado en cada uno de los cuadrantes virtuales de la piscina se representa el promedio de las dos sesiones de habituación en la que ambos grupos realizaron una exploración similar de la piscina. b) Sesión de entrenamiento “visual”. En la figura se muestra una representación de la piscina circular y las distintas posiciones de la plataforma en cada uno de los 5 ensayos. El círculo rojo representa el objeto utilizado para aumentar la visibilidad de la plataforma. Ambos grupos alcanzaron la plataforma significativamente más rápido en el último ensayo en comparación con el primero. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencia entre V1 y V4 en el mismo grupo:  $###p < 0,01$ . Prueba de Student: diferencia entre grupos:  $^{\&}p < 0,05$ . Abreviaturas: H1-4, habituación 1-4; NE, cuadrante noreste; NW, cuadrante noroeste; SE, cuadrante sureste; SW, cuadrante suroeste; V1-4, ensayo visual 1-4.

El rendimiento en la tarea de memoria de trabajo en el MWM (**Figura 27**) fue evaluado mediante las medidas de latencia de escape de la piscina y distancia acumulada a la plataforma durante los distintos ensayos de prueba. Aunque no se encontraron efectos de interacción *ensayo*  $\times$  *grupo* en las pruebas ANOVA, se observó una disminución global del tiempo empleado en alcanzar la plataforma del ensayo 1 al ensayo 4 [ $F_{\text{ensayo}}(3,51) = 6,632, p < ,001, \eta_p^2 = 0,281$ ; **Figura 27c**], así como una reducción global de la distancia acumulada a la plataforma del ensayo 1 al ensayo 4 [ $F_{\text{ensayo}}(3,51) = 7,874, p = 0,012, \eta_p^2 = 0,317$ ; **Figura 27d**], lo que indica que los animales de ambos grupos resolvieron la tarea de forma más eficiente a medida que avanzaban los ensayos. No obstante, se observó que los animales SED mostraron una menor latencia para escapar de la piscina [ $F_{\text{grupo}}(1,17) = 8,566, p = 0,009, \eta_p^2 = 0,335$ ] y una menor distancia acumulada a la plataforma [ $F_{\text{grupo}}(1,17) = 7,874, p = 0,012, \eta_p^2 = 0,317$ ] en el cómputo global E1-4 en comparación con los ratones EJE (latencia: SED =  $18,23 \pm 1,27$  vs. EJE =  $23,61 \pm 1,33$ ; distancia acumulada: SED =  $18779,23 \pm 1406,45$  vs. EJE =  $24513,52 \pm 1482,53$ ). Sin embargo, ambas condiciones mostraron una tasa similar de cambio en la latencia para escapar [ $F_{\text{ensayo}}(2,34) = 3,698, p = 0,035, \eta_p^2 = 0,179$ ; **Figura 27e**] y la distancia acumulada a la plataforma [ $F_{\text{ensayo}}(2,34) = 5,230, p = 0,010, \eta_p^2 = 0,235$ ; **Figura 27f**] entre el ensayo 1 y el ensayo

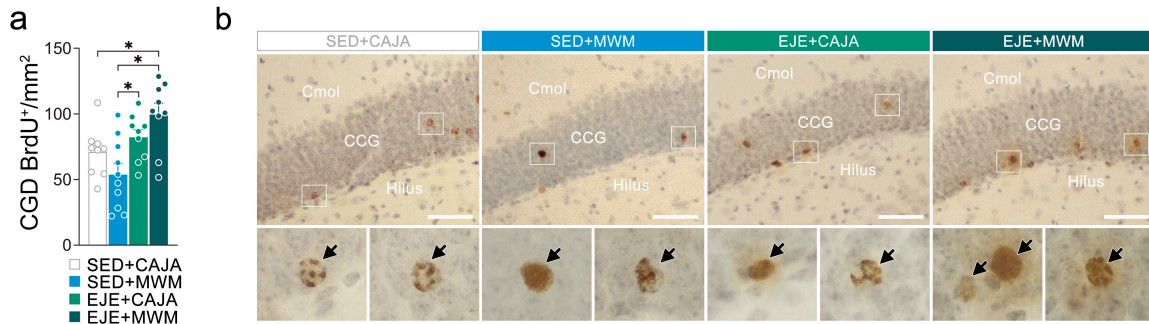
4, lo que sugiere que los ratones SED y EJE mostraron una mejora equivalente en el rendimiento de la tarea.



**Figura 27. Rendimiento de los animales entrenados en el laberinto acuático durante la fase de entrenamiento de memoria de trabajo.** a) Esquema del protocolo del laberinto acuático de Morris. b) Mapa de calor representativo de los animales sedentarios y ejercitados en E1 y E4. La escala de color representa la probabilidad de que los ratones se encuentren presentes en una localización determinada. (c-d) Tanto los animales pertenecientes a la condición sedentaria (SED) como los pertenecientes a la condición ejercicio (EJE) requirieron significativamente menos tiempo para escapar de la piscina (c) y redujeron la distancia acumulada a la plataforma (d) en el último ensayo de las sesiones de entrenamiento. Ambas condiciones mostraron una tasa similar de mejora durante la tarea, dado que la reducción significativa de la latencia para escapar (e) y la distancia acumulada a la plataforma (f) en E4 fue equivalente en los dos grupos. Comparaciones *post hoc* (DMRT): diferencia frente al resto de ensayos: \* $p < 0,05$ . Abreviaturas: E1-4, ensayo 1-4 (promediado en el periodo de entrenamiento de 7 días).

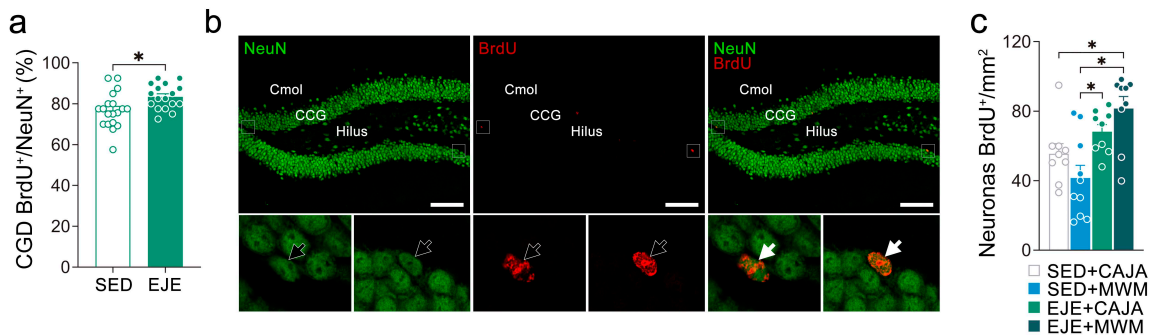
### 3.3. Efecto del ejercicio y el entrenamiento espacial sobre la neurogénesis hipocampal adulta

A continuación, se estudiaron los efectos sinérgicos del ejercicio en cinta de correr y el entrenamiento espacial para estimular la NHA. Para ello, se analizó el número y el grado de diferenciación neuronal de las nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> que se encontraban en la ventana crítica de muerte celular (9-11 días de edad) al inicio del entrenamiento en el MWM y que sobrevivieron hasta el final del experimento. Se realizó un ANOVA factorial (EJE  $\times$  MWM) que reveló que la combinación de ejercicio y entrenamiento en MWM incrementó los niveles de expresión inmunohistoquímica de BrdU [ $F_{EJE \times MWM}(1,33) = 5,269$ ,  $p = 0,028$ ,  $\eta^2_p = 0,138$ ]. Aunque las comparaciones múltiples *post hoc* no evidenciaron diferencias significativas entre las condiciones sometidas a ejercicio ( $p = 0,113$ ), solo el grupo ejercitado que recibió posteriormente entrenamiento en MWM mostró una mayor cantidad de nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> en comparación con el grupo SED+CAJA ( $p < 0,05$  vs. EJE+MWM;  $p = 0,300$  vs. EJE+CAJA). Por su parte, el entrenamiento individual en MWM promovió niveles de NHA similares a los observados en condiciones basales ( $p = 0,116$  vs. SED+CAJA) e inferiores a los derivados del protocolo de ejercicio ( $p < 0,05$  vs. grupos EJE, **Figura 28a,b**). En términos generales, estos resultados son consistentes con los descritos en el primer bloque experimental, indicando que la combinación de ambos tratamientos incrementa la NHA a largo plazo en mayor medida que cada tratamiento por separado.



**Figura 28. Efectos del ejercicio programado y del entrenamiento en laberinto acuático, aislados o en combinación, sobre la neurogénesis hipocampal adulta.** **a)** La combinación del tratamiento de ejercicio (EJE) y el entrenamiento en laberinto acuático (MWM) incrementó la expresión de nuevas células del giro dentado (CGD) BrdU<sup>+</sup>. **b)** Imágenes representativas de la inmunotinción con BrdU en cada uno de los grupos experimentales. Los ejemplos de marcaje celular se indican con flechas negras. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM y los puntos indican valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencias entre variables conectadas por líneas: \* $p < 0,05$ . Abreviaturas: CCG, capa celular granular; Cmol, capa molecular; SED, sedentario.

Asimismo, y con el objetivo de analizar el efecto de los tratamientos sobre la diferenciación neuronal, se realizó un ANOVA de dos vías sobre los niveles de co-expresión de los marcadores BrdU y NeuN. El análisis reveló un efecto simple significativo del protocolo de carrera en cinta [ $F_{EJE}(1,33) = 6,113, p = 0,019, \eta^2_p = 0,156$ ], de forma que los grupos EJE mostraron un mayor porcentaje de comarca BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> en comparación con las condiciones SED ( $p < 0,05$ ; **Figura 29a,b**).



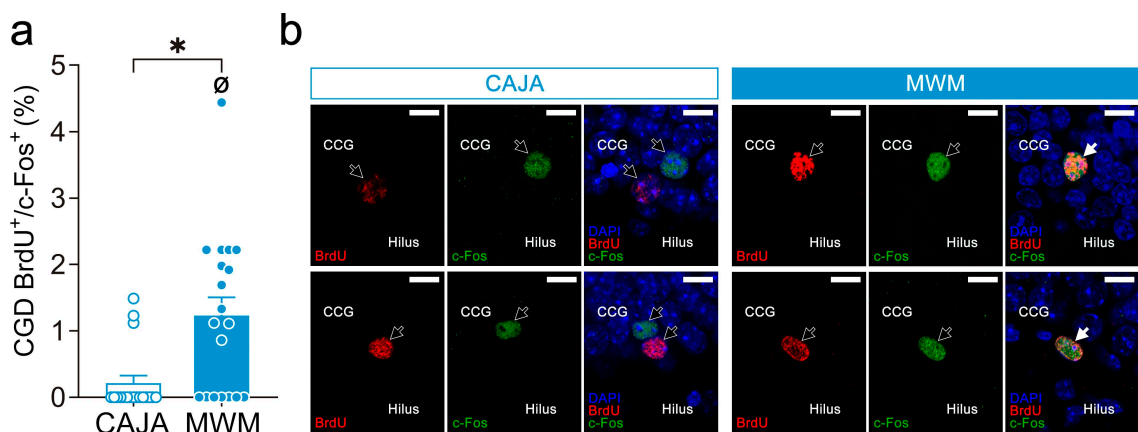
**Figura 29. Efectos del ejercicio programado y del entrenamiento en laberinto acuático, aislados o en combinación, sobre la diferenciación neuronal de nuevas células del giro dentado adulto.** **a)** El ejercicio aeróbico (EJE) promovió la diferenciación neuronal de las células del giro dentado (CGD) marcadas con bromodeoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>). **b)** Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia de BrdU y proteína nuclear neuronal NeuN. Los ejemplos de marcaje positivo (canales NeuN y BrdU) y comarcaje (canales fusionados) se indican con flechas negras y blancas, respectivamente. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m. **c)** La combinación del ejercicio y el entrenamiento MWM incrementó la cantidad (estimada) de neuronas BrdU<sup>+</sup> en el giro dentado en comparación con el grupo SED+CAJA. Los datos se representan como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencia entre datos conectados por líneas: \* $p < 0,05$ ; diferencia entre los grupos sedentarios (SED) y EJE:  $^{\S}p > 0,05$ . Abreviaturas: CCG, capa celular granular; Cmol, capa molecular.

Considerando conjuntamente el número de CGD BrdU<sup>+</sup> y el porcentaje de diferenciación neuronal de esta población de células en los distintos grupos, se estimó el número de CGD BrdU<sup>+</sup> con fenotipo neuronal. Sobre esta medida estimada, se aplicó un ANOVA de dos vías que mostró un efecto de interacción significativo [ $F_{EJE \times MWM}(1,33) =$

4,709,  $p = 0,037$ ,  $\eta^2_p = 0,125$ ]. De nuevo, los análisis *post hoc* no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos sometidos al ejercicio ( $p = 0,144$ ), pero solo la adición posterior de entrenamiento en MWM incrementó la población de nuevas CGD en comparación con el grupo SED+CAJA ( $p < 0,05$  vs EJE+MWM;  $p = 0,161$  vs EJE+CAJA), mientras que los ratones SED+MWM no mostraron diferencias con respecto al grupo SED+CAJA ( $p = 0,125$ ) y además presentaron menos neuronas BrdU<sup>+</sup> del GD en comparación con las condiciones EJE ( $p < 0,05$ ; **Figura 29c**).

### 3.4. Efecto del entrenamiento espacial sobre la integración funcional de las nuevas células en el giro dentado

A continuación, se determinó si los tratamientos conductuales promovían la integración funcional de las nuevas CGD durante etapas posteriores de la tarea de PLC. Para ello, se analizó la expresión del gen de expresión inmediata *c-fos* en la cohorte de células marcadas con BrdU, como método ampliamente utilizado para determinar la actividad neuronal (Guzowski et al., 2005). El ANOVA de dos vías (EJE  $\times$  MWM) reveló un efecto simple significativo del entrenamiento en MWM para promover la actividad de las CGD BrdU<sup>+</sup> durante la última prueba de reinstauración de la PLC [ $F_{\text{MWM}}(1,33) = 11,749$ ,  $p = 0,002$ ,  $\eta^2_p = 0,263$ ], en ausencia de efectos del ejercicio o de interacción. Los resultados demostraban que el porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup> fue significativamente mayor en los animales que recibieron entrenamiento en el MWM en comparación con aquellos que fueron mantenidos en reposo en jaula ( $p < 0,05$ ; **Figura 30a,b**). Además, se realizó una prueba *t* de student para una muestra que indicó que el porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup>/*c-Fos*<sup>+</sup> del grupo MWM era significativamente distinto de 0 [ $t(18) = 0,789$ ,  $p < 0,001$ ], mientras que en las condiciones control se observó un nivel de comarca marginal o nulo [ $t(17) = 0,177$ ,  $p = 0,083$ ; **Figura 30a,b**].

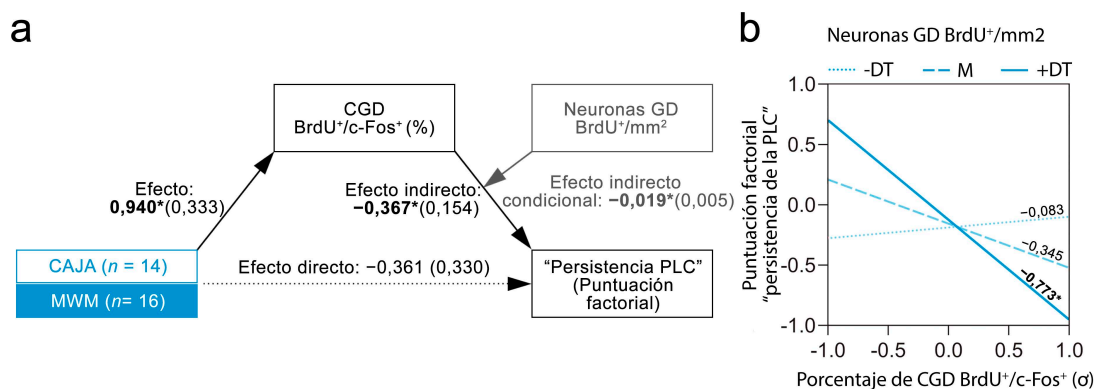


**Figura 30. Efecto del entrenamiento cognitivo sobre la integración funcional de nuevas células del giro dentado adulto durante el procesamiento de asociaciones cocaína-contexto.** **a)** Los grupos experimentales entrenados en el laberinto acuático (MWM) mostraron más células del giro dentado (CGD) positivas para bromodesoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>) y activas (i. e., *c-Fos*<sup>+</sup>) durante el último test de reinstauración de la PLC, en comparación con los animales no entrenados. **b)** Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia BrdU/*c-Fos* en los grupos CAJA y MWM. Los ejemplos de marcaje positivo (canales BrdU y *c-Fos*) y co-marcaje (canales fusionados) se indican con flechas negras y blancas, respectivamente. Las barras de escala representan 10  $\mu\text{m}$ . Los datos se representan como media  $\pm$  SEM, con los puntos indicando valores individuales. Prueba *t* de una muestra: diferencia vs. 0:  $\emptyset p < 0,05$ . Comparaciones múltiples *post hoc* (DMRT): diferencias entre datos conectados por líneas:  $*p < 0,05$ . Abreviaturas: CCG, capa celular granular.

### 3.5. Efecto mediador de la generación e integración funcional de nuevas células del giro dentado adulto sobre la persistencia a largo plazo de una preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína

Considerando los resultados previos, se estableció la hipótesis de que la integración funcional de las nuevas CGD podría ser responsable de los beneficios del entrenamiento espacial (pero no del ejercicio) para reducir la persistencia a largo plazo de la PLC. Más aún, se especuló que este efecto dependería del tamaño de la población de nuevas CGD reclutables. Para evaluar esta hipótesis, se recurrió a modelos de mediación moderada, los cuales pueden proporcionar información relevante acerca de la relación entre la NHA y el comportamiento (Lazic, 2012; Lazic et al., 2014). El porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> se incorporó al modelo como variable mediadora de la relación entre la condición experimental (CAJA vs. MWM o SED vs. EJE; variables predictoras) y las puntuaciones factoriales en la dimensión de “persistencia de la PLC” (variable resultado). El número (estimado) de neuronas del GD BrdU<sup>+</sup> fue incluido como potencial variable moderadora.

En un primer modelo se incluyó la condición de entrenamiento en el MWM (CAJA vs. MWM) como variable predictora y se observó un efecto de mediación moderada (índice: -0,018, CI<sub>95%</sub> [-0,040, -0,001]). Tal y como se muestra en la **Figura 31a**, el entrenamiento en el MWM se asoció positivamente con el porcentaje de CGD BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> ( $p = 0,009$ ), el cual a su vez mostraba una asociación inversa pero significativa con las puntuaciones factoriales en “persistencia de la PLC” ( $p = 0,026$ ), indicando un efecto global de mediación. Sin embargo, este efecto indirecto era dependiente del número de neuronas del GD BrdU<sup>+</sup> ( $p = 0,002$ ), siendo significativamente más fuerte cuando la población de CGD BrdU<sup>+</sup> se encontraba en niveles altos (+1 DT; IC<sub>95%</sub> [-1,777, -0,025]; **Figura 31b**).



**Figura 31. Mediación moderada de la adición y el reclutamiento funcional de las nuevas células del giro dentado en la relación entre el entrenamiento cognitivo y la persistencia a largo plazo de las asociaciones cocaína-contexto. (a,b).** Los efectos del entrenamiento en laberinto acuático (MWM) sobre la persistencia de la preferencia de lugar condicionada (PLC) fueron mediados por la actividad, dependiente de la experiencia, de las nuevas células del giro dentado (CGD) positivas para bromodesoxiuridina (BrdU<sup>+</sup>). Esta mediación resultó significativamente más potente cuando el número de neuronas BrdU<sup>+</sup> disponibles estaba por encima de la media. Los valores en **(a)** y **(b)** representan coeficientes de regresión y estimaciones *bootstrap* para los efectos indirectos condicionales, respectivamente. Nótese que los datos en **(b)** se encuentran centrados en la media. \*Datos significativos a  $p < 0,05$  y/o IC<sub>95%</sub> no incluyendo el valor cero. Abreviaturas: DT, desviación típica; M, media.

Dado que no se encontró un efecto directo (i. e., independiente de la variable mediadora) de la condición experimental sobre el nivel de “persistencia de la PLC” (**Figura 31a**), estos resultados sugieren que la integración funcional de CGD BrdU<sup>+</sup> constituía un mecanismo relevante para explicar los beneficios del entrenamiento en MWM sobre reducción de la PLC después del aprendizaje de extinción, especialmente cuando había más CGD nuevas disponibles.

Alternativamente, se testó un segundo modelo que incluía el ejercicio como variable predictora (SED vs. EJE). No se observó asociación significativa entre la condición experimental y la cantidad de CGD BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> ( $p = 0,973$ ) ni indicios de mediación moderada (índice: 0,000, IC<sub>95%</sub> [-0,011, 0,016]). Sí se encontró un efecto directo significativo del ejercicio para reducir las puntuaciones en la dimensión de “persistencia de la PLC” ( $p = 0,010$ , IC<sub>95%</sub> [-1,863, -0,286]). En conjunto, estos resultados sugieren que el ejercicio moduló la extinción y la reinstauración de la PLC a través de mecanismos independientes de la NHA.

## 4. DISCUSIÓN

Las claves contextuales asociadas con los efectos gratificantes de las drogas son una fuente potente y duradera de *craving* que a menudo desencadena la recaída (Kosten et al., 2006; LeCocq et al., 2020; Regier et al., 2021; Vafaie & Kober, 2022). Hasta el momento, contrarrestar la sensibilidad del individuo ante estos estímulos condicionados sigue siendo un desafío importante tanto en la práctica clínica como en el ámbito de la investigación (Conklin & Tiffany, 2002). En este bloque experimental se profundiza en el potencial de combinar el entrenamiento físico y cognitivo para debilitar las asociaciones cocaína-contexto en un modelo de PLC, poniendo el énfasis en el papel funcional de la NHA. Como hallazgos más relevantes, la aplicación secuenciada de entrenamiento físico y cognitivo aceleró la extinción y previno la reinstauración de la PLC inducida por cocaína en mayor medida que cada tratamiento por separado. Asimismo, esta intervención combinada aumentó significativamente la cantidad de un subconjunto de nuevas CGD cuyo papel podría ser funcionalmente relevante para explicar los efectos beneficiosos del entrenamiento en MWM, pero no del ejercicio, en la reducción de la persistencia de conductas relacionadas con la cocaína. En conjunto, los resultados obtenidos destacan el interés de incorporar el ejercicio y la estimulación cognitiva dentro de terapias integrales contra el trastorno por uso de sustancias, constituyendo un adyuvante prometedor para prevenir las recaídas en el consumo.

Como se ha demostrado en estudios previos, la combinación de entrenamiento físico y mental puede resultar beneficiosa para tratar el deterioro neurocognitivo (Bo et al., 2019; Nuechterlein et al., 2023). Sin embargo, aún se desconoce si los efectos positivos de esta aproximación son de algún modo trasladables al tratamiento del deterioro funcional relacionado con las drogas. En este sentido, los datos recopilados en este bloque experimental demuestran que los ratones sometidos a ejercicio seguido de entrenamiento complejo en MWM extinguían la PLC inducida por cocaína un 50% más rápido que los animales no entrenados, y además mostraban resistencia a la reinstauración de la PLC inducida por un *priming* de la droga. Aunque la aplicación individual de estos tratamientos conductuales generó resultados similares, sólo los animales sometidos a la intervención combinada mostraron una disminución global significativa de la PLC tras el aprendizaje de extinción (tomando como referencia a los animales no tratados). Así, esto podría sugerir mayores beneficios del enfoque combinado para promover

respuestas adaptativas ante las señales contextuales de la cocaína. A pesar de que la evidencia en roedores es aún preliminar, otros estudios indican que este tipo de estrategias multimodales presentan efectos adicionales o sinérgicos a la hora de revertir los déficits funcionales inducidos por daño cerebral (Kapgal et al., 2016), enfermedades neurodegenerativas (Saheb et al., 2023) y también por drogas de abuso (Hamilton et al., 2012;2014). Asimismo, estos estudios describen cambios concurrentes en la NHA que podrían constituir un potencial mecanismo explicativo. Precisamente, en el primer bloque experimental de esta Tesis Doctoral se observó que la combinación de ejercicio programado y entrenamiento complejo en MWM producía un incremento sinérgico de la proliferación y/o supervivencia y la diferenciación/maduración neuronal de nuevas CGD. En consecuencia, en este segundo bloque experimental se pretendía estudiar si este aumento coordinado o multinivel de la NHA promovía la extinción eficaz y persistente de las asociaciones cocaína-contexto en el modelo de PLC.

Mediante la detección con BrdU se estudió a un subconjunto de CGD que se encontraban en fase de división al comienzo del protocolo de ejercicio y que alcanzaron una ventana crítica de supervivencia durante el entrenamiento en el MWM. Los resultados indicaron que la combinación de ambas estrategias incrementó el número de CGD BrdU<sup>+</sup> en un 20-50% en comparación con el resto de las condiciones, al tiempo que promovió la diferenciación de estas células en neuronas maduras (NeuN<sup>+</sup>), presumiblemente integradas de forma estable en el GD. Además, cabe destacar que esta población de CGD recibió estimulación apropiada (i. e., aprendizaje espacial) durante el periodo sensible de supervivencia (i. e., 9-11 días de edad). En estas condiciones, las nuevas CGD podrían establecerse como nodos computacionales dentro de la red hipocámpal local, con capacidad para participar en el procesamiento de futuros retos cognitivos de naturaleza similar (Lods et al., 2021; Trouche et al., 2009; Veyrac et al., 2013). En apoyo a esta idea, los resultados indicaban que el entrenamiento espacial en MWM, pero no el ejercicio o el reposo en jaula, incrementó la expresión de la proteína c-Fos (indicativa de actividad neuronal) en las nuevas CGD BrdU<sup>+</sup> durante el test de reinstauración de la PLC. Es por tanto posible que el entrenamiento espacial promoviese la supervivencia y posterior integración funcional de un subgrupo de CGD inmaduras que, posteriormente, participaron en la actualización de contingencias entre estímulos en otra tarea (i. e., PLC) en la que los animales encontraban señales visoespaciales que determinaban la toma de decisiones y, por ende, su conducta. De hecho, los análisis revelaron que la actividad de las CGD BrdU<sup>+</sup> medió el efecto del entrenamiento en MWM (pero no el del ejercicio) para disminuir la persistencia de la PLC, especialmente cuando la cantidad de estas nuevas células era superior a la media. En otras palabras, en circunstancias de mayor disponibilidad de CGD supervivientes y reclutables, los efectos del entrenamiento espacial para suprimir la PLC se maximizaron. Precisamente, la combinación de ejercicio y MWM, en contraste con el entrenamiento espacial aislado, incrementó la reserva de CGD BrdU<sup>+</sup> y al mismo tiempo redujo globalmente la PLC tras el aprendizaje de extinción cuando se tomaba como referencia al grupo de animales sedentarios. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que el aumento de la NHA a múltiples niveles optimiza el rendimiento en tareas dependientes de hipocampo (Li et al., 2022, 2023). Hasta la fecha, la información sobre el impacto del entrenamiento cognitivo sobre la extinción y reinstauración de la PLC es escasa e inconsistente, de forma que el entrenamiento cognitivo parece facilitar la extinción de la búsqueda de drogas (Baratta et al., 2015) pero no previene la recaída inducida por el contexto (Bechard et al., 2018). Según nuestros resultados, la aplicación de ejercicio físico como paso previo al entrenamiento cognitivo podría promover la generación, supervivencia y reclutamiento de CGD, “desbloqueando” así el potencial del entrenamiento cognitivo para interrumpir de manera duradera las asociaciones entre los efectos de la cocaína y los estímulos ambientales.

Podrían plantearse varias hipótesis para explicar cómo esta pequeña (aunque significativa) proporción de nuevas CGD contribuyó a la reducción de la persistencia de la PLC en los animales entrenados en MWM. Una posibilidad es que la incorporación de estas células eliminase el trazo de memoria original a través de procesos de competición sináptica que se producirían a medida que se integran en la arquitectura del GD (Akers et al., 2014; Gao et al., 2018). Como resultado, se reduciría la interferencia proactiva provocada por recuerdos retrógrados conflictivos, cuyo contenido se solapaba con el de las nuevas asociaciones establecidas durante el aprendizaje de extinción (Epp et al., 2016). Sin embargo, los datos de este bloque experimental revelaron una retención significativa de la PLC aproximadamente 4 semanas después del cese del ejercicio y/o del entrenamiento en MWM, por lo que el "olvido" parece una explicación poco probable. Un escenario alternativo es que la memoria de extinción se fortaleció a través de una mejora de los procesos de reconsolidación que se relacionan críticamente con la función de las CGD inmaduras (Lods et al., 2021). Contrariamente a esta idea, los animales fueron sometidos a ensayos de recuerdo de larga duración tras el condicionamiento (15-30 minutos) que presumiblemente ponen en marcha mecanismos de extinción y no de reconsolidación (Suzuki et al., 2004). Otra posible explicación se encuentra relacionada con la capacidad de las nuevas CGD para promover la codificación flexible de los cambios en las contingencias que se producen en contextos que, por lo demás, son estables (Fölsz et al., 2023), lo que se podría aplicar a la extinción si es considerada como el aprendizaje de nuevas contingencias entre estímulos (Bouton, 2004). Varios estudios demuestran que el incremento de la NHA favorece la flexibilidad cognitiva en paradigmas de aprendizaje de inversión (Berdugo-Vega et al., 2021; Garthe et al., 2016). En principio, esto ocurriría porque las nuevas CGD (cuando alcanzan una maduración funcional) tienen capacidad para modificar la circuitería GD-CA3, promoviendo una mayor dispersión de las representaciones neurales y, como resultado, una codificación precisa de distintos recuerdos (Berdugo-Vega et al., 2021; McHugh et al., 2022). Según esto, en el estudio presentado en este bloque experimental, la incorporación funcional de CGD BrdU<sup>+</sup> contribuiría a mejorar la organización estructural de redes neuronales que codificaban información conflictiva relacionada con un mismo entorno contextual, minimizando así la interferencia proactiva entre estas representaciones neurales (Berdugo-Vega et al., 2021). Como resultado, esto habría dado lugar a una recuperación más eficaz y duradera de comportamientos adaptados a las condiciones ambientales que se establecieron durante el aprendizaje de extinción. En cualquier caso, y con independencia de cual fuera el mecanismo explicativo, los datos obtenidos en este bloque experimental apoyan un papel significativo de las nuevas CGD en el complejo sustrato neural que subyace a la extinción de la búsqueda de drogas y que abarca no sólo mecanismos hipocámpales, sino también prefrontales, estriatales y límbicos (Cleva & Gass, 2010). Partiendo de esta base, en futuros estudios se podrá hacer uso de técnicas más avanzadas, basadas en herramientas genéticas (Lods et al., 2021) y/o de imagen (Danielson et al., 2016), para determinar la contribución causal de estas células en la regulación del comportamiento relacionado con la cocaína.

Los hallazgos de este bloque experimental suponen un avance con respecto a estudios previos que versan sobre esta temática, al sugerir que la mejora de la NHA influye de manera activa en la regulación del procesamiento de las claves contextuales asociadas a la cocaína. Tradicionalmente, la investigación en este ámbito se ha centrado en describir los efectos conductuales derivados de la aplicación de estrategias pro-neurogénicas tras la exposición a la droga. A este respecto, las condiciones que se sabe que promueven la NHA de forma inespecífica, ya sean de naturaleza farmacológica (Baker et al., 2001; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019) o conductual (p. ej., ejercicio, enriquecimiento ambiental; Ewing & Ranaldi, 2018; Lynch et al., 2010; Mustroph et al., 2016;

Solinas et al., 2008) son concomitantes con un menor mantenimiento y/o reinstauración de la búsqueda de cocaína en roedores. No obstante, los estudios no permiten descartar la influencia de efectos inespecíficos de los tratamientos como mecanismo explicativo de una menor respuesta ante las claves asociadas a drogas (Mustroph et al., 2015), por lo que es difícil esclarecer la contribución funcional de las CGD nacidas en la adultez. Precisamente, los datos de este bloque experimental indican que el ejercicio por sí mismo fue capaz de disminuir la persistencia de la PLC sin que existiese un papel relevante de las CGD BrdU<sup>+</sup>, aunque es posible que otras cohortes de nuevas células sí desempeñasen funciones importantes. Debido a las múltiples respuestas fisiológicas desencadenadas por la actividad física (Gao et al., 2023), resulta complicado establecer conclusiones definitivas. No obstante, y, en cualquier caso, el ejercicio aeróbico genera un microambiente propicio para la NHA, que podría favorecer sinergias con el entrenamiento cognitivo. Por ejemplo, el ejercicio promueve la división de células troncales neurales (Dong et al., 2019; Lugert et al., 2010) y células progenitoras neurales (Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2008), favorece la maduración de las nuevas neuronas del GD según nuestros propios datos y los recogidos en otros trabajos (Piatti et al., 2011) y promueve la liberación de factores de crecimiento (p. ej., BDNF, VEGF entre otros; (Lou et al., 2008; Marlatt et al., 2012) que son fundamentales para el desarrollo de las nuevas células hipocampales. En conjunto, estas condiciones pueden resultar en una mayor disponibilidad de nuevas CGD, capaces de sobrevivir y de participar funcionalmente en futuras demandas cognitivas (Fabel et al., 2009; Shors, 2014). Con base en los datos obtenidos en este bloque experimental, esta mejora sinérgica de la NHA podría amplificar la eficacia tanto del ejercicio como del entrenamiento cognitivo a la hora de hacer frente a conductas desadaptativas como las relacionados con la búsqueda y consumo de cocaína.

Con el reciente debate y auge experimental en el ámbito de estudio de la NHA, se está avanzando en la comprensión de este fenómeno en el cerebro humano (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019; Terreros-Roncal et al., 2021). Más allá de las importantes cuestiones que quedan por resolver, las CGD nacidas en la adultez siguen siendo una fuente de interés debido a su potencial contribución a la cognición humana a lo largo de la vida (Kempermann et al., 2018). Hasta el momento, la evidencia acumulada en modelos animales sugiere que la reducción de la NHA favorecería los trastornos relacionados con la cocaína, mientras que el fomento de fenómenos neurogénicos podría ayudar a desarrollar terapias eficaces en este ámbito (Castilla-Ortega et al., 2017). Por otro lado, los estudios con roedores revelan que el ejercicio aeróbico (Kronenberg et al., 2006; Van Praag et al., 1999) y también la participación en desafíos cognitivos (Gould et al., 1999; Trouche et al., 2009; Veyrac et al., 2013), estimulan procesos de NHA diferentes y complementarios. En la práctica clínica, el entrenamiento cognitivo parece resultar útil para revertir déficits cognitivos asociados al consumo de drogas (Caetano et al., 2021), los cuales se relacionan con un peor pronóstico clínico y mayor riesgo de recaídas (Verdejo-García et al., 2019). Asimismo, la actividad física promueve mejoras cognitivas (Hötting & Röder, 2013) además de una mayor resiliencia al estrés (Childs & de Wit, 2014; Rimmele et al., 2009) y mejoras en la regulación del estado de ánimo (Hearing et al., 2016) que también podrían favorecer el tratamiento del abuso de sustancias (Darharaj et al., 2023; Sinha, 2008). Sin embargo, la investigación sobre este tema es escasa y heterogénea, y la capacidad real del entrenamiento físico (Zschucke et al., 2012) o cognitivo (Nardo et al., 2022) para facilitar la abstinencia a largo plazo sigue siendo incierta. En paralelo a los resultados observados mediante el uso de aproximaciones invasivas (Li et al., 2022), este trabajo aporta conocimiento sobre las ventajas de integrar estrategias eminentemente inocuas y de un mayor carácter traslacional (i. e., ejercicio y estimulación cognitiva) para promover sinérgicamente la NHA y la función

hipocámpal y, como consecuencia, favorecer patrones de conducta más saludables en presencia de señales contextuales relacionadas con la cocaína.



# CONCLUSIONES



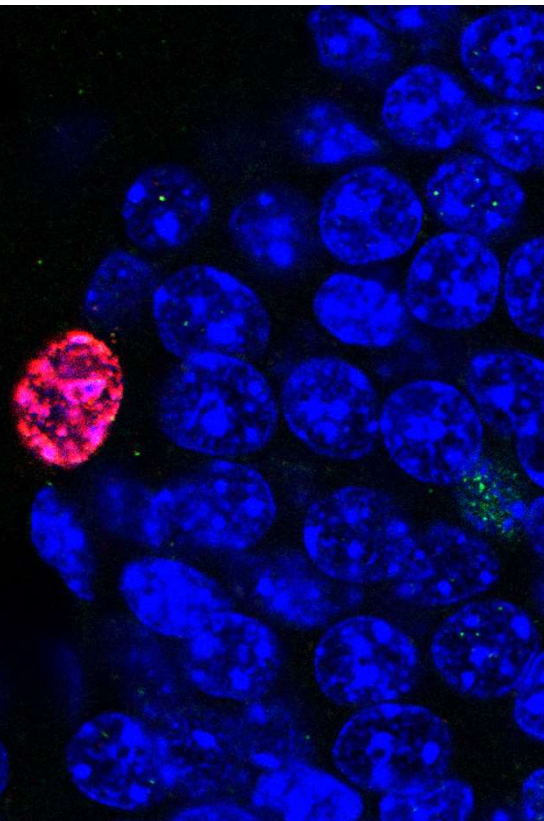
## CONCLUSIONES

---

- 1.** La aplicación de un protocolo de ejercicio programado breve incrementa a corto plazo el número de nuevas células en el giro dentado del hipocampo adulto, así como su diferenciación y/o maduración neuronal.
- 2.** La combinación secuencial de ejercicio programado y entrenamiento espacial promueve un incremento coordinado de la proliferación, supervivencia, diferenciación y/o maduración de nuevas células en el giro dentado del hipocampo adulto.
- 3.** La aplicación de protocolos breves de ejercicio programado y de entrenamiento espacial facilita la extinción y reduce la reinstauración de las asociaciones cocaína-contexto en el modelo de preferencia de lugar condicionada, observándose mayores beneficios derivados de la combinación secuencial de ambas intervenciones.
- 4.** El entrenamiento en la tarea de memoria espacial, pero no el ejercicio programado, promueve la integración funcional de nuevas células en el giro dentado adulto durante la reinstauración de una preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína.
- 5.** La integración funcional de nuevas células en el giro dentado adulto media el efecto del entrenamiento en la tarea de memoria espacial para reducir la persistencia a largo plazo de una preferencia de lugar condicionada inducida por cocaína. Además, este efecto mediador es más potente cuanto más amplia es la población de estas células.



# ENGLISH SUMMARY AND CONCLUSIONS





## 1. SUMMARY

The global use of illicit substances poses a significant public health and social challenge (UNODC, 2022). Among the most widely used illicit drugs is cocaine, a central nervous system stimulant with high reinforcing properties (Kuhar et al., 1991). Cocaine abuse not only impacts the health of users but also has widespread socio-economic repercussions. In 2020, around 21.5 million people aged 15–64 used cocaine (UNODC, 2022). In Europe, cocaine is the most widely used psychostimulant and the second most prevalent illicit drug, following cannabis, with an increasing trend over the past decade (OEDT, 2022). Specifically, Spain is one of the countries on the European continent with the highest prevalence of cocaine use (OEDT, 2022) with 11.7% having consumed it at least once in their lifetime (OEDT, 2022).

Cocaine has strong reinforcing effects and provokes rewarding subjective sensations that promote repeated drug abuse. Some studies estimate that around 15–20% of occasional cocaine users develop a heavy and frequent drug abuse profile that leads to drug dependence (Flórez-Salamanca et al., 2013; Lopez-Quintero et al., 2011). Cocaine addiction constitutes a chronic disorder characterized by a compulsive drug seeking and abuse that is accompanied by negative symptoms during withdrawal phases, such as a negative emotional state (dysphoria, anxiety, and irritability) and craving, which continually precipitate relapse (Koob & Volkow, 2010, 2016). Currently, the development of more effective treatments constitutes a challenge given the persistent risk of relapse to drug abuse, even after prolonged abstinence (Sánchez-Hervás et al., 2012).

Among the most potent triggers of relapse, human and animal research highlight the critical role of cues associated with the reinforcing effects of the drug. With repeated use, the rewarding effects of the drug can be passively associated with a wide range of stimuli or contextual cues. These (originally neutral) cues become conditioned stimuli capable of recurrently trigger drug-seeking and intake (Everitt, 2014). Eventually, drug taking may evolve into an automatic stimulus-driven habit elicited by conditioned stimuli. This makes drug-seeking and compulsive drug-taking behaviours very difficult to inhibit in the presence of drug-associated cues (Crombag et al., 2008; Ersche et al., 2016; Lüscher et al., 2020). The use of strategies to weaken the strength of these drug-context associations may be of therapeutic interest in that it could favour the control of craving and thus reduce the risk of relapse (Torregrossa & Taylor, 2013). However, drug-context associations are highly resistant to modification (Kutlu & Gould, 2016) and extinguished responses are susceptible to reinstatement phenomena, involving the recovery of the original association between drug effect and contextual cues, again encouraging drug-seeking and intake (Bouton, 1993, 2002).

Preclinical studies have provided further insight into the neurobiological mechanisms that contribute to the vulnerability and maintenance of addictive behaviour. In this regard, most research have been developed using the self-administration (SA) and conditioned place preference paradigms (CPP) to study the mechanisms underlying the reinforcing effects of drugs (Koob & Le Moal, 2006). These studies indicate that repeated cocaine abuse is related to neural alterations and impaired functioning of brain areas involved in the motivational control of behaviour, emotion and cognition (Everitt & Robbins, 2016; Koob & Volkow, 2016), which contribute to the development and

maintenance of drug-stimulus associative memories (Everitt, 2014; Torregrossa & Taylor, 2013). As a result, substance abuse dependence is currently considered a disorder with a marked biological influence (Torregrossa et al., 2011), and therefore, progress in understanding the brain alterations underlying problematic drug abuse may be of great relevance for the development of more effective therapeutic alternatives.

Most cocaine effects derive from an increased monoaminergic signalling, mainly from the release of dopamine (DA; Di Chiara & Imperato, 1988) in Ventral Tegmental Area (VTA) and Nucleus accumbens (NAc). Cocaine increases DA levels directly by blocking the DA transporter (DAT), leading to a decreased reuptake of DA at the pre-synaptic level (Volkow et al., 1997), and as well by autophagic degradation of DAT (Harrasz et al., 2021). Rapid increases in DA levels mediate the rewarding effects of drugs through activation of D1 (Caine et al., 2007) and D2 (Bari & Pierce, 2005) receptors present in the NAc and other brain regions. The integrity of the circuitry involving the NAc and other brain regions is critical in drug seeking and abuse, both during the initial phases of controlled use and in establishing the drug-stimulus associations that promote the development of the pattern of uncontrolled abuse (Everitt et al., 2008; Everitt & Robbins, 2005). In fact, repeated exposure to the drug causes changes in dopaminergic projection brain structures such as the NAc or the dorsal striatum (Calipari et al., 2014; Mateo et al., 2005; Nader et al., 2002, 2006) as well as neuroadaptations that progressively shift behavioural control from the NAc to the dorsal striatum, which is involved in the execution of goal-directed actions (e.g. obtaining a reward) and the formation of stimulus-response habits (Everitt, 2014; Lüscher et al., 2020). These neuroadaptations favour the subsequent development of compulsive habit seeking and drug abuse (Murray et al., 2012; Zapata et al., 2010), including the reinstatement of drug abuse after a process of abstinence (See et al., 2007). Despite playing an important role in the development of cocaine abuse disorder, the striatum constitutes only one part of the complex neural network involved in drug dependence, maintaining reciprocal connections with other limbic structures (Volkow & Morales, 2015). In this way, cocaine abuse affects the pre-frontal cortex and amygdala, which are key areas in executive function and the regulation of reward, and emotion, respectively (Ceceli et al., 2021; Murray, 2007). Finally, although the hippocampus has received less attention in drug studies compared to other brain structures (Everitt, 2014) it is a region of particular relevance in this area. The hippocampal formation receives dopaminergic afferents from the VTA and sends efferents back through the NAc, thus exerting an important role in the acquisition, maintenance, extinction and reinstatement of drug-context associations (Lisman & Grace, 2005).

In this regard, the hippocampus has been implicated in the encoding of complex associations, as well as in their consolidation, long-term storage and modulation after the presentation of new information (Biane et al., 2023). Indeed, research within the human population has demonstrated that exposure to cues associated with cocaine triggers an elevation in dopamine release within the hippocampus (Fotros et al., 2013). Additionally, such cues have been observed to increase the activity of the hippocampus (Grant et al., 1996), a phenomenon directly associated to the subjective experience of craving (Kilts et al., 2001; Potenza et al., 2012; Tomasi et al., 2015; Wexler et al., 2001). These findings are complemented by information gathered from animal models, which indicate that pharmacological or pharmacogenetic inhibition of this brain structure interferes with both learning and extinction memory expression in CPP (Burgdorf et al.,

2020; Hitchcock & Lattal, 2018) and self-administration (Szalay et al., 2011) paradigms. Furthermore, the literature indicates that the hippocampus also regulates drug-seeking behaviour reinstatement induced by re-exposure to the context, or by a priming dose of the drug (Fuchs et al., 2005; Rogers & See, 2007; Trouche et al., 2016).

Research on the involvement of the hippocampus in the processing of cocaine-context associations has also revealed that plasticity phenomena occurring in this brain structure may play an important role. In this way, adult hippocampal neurogenesis (AHN) in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, or the proliferation of new neurons during adulthood (Altman & Das, 1965; Bayer, 1983; Kaplan & Hinds, 1977) have been widely reported in a multitude of animal species, presumably including humans (Lindsey & Tropepe, 2006; Moreno-Jiménez et al., 2019; Terreros-Roncal et al., 2021). In general, the literature indicates that AHN is a relevant neurobiological substrate for various forms of learning involving complex spatial and/or associative memory components (Abrous & Wojtowicz, 2015; Deng et al., 2010) and for the flexible use of acquired information (Dupret et al., 2008; Garthe et al., 2016) but it also plays a role in mood regulation processes (Anacker & Hen, 2017), and has recently been proposed to be involved in the discrimination of similar information (pattern separation; Clelland et al., 2009) and in the modification of previously acquired memories (Ryan & Frankland, 2022). The newborn neurons of the DG show remarkable plastic and electrophysiological properties particularly during their immature stage (i. e., ~1-6 weeks of age). However, even after reaching maturity, they exhibit an increased plastic capacity in response to experience, a feature that distinguishes them from pre-existing DG cells (Lemaire et al., 2012). Although many adult dentate granule cells (DGCs) die (Dayer et al., 2003; Sun et al., 2004) after been generated during the first week, part of these neurons survive and eventually integrate into the DG (~8 weeks of age; Ge et al., 2007; Laplagne et al., 2006; Zhao et al., 2008). Numerous factors have been described that can positively or negatively regulate AHN, and strategies have even been developed to artificially manipulate this phenomenon (i. e., intracranial irradiation, anti-mitotic drugs, genetic modulation; Berdugo-Vega et al., 2020; Deng et al., 2010; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Malberg et al., 2000). AHN processes are also sensitive to non-invasive endogenous (e.g., GABA, glutamate, serotonin among other neurotransmitters; Aimone et al., 2014; Malberg et al., 2000; Tashiro et al., 2006) and environmental factors (e.g., stress, exercise, cognitive stimulation, or environmental enrichment; Gould et al., 1999; Kempermann et al., 1997; Kuhn et al., 1996; Van Praag et al., 1999) which may have a modulating role (positive or negative) on the different stages of the neurogenic developmental process, naming proliferation, neuronal differentiation, survival and integration stages of new cells into the DG circuitry. Importantly, associative learning tasks such as trace eyelid conditioning, as well as spatial learning tasks such as the Morris Water Maze (MWM), which rely on hippocampal integrity, appears to have positive effects on the survival of new hippocampal cells that are at a critical maturational period (i.e., 1-6 weeks of age; Gould et al., 1999; Leuner et al., 2004; Trouche et al., 2009). In response to learning, these cells can be functionally integrated into hippocampal circuits and recruited for processing information of a similar nature once they reach maturation (Trouche et al., 2009).

Interestingly, recent studies suggest that the generation of new neurons and their development within hippocampal circuits may weaken pre-existing connections as they compete with mature DGCs for synaptic input-output connections (Akers et al., 2014; Frankland et al., 2013). Additionally, it has been suggested that new DGCs could

constitute a "pool" of young and highly plastic neurons, which could be recruited by the hippocampal circuitry to favour the acquisition of new learning. In this way, new neurons would facilitate the integration of novel content into the memory of pre-existing contexts, as occurs precisely in the case of extinction learning (Cleva et al., 2011). These findings could have important implications for the treatment of drug-related disorders in which associative learning mechanisms play a key role in the development and maintenance of maladaptive drug use and relapse. In fact, preclinical research shows that animals with reduced AHN after the acquisition of cocaine SA behaviour display greater resistance to extinction and, at the same time, exhibit a greater tendency to reinstatement induced by priming, stress or re-exposure to the context (Deschaux et al., 2014; Noonan et al., 2010). On the contrary, when a neurogenic augmentation strategy, whether environmental or pharmacological, is implemented after the formation of CPP cocaine-context associations, a decrease in the long-term retention of CPP is noted. Additionally, there is a facilitation of extinction learning, accompanied by a diminished tendency to reinstate CPP behaviour (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Mustroph et al., 2011; Solinas et al., 2008). Some studies suggest a direct involvement of the increase in new DGCs in diminishing the persistence of cocaine-context associations (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). However, most of the neurogenic enhancement strategies employed so far have been rather non-specific, resulting in additional structural and functional effects that may influence the observed alterations in drug-seeking behaviour (i. e., exercise; Mustroph et al., 2016).

Based on this previous information, this Doctoral Thesis is grounded on the following **general hypothesis**:

The synergistic stimulation of proliferation, survival, differentiation/maturation, and functional integration of new DGCs through the combination of physical exercise and spatial training will promote the extinction of cocaine-induced conditioned place preference and reduce its reinstatement in response to a cocaine priming.

To test this experimental hypothesis, the present Doctoral Thesis has been structured into two experimental blocks that include studies developed in mice. The first experimental block focuses on the validation of a behavioural protocol that combines a programmed aerobic exercise strategy and a hippocampus dependent spatial training task, with the aim of synergistically favouring the proliferation, survival, and differentiation/maturation of a cohort of new DGCs. The second experimental block addresses the effect of this combined strategy to reduce the retention, extinction and/or reinstatement of cocaine-context associations in the CPP model, focusing on the functional role of new DGCs as a potential explanatory mechanism.

The specific aims of each of the two experimental blocks are presented below:

## **Aims**

### **First Experimental Block**

1. To determine whether a brief protocol of scheduled exercise increases the proliferation and/or survival of new cells in the DG of the adult hippocampus.
2. To analyse whether a combined strategy of scheduled exercise and hippocampus-dependent spatial training synergistically increases the proliferation, survival, and neuronal differentiation and/or maturation of new cells in the DG of the adult hippocampus.

### **Second Experimental Block**

3. To assess whether the sequential combination of scheduled exercise and hippocampus-dependent spatial training favours extinction and/or reduces reinstatement of cocaine-context associations in the CPP paradigm.
4. To determine whether the effects of the sequential combination of scheduled exercise and spatial training on the extinction and/or reinstatement of cocaine-induced CPP are mediated by the stimulation of neurogenesis in the DG of the adult hippocampus.

## **FIRST EXPERIMENTAL BLOCK**

### **Sequential treadmill exercise and cognitive training synergistically increase adult hippocampal neurogenesis in mice**

#### **Aim 1**

#### **To determine whether a brief protocol of scheduled exercise increases the proliferation and/or survival of new cells in the DG of the adult hippocampus.**

To address this aim, groups of male mice were subjected to 10 days of treadmill exercise or maintained at home cage and were then sacrificed 24 hours or 9 days after the last session of running. Bromodeoxyuridine (BrdU) injections (2/d, 75 mg/kg, i.p.) were administered to label cells undergoing division during the first three days of the exercise protocol. After obtaining and processing the brain tissue, immunohistochemistry (IHC) studies were carried out in free-floating sections to analyse and quantify the number of DGCs expressing BrdU and the proliferating cell nuclear antigen PCNA.

Overall, the results indicated that treadmill exercise promoted a significant increase in the number of BrdU<sup>+</sup> (8-10 days old) and proliferative PCNA<sup>+</sup> DGCs that were evident 24 h after the last running session. This is consistent with previous literature indicating that 10 days of moderate intensity treadmill exercise upregulate AHN in the short-term (Ferreira et al., 2011) and that running prompts cell proliferation in the

hippocampus (Ferreira et al., 2011; Li et al., 2013; van Praag et al., 1999). Whether the increase in BrdU<sup>+</sup> DGCs (8-10 days old) indicated additional effects of exercise on cell survival is uncertain, as it may rather reflect a net increase in AHN as a result of increased proliferation of new cells (Snyder, Glover, et al., 2009; van Praag et al., 1999). Nevertheless, both BrdU and PCNA expression in the DG reverted to baseline levels 9 days after the cessation of the exercise protocol, suggesting that its effects on the proliferation/survival of new DGCs were transient and probably activity dependent. While several studies indicate that sustained running contributes to maintaining high rates of AHN (Li et al., 2013; Snyder, Glover, et al., 2009), non-cumulative (Cahill et al., 2018; Kronenberg et al., 2006) or even negative effects (Naylor et al., 2005; Nguemeni et al., 2018) have also been reported. Interestingly, the new DGCs generated under treadmill running conditions may be prone to die after exercise cessation (Nishijima et al., 2013, 2017), raising doubts about their functional significance for future cognitive demands. Thus, for a consistent increase in AHN, it may be necessary to supplement physical activity protocols with additional and more selective hippocampal stimulation (Fabel et al., 2009; Kronenberg et al., 2006) such as hippocampal dependent learning experiences (Trouche et al., 2009).

## Aim 2

**To analyse whether a combined strategy of scheduled exercise and hippocampus-dependent spatial training synergistically increases the proliferation, survival, and neuronal differentiation and/or maturation of new cells in the DG of the adult hippocampus.**

For this purpose, mice were first either subjected to 10 days of treadmill exercise or maintained undisturbed at home cage. As described previously, mice received BrdU injections to label cells undergoing division during the first three sessions of running. Then, animals were assigned to conditions either submitted to 7 days of spatial working memory training in the MWM or untrained and were sacrificed 24 hours after the last MWM session. After extracting and processing the tissue, IHC and immunofluorescence (IF) studies were performed in free-floating sections to analyse and quantify the expression of a set of neurogenic markers including BrdU to assess the survival of DGCs generated 8-10 days before MWM training; doublecortin (DCX) to evaluate neuronal differentiation/maturation of DGCs; and PCNA to assess proliferation in the DG shortly after the last MWM session. The hippocampal expression of neuroplasticity markers (BDNF and SYN) was also analysed.

Immunoassays studies revealed that animals that underwent sequential exercise and MWM training exhibited significantly more BrdU<sup>+</sup> DGCs compared to the other experimental conditions, suggesting that the combination of both strategies increased survival of new DGCs to a greater extent than any treatment alone. In fact, no differences were found regarding the number of PCNA<sup>+</sup> DGCs, suggesting that MWM training did not modulate proliferation, but rather survival of hippocampal cells. In addition, sequential treadmill exercise and MWM training led to a significant increase in the number of postmitotic DCX<sup>+</sup> DGCs in the dorsal DG, likely revealing enhanced neuronal differentiation and/or maturation of newborn DGCs generated before and during the behavioural treatments. These results provide the first evidence that combining exercise and hippocampus-dependent learning synergistically increases AHN in mice, as previously suggested in rats (Motta-Teixeira et al., 2016), and support the notion that the pro-neurogenic effects of exercise can be potentiated by adding proper hippocampal

stimulation during a critical period of cell survival (i. e., 1–2 weeks after neural birth; Tashiro et al., 2007; Trouche et al., 2009). At this stage, new DGCs present enhanced synaptic plasticity compared to the preexisting neurons of the DG, which make them particularly prone to be rescued from death and subsequently recruited by the local network in order to cope with events of hippocampal demand (Tashiro et al., 2007; Trouche et al., 2009). Exercise creates a highly plastic microenvironment in the DG, including the proliferation of neural precursor cells, which may provide more resources to respond to future relevant stimuli (Fabel et al., 2009). However, data from this experimental block showed that these pro-neurogenic effects of exercise were transient and fade in the absence of stimuli that support the survival of new hippocampal cells, such as complex spatial training in the MWM.

Interestingly, a decrease in the number of BrdU<sup>+</sup> DGCs was found in sedentary mice submitted to working memory training in the MWM. This result contrasts with previous evidence in rats (Aasebø et al., 2018), although other studies in this species have found no effects on cell survival following 10 days of working memory training in the MWM (Motta-Teixeira et al., 2016) and even AHN reductions when learning is extended in time (Mohapel et al., 2006). In mice, Xu et al. (2011) found that 8 days of delayed-matching-to-place MWM training can lead to a decrease in the survival of one-week-old newborn DGCs, possibly as a way to avoid interference from learning spatial information that is constantly changing (Saxe et al., 2007; Xu et al., 2011). However, it would not explain why we and others (Motta-Teixeira et al., 2016), have shown the opposite effect in previously exercised animals. Major methodological inconsistencies between studies (e.g., different animal species employed, working memory protocols, etc.) make any comparison difficult. As of now, it is unclear how MWM training interacts with AHN. The intricate relationship between neurogenesis and spatial learning (Döbrössy et al., 2003; Dupret et al., 2007; Epp et al., 2007) could explain the varying effects observed in previous studies which noted both enhancements (Gould et al., 1999; Trouche et al., 2009) declines (Ambrogini et al., 2004), as well as non-significant effects on DG cell survival (Trincherro et al., 2015; Henriette Van Praag et al., 1999), mainly in reference memory paradigms.

Nevertheless, our results clearly showed that MWM training interacted with treadmill exercise to promote the opposite effect of boosting AHN, as it has been reported previously in rats (Motta-Teixeira et al., 2016). A possible explanation is that MWM training caused stress-related deleterious effects on AHN (Ehninger & Kempermann, 2006; Mohapel et al., 2006) that was counteracted by previous exercise (Castilla-Ortega et al., 2014; Li et al., 2013). However, proper habituation to the MWM task should have prevented potential stressful effects of MWM training (Ehninger & Kempermann, 2006). Sustained aerobic activity due to swimming in the pool during MWM training could also account for the results, but other studies suggest that such synergistic enhancement of AHN is not replicated using hippocampal-independent MWM protocols (Motta-Teixeira et al., 2016). Another (non-excluding) explanation relates to the ability of exercise to promote neuroplastic phenomena within the hippocampus that are relevant for learning (e.g. release of neurotrophins or enhancement of synaptic plasticity (O'Callaghan et al., 2007; Vivar et al., 2012, 2016) although the present study found no evidence of exercise-related changes in the expression of BDNF and SYN in the DG. The individual experience during the task and the degree of mastery achieved could have also affected AHN (Curlik et al., 2013). Data from this experimental block suggested that both exercised and sedentary mice successfully learned the MWM task, but exercised animals showed a non-significant trend to outperform their sedentary counterparts in terms of reduced latency to escape from the pool and cumulative

distance to the platform. In addition, exercised mice were better able to retain information in the long-term than their sedentary peers. Thus, it is possible that physical stimulation provided exercised animals with more neurocognitive resources to successfully cope with MWM training (Creer et al., 2010; Gould et al., 1999; Sahay et al., 2011; Henriette Van Praag et al., 2005). Precisely, exercise has shown to improve learning and memory storage (Van Praag et al., 2005) in association with increased AHN (Gould et al., 1999; Sahay et al., 2011; Van Praag et al., 2005). Supporting this rationale, a principal component analysis (PCA) revealed that improved MWM performance (i. e., lower latency and cumulative distance measures), the use of hippocampal strategies and the survival of new DGCs integrated a single factor that was differentially modulated by physical activity, being significantly greater in exercised animals.

Overall, this first experimental block describes synergistic effects of sequential physical and cognitive training to enhance AHN in mice. This approach is presented as an effective tool to stimulate the proliferation, survival, and differentiation/maturation of a subset of new DGCs (1-2 weeks of age) in a coordinated manner. Several studies have shown the relevant role of AHN in the development and maintenance of various psychopathological disorders, including those related to substance abuse. Exercise and cognitive training have also gained interest as adjuvant strategies to prevent drug relapse and promote therapeutic success. Within this framework, a second experimental block was designed to test whether the sequential combination of scheduled exercise and spatial training constitutes an alternative method to reduce the long-term persistence of previously established cocaine-context associations, focusing on the functional role of AHN.

## SECOND EXPERIMENTAL BLOCK

### Aim 3

**To assess whether the sequential combination of scheduled exercise and hippocampus-dependent spatial training favours extinction and/or prevents reinstatement of cocaine-context associations in the CPP paradigm.**

To address this aim, groups of mice received cocaine conditioning in the CPP task and were then subjected to 10 days of moderated scheduled exercise (or sedentary conditions) and/or 7 days of spatial working memory training in the MWM (or untrained conditions). Approximately 4 weeks following MWM training, CPP retention was assessed in all groups and then mice were submitted to forced extinction and evaluated in an extinction test. Once all groups reached extinction criteria in a test, primed CPP reinstatement was tested in two separate sessions in which animals received i.p. cocaine at 2 mg/kg and 8 mg/kg, respectively.

The results evidenced no effects of exercise and/or MWM training on CPP retention ~4 weeks later, as evidenced by significant preference for the cocaine-paired compartment of the apparatus (CS<sup>+</sup>) during a test, suggesting that the treatments did not alter the rewarding properties of cocaine cues. However, an extinction enhancing effect of the behavioural interventions was found. In this regard, mice subjected to exercise and/or MWM training ceased to show preference for CS<sup>+</sup> after four extinction sessions, while animals not subjected to either intervention remained in CS<sup>+</sup> longer and required 50% more extinction trials to suppress the cocaine-induced CPP. After two additional extinction sessions, no group showed significant CPP, and reinstatement was therefore assessed. Data from the first reinstatement test revealed that a subthreshold

cocaine priming (2 mg/kg) reinstated the preference for CS<sup>+</sup> in untreated animals, but not in mice that had undergone treadmill exercise and/or MWM training, indicating that the behavioural treatments (combined or alone) reduced the sensitivity to the reinforcing effects of the drug. Unexpectedly, no significant CPP was found in treated, but neither in control conditions following a moderate (8 mg/kg) cocaine priming, which could be attributed to interference caused by exposure to both compartments under the effects of cocaine in the previous reinstatement test. Overall, all treatments reduced CPP-scores after extinction learning relative to untreated mice. However, such decrease in CPP was significant only in dual-intervened animals, suggesting greater benefits from the combined intervention. Additionally, a PCA was conducted to comprehensively understand the effect of the behavioural treatments on early extinction and CPP reinstatement. A single dimension ('CPP persistence') explaining ~60 % of the variance was revealed, with positive factor scores indicating higher CPP-scores during early extinction and primed reinstatement tests. Further analyses revealed single effects of exercise and MWM training to reduce 'CPP persistence' factor scores, supporting that either treatment was successful to suppress cocaine-conditioning after extinction training.

Growing evidence suggests that combining physical and cognitive training may redound to benefits when addressing neurocognitive impairment (Bo et al., 2019; Montero-Odasso et al., 2023; Nuechterlein et al., 2023). However, whether it transfers into functional restoration in drug-related disorders remains to be elucidated. Although still preliminary, evidence in rodents reveals aggregate effects of multimodal strategies in reversing functional deficits induced by brain injury (Kapgal et al., 2016) and drugs of abuse (G. F. Hamilton et al., 2014), with concurrent changes in AHN. Interestingly, the behavioural protocol described in the first experimental block has shown to synergistically promote proliferation, survival, and neuronal differentiation/maturation of newborn DGCs, which may support lasting extinction of cocaine-context associations.

#### Aim 4

**To determine whether the effects of the sequential combination of scheduled exercise and spatial training on the extinction and/or reinstatement of cocaine-induced CPP are mediated by the stimulation of neurogenesis in the DG of the adult hippocampus.**

As described in the previous experimental block, BrdU injections (2/d, 75 mg/kg, i.p.) were administered during the first three sessions of exercise to label a subgroup of newborn DGCs that proliferated at the beginning of the exercise treatment and that reach a critical window of survival (~8-10 days-old) during MWM training. Ninety minutes after the completion of the last CPP reinstatement test, animals were sacrificed, and brain tissue was collected for further histological processing. IHC and IF studies were then carried out in free-floating sections to analyse and quantify the number of BrdU<sup>+</sup> DGCs and the percentage of co-labelling of these cells with markers of neuronal nuclei (NeuN) as well as the immediate-early gene *cfos* (a proxy for neuronal activation (Guzowski et al., 2005)).

Data from IHC revealed that animals submitted to exercise followed MWM training, but not to each treatment alone, showed significantly more (~30%) BrdU<sup>+</sup> DGCs than sedentary and untrained mice. In addition, IF studies revealed that exercised animals displayed a significantly higher percentage of BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> DGCs, suggesting that this treatment promoted differentiation of these cells into mature, stably integrated DG

neurons. Moreover, MWM training (but not scheduled exercise or cage rest) promoted experience-dependent activity of BrdU<sup>+</sup> DGCs during CPP reinstatement, as indicated by a significant increase in the percentage of c-Fos<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> DGCs in MWM-trained animals. Altogether, these results indicate that combining exercise and spatial working memory training promoted a multi-level enhancement of AHN by increasing the generation, survival, differentiation, and functional integration of a subset of newborn DGCs.

It was therefore speculated that the benefits of combining both behavioural treatments to reduce CPP persistence could be supported by the recruitment of BrdU<sup>+</sup> DGCs, and that this effect was modulated by the size of this cell population. To test this hypothesis, moderated mediation models were conducted using the PROCESS macro in SPSS. The percentage of BrdU<sup>+</sup>/c-Fos<sup>+</sup> DGCs was included as a mediator in the relationship between the experimental condition and 'CPP persistence' factor scores (outcome variable). The (estimated) number of BrdU<sup>+</sup> DG neurons was the proposed moderator. In a first model, it was found that the functional recruitment of BrdU<sup>+</sup> DGCs mediated the effects of MWM training on reducing CPP persistence, and that this indirect effect was significantly stronger when the number of these cells was above the mean. Thus, with more surviving DGCs available to be wired, the effects of spatial training on suppressing CPP were maximized. Precisely, combining exercise and MWM, rather than spatial training alone, increased the reservoir of BrdU<sup>+</sup> DGCs and sharply decreased CPP following extinction learning, supporting that multi-level enhancement of AHN optimizes memory performance (Li et al., 2022, 2023). To date, evidence in rodents has yielded mixed results, where cognitive training facilitates extinction of cocaine seeking (Baratta et al., 2015) but fails to prevent context-induced relapse (Bechard et al., 2018). The current data support that supplementing cognitive strategies with prior exercise may synergistically promote AHN and functional integration of newborn DGCs, thus 'unlocking' the potential of cognitive training to sustainably disrupt cocaine-context associations.

The results obtained indicate that a small (yet significant) proportion of newly generated DGCs contributed to reduced CPP persistence following MWM training, especially in previously exercised animals. One option to consider is that incorporating new cells 'erased' the original memory trace due to processes of synaptic competition as they became imbedded into the existing DG architecture (Akers et al., 2014; Gao et al., 2018). As a result, extinction recall could be favoured by resolving proactive interference from associations that overlap in content (Epp et al., 2016). However, CPP retention was significant ~4 weeks after the cessation of the treatments, rendering 'forgetting' an unlikely explanation. An alternative scenario is that the non-rewarded representation of the context was strengthened via reconsolidation processes that critically rely on new DGCs stimulated at immature stages (Lods et al., 2021). Contrary to this idea, animals underwent long retrieval trials after conditioning (15–30 min) that may trigger extinction rather than reconsolidation mechanisms (Suzuki et al., 2004). A more convincing explanation is related to the ability of newborn DGCs to allow flexible encoding of changing contingencies in otherwise stable contexts (Fölsz et al., 2023), which putatively applies to extinction as a mismatch event involving new inhibitory learning (Bouton, 2004). Increasing AHN promotes cognitive flexibility in reversal learning paradigms (Berdugo-Vega et al., 2021; Garthe et al., 2016), presumably because newborn DGCs (when mature) can modify DG-CA3 circuits to promote sparse activity and thus memory indexing. Within this framework, recruiting of BrdU<sup>+</sup> DGCs could contribute exponentially to disaggregate neuronal ensembles capturing competing representations of the experimental context. By doing so, newborn DGCs may have prevented

catastrophic interference (Berdugo-Vega et al., 2021), leading to efficient encoding and facilitated retrieval of up-to-date (i. e., extinguished) memories. Regardless of the mechanism, our data support a significant role of newborn DGCs in the complex neural substrate underlying extinction of drug seeking, which encompass not only hippocampal but also prefrontal, striatal, and limbic mechanisms (Cleva & Gass, 2010).

These findings constitute first evidence that newborn DGCs actively modulate the processing of cocaine contextual cues. To date, the functional contribution of AHN remains elusive, as it has only been described that fostering AHN in a non-specific manner is concomitant to reduced maintenance and/or reinstatement of cocaine seeking in rodents (Baker et al., 2001; Ewing & Ranaldi, 2018; Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019; Lynch et al., 2010; Solinas et al., 2008), which may be also explained by off-target effects (Mustroph et al., 2015). Precisely, an alternative mediation model including exercise as predictor variable revealed that treadmill exercise diminished CPP persistence regardless of the amount and/or activity of BrdU<sup>+</sup> DGCs. Owing to manifold physiological responses evoked by running (Gao et al., 2023), drawing definitive conclusions can be challenging, and further research is needed. Notwithstanding, exercise builds a microenvironment conducive to AHN (e.g. precursor cell proliferation, maturation) which cognitive training may capitalize on (Dong et al., 2019; Kronenberg et al., 2006; Lugert et al., 2010; Piatti et al., 2011; Steiner et al., 2008). Ultimately, this may lead to a greater supply of newborn DGCs to keep alive and ready to face future demands (Fabel et al., 2009; Shors, 2014). Ultimately, these synergies on AHN may extend the scope of both physical and cognitive training to cope with maladaptive behaviours such as those related to cocaine.

In the light of renewed debate, progress is being made in understanding human AHN (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019; Terreros-Roncal et al., 2021). Beyond outstanding questions, newborn DGCs remain a source of interest due to their potential contribution to human cognition across lifespan (Kempermann et al., 2018). Accumulating preclinical evidence suggests that reduced AHN supports cocaine-related disorders, whereas fostering neurogenic phenomena may help to guide effective therapies (Castilla-Ortega et al., 2017). Rodent studies reveal that aerobic exercise (Kronenberg et al., 2006; van Praag et al., 1999), as well as overcoming cognitive challenges (Gould et al., 1999; Trouche et al., 2009; Veyrac et al., 2013), stimulate different, yet complementary AHN processes. In practice, cognitive training rescues deficient top-down processes in drug users (Caetano et al., 2021) that predict poor clinical outcomes and relapse (Verdejo-García et al., 2019). Physical activity promotes cognitive gains as well (Hötting & Röder, 2013), stress, resilience (Childs & de Wit, 2014; Rimmele et al., 2009) and mood improvements (Hearing et al., 2016) that could likewise favour substance abuse therapy (Darharaj et al., 2023; Sinha, 2008). However, research on this subject is scarce and heterogeneous, and the scope of physical (Zschucke et al., 2012) or cognitive training (Nardo et al., 2022) to support abstinence from cocaine is uncertain. Paralleling genetic approaches (Li et al., 2022), this work provides novel insights into the advantages of integrating translational strategies, such as exercise and cognitive stimulation, to synergistically promote AHN and, in turn, healthier patterns of behaviour in the presence of cocaine contextual cues.

In conclusion, the results of this second experimental block reveal that the sequential combination of exercise and spatial working memory training may suppress the preference for cocaine contextual cues to a greater extent than either treatment alone, in line with evidence indicating that this multimodal approach is useful to cope with neurocognitive disorders. Moreover, this combined intervention synergistically

expanded a subset of new DGCs that were functionally relevant for spatial training, but not for exercise, in ceasing persistent approach to drug signals. Therefore, our results highlight the value of integrating exercise and cognitive stimulation into comprehensive therapies as a promising adjuvant to prevent cocaine relapse.

## 2. CONCLUSIONS

---

- 1.** A brief strategy of scheduled exercise produces a short-term increase in the generation of new cells in the dentate gyrus of the adult hippocampus, as well as their neuronal differentiation and/or maturation.
- 2.** The sequential combination of scheduled exercise and spatial memory training promotes a coordinated increase in the proliferation, survival, differentiation and/or maturation of new cells in the adult hippocampus.
- 3.** Brief protocols of scheduled exercise and spatial memory training facilitate extinction and prevent the reinstatement of cocaine-context associations in the conditioned place preference model, with greater benefits derived from the sequential combination of both interventions.
- 4.** Spatial memory training, but not scheduled exercise, promotes the functional integration of new cells in the dentate gyrus of the adult hippocampus during the reinstatement of a cocaine-induced conditioned place preference.
- 5.** The functional integration of new cells in the adult dentate gyrus mediates the effect of training in the spatial memory task to reduce the long-term persistence of a cocaine-induced conditioned place preference. This mediating effect becomes stronger as the population of these new cells increases.





# REFERENCIAS

---

REFERENCES



- Aasebø, I. E. J., Kasture, A. S., Passeggeri, M., & Tashiro, A. (2018). A behavioral task with more opportunities for memory acquisition promotes the survival of new neurons in the adult dentate gyrus. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25331-w>
- Abrous, D. N., & Wojtowicz, J. M. (2015). Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), 1–24. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018952>
- Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M., & Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59(2), 253–277. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2008.08.002>
- Aharonovich, E., Hasin, D. S., Brooks, A. C., Liu, X., Bisaga, A., & Nunes, E. V. (2006). Cognitive deficits predict low treatment retention in cocaine dependent patients. *Drug and Alcohol Dependence*, 81(3), 313–322. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2005.08.003>
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), 991–1026. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00004.2014>
- Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L., Wheeler, A. L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., Ohira, K., Richards, B. A., Miyakawa, T., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6184), 598–602. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1248903>
- Alcalá, J. A., Callejas-Aguilera, J. E., Nelson, J. B., & Rosas, J. M. (2020). Reversal training facilitates acquisition of new learning in a Morris water maze. *Learning & Behavior*, 48(2), 208–220. <https://doi.org/10.3758/S13420-019-00392-7>
- Alcorn, J. L., Pike, E., Stoops, W. S., Lile, J. A., & Rush, C. R. (2017). A pilot investigation of acute inhibitory control training in cocaine users. *Drug and Alcohol Dependence*, 174, 145–149. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2017.01.014>
- Alexander Morton, W. (1999). Cocaine and Psychiatric Symptoms. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 1(4), 109–113. <https://doi.org/10.4088/PCC.V01N0403>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319–335. <https://doi.org/10.1002/CNE.901240303>
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Frontini, A., & Fanelli, M. (2010). Synaptogenesis in adult-generated hippocampal granule cells is affected by behavioral experiences. *Hippocampus*, 20(7), 799–810. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20679>
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S., & Cuppini, R. (2004). Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience Letters*, 359(1–2), 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.123>

- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility – linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience* 2017 18:6, 18(6), 335–346. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.45>
- Andersen, M. L., Perry, J. C., Bignotto, M., Perez-Mendes, P., Cinini, S. M., Mello, L. E. A., & Tufik, S. (2007). Influence of chronic cocaine treatment and sleep deprivation on sexual behavior and neurogenesis of the male rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(6), 1224–1229. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2007.04.018>
- Andersen, P., Bliss, T. V. P., & Skrede, K. K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research*, 13(2), 222–238. <https://doi.org/10.1007/BF00234087/METRICS>
- Anderson, M. L., Sisti, H. M., Curlik, D. M., & Shors, T. J. (2011). Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period. *European Journal of Neuroscience*, 33(1), 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07486.x>
- Atkins, A. L., Mashhoon, Y., & Kantak, K. M. (2008). Hippocampal Regulation of Contextual Cue-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 90(3), 481. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2008.04.007>
- Baker, D. A., Tran-Nguyen, L. T. L., Fuchs, R. A., & Neisewander, J. L. (2001). Influence of individual differences and chronic fluoxetine treatment on cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 155(1), 18–26. <https://doi.org/10.1007/s002130000676>
- Baker, S., Vieweg, P., Gao, F., Gilboa, A., Wolbers, T., Black, S. E., & Rosenbaum, R. S. (2016). The Human Dentate Gyrus Plays a Necessary Role in Discriminating New Memories. *Current Biology : CB*, 26(19), 2629–2634. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.07.081>
- Balthazart, J., & Ball, G. F. (2014). Endogenous versus exogenous markers of adult neurogenesis in canaries and other birds: Advantages and Disadvantages. *The Journal of Comparative Neurology*, 522(18), 4100. <https://doi.org/10.1002/CNE.23661>
- Baratta, M. V., Pomrenze, M. B., Nakamura, S., Dolzani, S. D., & Cooper, D. C. (2015). Control Over Stress Accelerates Extinction of Drug Seeking Via Prefrontal Cortical Activation. *Neurobiology of Stress*, 2, 20–27. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2015.03.002>
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/S002130000569>
- Bardo, M. T., Neisewander, J. L., & Kelly, T. H. (2013). Individual differences and social influences on the neurobehavioral pharmacology of abused drugs. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 255–290. <https://doi.org/10.1124/PR.111.005124>
- Bari, A. A., & Pierce, R. C. (2005). D1-like and D2 dopamine receptor antagonists administered into the shell subregion of the rat nucleus accumbens decrease cocaine, but not food, reinforcement. *Neuroscience*, 135(3), 959–968. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.06.048>
- Barr, J. L., & Unterwald, E. M. (2015). Activity-regulated gene expression in immature neurons in the dentate gyrus following re-exposure to a cocaine-paired environment. *Hippocampus*, 25(3), 354–362. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22377>
- Battaglia, F. P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C. M. A., & Wiener, S. I. (2011). The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(7), 310–318. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2011.05.008>

- Bayer, S. A. (1983). 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental Brain Research*, 50(2-3), 329-340.  
<https://doi.org/10.1007/BF00239197>
- Bechard, A. R., LaCrosse, A., Namba, M. D., Jackson, B., & Knackstedt, L. A. (2018). Impairments in reversal learning following short access to cocaine self-administration. *Drug and Alcohol Dependence*, 192, 239-244.  
<https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2018.08.008>
- Belin, D., Belin-Rauscent, A., Everitt, B. J., & Dalley, J. W. (2016). In search of predictive endophenotypes in addiction: insights from preclinical research. *Genes, Brain, and Behavior*, 15(1), 74-88. <https://doi.org/10.1111/GBB.12265>
- Berdugo-Vega, G., Arias-Gil, G., López-Fernández, A., Artegiani, B., Wasielewska, J. M., Lee, C. C., Lippert, M. T., Kempermann, G., Takagaki, K., & Calegari, F. (2020). Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14026-z>
- Berdugo-Vega, G., Lee, C. C., Garthe, A., Kempermann, G., & Calegari, F. (2021). Adult-born neurons promote cognitive flexibility by improving memory precision and indexing. *Hippocampus*, 31(10), 1068-1079. <https://doi.org/10.1002/hipo.23373>
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S. G., Motori, E., Eriksson, T. M., Göbel, J., Yang, S. M., Conzelmann, K. K., Schinder, A. F., Götz, M., & Berninger, B. (2015). A Critical Period for Experience-Dependent Remodeling of Adult-Born Neuron Connectivity. *Neuron*, 85(4), 710-717. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.01.001>
- Biane, J. S., Ladow, M. A., Stefanini, F., Boddu, S. P., Fan, A., Hassan, S., Dundar, N., Apodaca-Montano, D. L., Zhou, L. Z., Fayner, V., Woods, N. I., & Kheirbek, M. A. (2023). Neural dynamics underlying associative learning in the dorsal and ventral hippocampus. *Nature Neuroscience*, 26(5), 798-809. <https://doi.org/10.1038/S41593-023-01296-6>
- Bird, C. M., & Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(3), 182-194.  
<https://doi.org/10.1038/NRN2335>
- Black, Y. D., Green-Jordan, K., Eichenbaum, H. B., & Kantak, K. M. (2004). Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 151(1-2), 225-238.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.08.020>
- Blanco-Calvo, E., Rivera, P., Arrabal, S., Vargas, A., Pavón, F. J., Serrano, A., Castilla-Ortega, E., Galeano, P., Rubio, L., Suárez, J., & de Fonseca, F. R. (2014). Pharmacological blockade of either cannabinoid CB1 or CB2 receptors prevents both cocaine-induced conditioned locomotion and cocaine-induced reduction of cell proliferation in the hippocampus of adult male rat. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(JAN).  
<https://doi.org/10.3389/FNINT.2013.00106>
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993 361:6407, 361(6407), 31-39.  
<https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bo, W., Lei, M., Tao, S., Jie, L. T., Qian, L., Lin, F. Q., & Ping, W. X. (2019). Effects of combined intervention of physical exercise and cognitive training on cognitive function in stroke survivors with vascular cognitive impairment: a randomized controlled trial. *Clinical Rehabilitation*, 33(1), 54-63. <https://doi.org/10.1177/0269215518791007>

- Bobzean, S. A. M., Dennis, T. S., Addison, B. D., & Perrotti, L. I. (2010). Influence of sex on reinstatement of cocaine-conditioned place preference. *Brain Research Bulletin*, 83(6), 331–336. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2010.09.003>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589–599.e5. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.03.015>
- Bonnechère, B., Klass, M., Langley, C., & Sahakian, B. J. (2021). Brain training using cognitive apps can improve cognitive performance and processing speed in older adults. *Scientific Reports*, 11(1), 12313. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-91867-Z>
- Bouton, M. (2004). Context and behavioral processes in extinction. *Learning & Memory*, 11(5), 485–494.
- Bouton, M. E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological Bulletin*, 114(1), 80–99. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.114.1.80>
- Bouton, M. E. (2000). A learning theory perspective on lapse, relapse, and the maintenance of behavior change. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 19(1S), 57–63. <https://doi.org/10.1037/0278-6133.19.SUPPL1.57>
- Bouton, M. E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biological Psychiatry*, 52(10), 976–986. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01546-9)
- Bråthen, A. C. S., Sørensen, Ø., de Lange, A. M. G., Mowinckel, A. M., Fjell, A. M., & Walhovd, K. B. (2022). Cognitive and hippocampal changes weeks and years after memory training. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11636-4>
- Brown, T. E., Lee, B. R., Ryu, V., Herzog, T., Czaja, K., & Dong, Y. (2010). Reducing hippocampal cell proliferation in the adult rat does not prevent the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroscience Letters*, 481(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.06.048>
- Burgdorf, C. E., Bavley, C. C., Fischer, D. K., Walsh, A. P., Martinez-Rivera, A., Hackett, J. E., Zallar, L. J., Ireton, K. E., Hofmann, F., Hell, J. W., Huganir, R. L., & Rajadhyaksha, A. M. (2020). Contribution of D1R-expressing neurons of the dorsal dentate gyrus and Cav1.2 channels in extinction of cocaine conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology*, 45(9), 1506. <https://doi.org/10.1038/S41386-019-0597-Z>
- Burgdorf, C. E., Schierberl, K. C., Lee, A. S., Fischer, D. K., Van Kempen, T. A., Mudragel, V., Huganir, R. L., Milner, T. A., Glass, M. J., & Rajadhyaksha, A. M. (2017). Extinction of contextual cocaine memories requires Cav1.2 within D1R-expressing cells and recruits hippocampal Cav1.2-dependent signaling mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 37(49), 11894–11911. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2397-17.2017>
- Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., & Fenton, A. A. (2012). Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22(9), 1795–1808. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22013>
- Butler, A. J., Rehm, J., & Fischer, B. (2017). Health outcomes associated with crack-cocaine use: Systematic review and meta-analyses. *Drug and Alcohol Dependence*, 180, 401–416. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2017.08.036>

- Caetano, T., Pinho, M. S., Ramadas, E., Clara, C., Areosa, T., & Dixe, M. dos A. (2021). Cognitive Training Effectiveness on Memory, Executive Functioning, and Processing Speed in Individuals With Substance Use Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in Psychology*, 12, 730165. <https://doi.org/10.3389/FPSYG.2021.730165/FULL>
- Cahill, S. P., Cole, J. D., Yu, R. Q., Clemans-Gibbon, J., & Snyder, J. S. (2018). Differential Effects of Extended Exercise and Memantine Treatment on Adult Neurogenesis in Male and Female Rats. *Neuroscience*, 390, 241–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.028>
- Caine, S. B., Thomsen, M., Gabriel, K. I., Berkowitz, J. S., Gold, L. H., Koob, G. F., Tonegawa, S., Zhang, J., & Xu, M. (2007). Lack of Self-Administration of Cocaine in Dopamine D1 Receptor Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, 27(48), 13140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-07.2007>
- Calipari, E. S., Ferris, M. J., & Jones, S. R. (2014). Extended access of cocaine self-administration results in tolerance to the dopamine-elevating and locomotor-stimulating effects of cocaine. *Journal of Neurochemistry*, 128(2), 224–232. <https://doi.org/10.1111/JNC.12452>
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337–344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90335-D](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90335-D)
- Carter, B. L., & Tiffany, S. T. (1999). Meta-analysis of cue-reactivity in addiction research. *Addiction*, 94(3), 327–340. <https://doi.org/10.1046/J.1360-0443.1999.9433273.X>
- Castellani, L. N., Pepler, W. T., Miotto, P. M., Bush, N., & Wright, D. C. (2018). Exercise Protects Against Olanzapine-Induced Hyperglycemia in Male C57BL/6J Mice. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19260-x>
- Castilla-Ortega, E., Blanco, E., Serrano, A., Ladrón De Guevara-Miranda, D., Pedraz, M., Estivill-Torrús, G., Pavón, F. J., Rodríguez De Fonseca, F., & Santín, L. J. (2016). Pharmacological reduction of adult hippocampal neurogenesis modifies functional brain circuits in mice exposed to a cocaine conditioned place preference paradigm. *Addiction Biology*, 21(3), 575–588. <https://doi.org/10.1111/ADB.12248>
- Castilla-Ortega, E., Ladrón de Guevara-Miranda, D., Serrano, A., Pavón, F. J., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F., & Santín, L. J. (2017). The impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis: Potential neurobiological mechanisms and contributions to maladaptive cognition in cocaine addiction disorder. *Biochemical Pharmacology*, 141, 100–117. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2017.05.003>
- Castilla-Ortega, E., Rosell-Valle, C., Pedraza, C., Rodríguez de Fonseca, F., Estivill-Torrús, G., & Santín, L. J. (2014). Voluntary exercise followed by chronic stress strikingly increases mature adult-born hippocampal neurons and prevents stress-induced deficits in “what-when-where” memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.12.001>
- Ceceli, A. O., Bradberry, C. W., & Goldstein, R. Z. (2021). The neurobiology of drug addiction: cross-species insights into the dysfunction and recovery of the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2021 47:1, 47(1), 276–291. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01153-9>
- Chan, J. P., Cordeira, J., Calderon, G. A., Iyer, L. K., & Rios, M. (2008). Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 39(3), 372–383. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2008.07.017>

- Childs, E., & de Wit, H. (2014). Regular exercise is associated with emotional resilience to acute stress in healthy adults. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2014.00161>
- Chung, A., Jou, C., Grau-Perales, A., Levy, E. R. J., Dvorak, D., Hussain, N., & Fenton, A. A. (2021). Cognitive control persistently enhances hippocampal information processing. *Nature* 2021 600:7889, 600(7889), 484–488. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04070-5>
- Clark, P. J., Brzezinska, W. J., Thomas, M. W., Ryzhenko, N. A., Toshkov, S. A., & Rhodes, J. S. (2008). Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 155(4), 1048–1058. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.051>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L. M., Barker, R. A., Gage, F. H., & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 210–213. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1173215>
- Cleva, R. M., & Gass, J. T. (2010). Neuroanatomical structures underlying the extinction of drug-seeking behavior. *The Open Addiction Journal*, 3, 63–75. <https://doi.org/10.2174/1874941001003020063>
- Cleva, R. M., Hicks, M. P., Gass, J. T., Wischerath, K. C., Plasters, E. T., Widholm, J. J., & Olive, M. F. (2011). mGluR5 Positive Allosteric Modulation Enhances Extinction Learning Following Cocaine Self-Administration. *Behavioral Neuroscience*, 125(1), 10. <https://doi.org/10.1037/A0022339>
- Codd, L. N., Blackmore, D. G., Vukovic, J., & Bartlett, P. F. (2020). Exercise reverses learning deficits induced by hippocampal injury by promoting neurogenesis. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76176-1>
- Cone, E. J. (1995). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, 19(6), 459–478. <https://doi.org/10.1093/JAT/19.6.459>
- Conklin, C. A., & Tiffany, S. T. (2002). Applying extinction research and theory to cue-exposure addiction treatments. *Addiction*, 97(2), 155–167. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2002.00014.x>
- Conrad, K. L., Louderback, K. M., Milano, E. J., & Winder, D. G. (2013). Assessment of the impact of pattern of cocaine dosing schedule during conditioning and reconditioning on magnitude of cocaine CPP, extinction, and reinstatement. *Psychopharmacology*, 227(1), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2944-1>
- Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., Van Praag, H., & Bussey, T. J. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2367–2372. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911725107>
- Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., & Shaham, Y. (2008). Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3233. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0090>
- Curlik, D. M., Maeng, L. Y., Agarwal, P. R., & Shors, T. J. (2013). Physical skill training increases the number of surviving new cells in the adult hippocampus. *PloS One*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0055850>
- Curlik, D. M., & Shors, T. J. (2013). Training your brain: Do mental and physical (MAP) training enhance cognition through the process of neurogenesis in the hippocampus?

- Neuropharmacology*, 64(1), 506. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2012.07.027>
- Danielson, N. B. B., Kaifosh, P., Zaremba, J. D. D., Lovett-Barron, M., Tsai, J., Denny, C. A. A., Balough, E. M. M., Goldberg, A. R. R., Drew, L. J. J., Hen, R., Losonczy, A., & Kheirbek, M. A. A. (2016). Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*, 90(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.019>
- Darharaj, M., Hekmati, I., Mohammad Ghezel Ayagh, F., Ahmadi, A., Eskin, M., & Abdollahpour Ranjbar, H. (2023). Emotional Dysregulation and Craving in Patients with Substance Use Disorder: the Mediating Role of Psychological Distress. *International Journal of Mental Health and Addiction*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11469-023-01031-z>
- David, A., & Pierre, L. (2006). Hippocampal Neuroanatomy. *The Hippocampus Book*. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780195100273.003.0003>
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., & Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 563–572. <https://doi.org/10.1002/CNE.10675>
- De Bruin, J. P. C., Moita, M. P., De Brabander, H. M., & Joosten, R. N. J. M. A. (2001). Place and Response Learning of Rats in a Morris Water Maze: Differential Effects of Fimbria Fornix and Medial Prefrontal Cortex Lesions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(2), 164–178. <https://doi.org/10.1006/NLME.2000.3962>
- De Wit, H. (1996). Priming effects with drugs and other reinforcers. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 4(1), 5–10. <https://doi.org/10.1037/1064-1297.4.1.5>
- Degenhardt, L., Baxter, A. J., Lee, Y. Y., Hall, W., Sara, G. E., Johns, N., Flaxman, A., Whiteford, H. A., & Vos, T. (2014). The global epidemiology and burden of psychostimulant dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Drug and Alcohol Dependence*, 137(1), 36–47. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2013.12.025>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience* 2010 11:5, 11(5), 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Denoth-Lippuner, A., & Jessberger, S. (2021). Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience* 2021 22:4, 22(4), 223–236. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00433-z>
- Deroche-Gamonet, V., Revest, J. M., Fiancette, J. F., Balado, E., Koehl, M., Grosjean, N., Abrous, D. N., & Piazza, P. V. (2018). Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine-seeking behavior. *Molecular Psychiatry* 2018 24:2, 24(2), 312–320. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0038-0>
- Deroche-Gamonet, V., Revest, J. M., Fiancette, J. F., Balado, E., Koehl, M., Grosjean, N., Abrous, D. N., & Piazza, P. V. (2019). Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine-seeking behavior. *Molecular Psychiatry*, 24(2), 312–320. <https://doi.org/10.1038/S41380-018-0038-0>
- Deschaux, O., Vendruscolo, L. F., Schlosburg, J. E., Diaz-Aguilar, L., Yuan, C. J., Sobieraj, J. C., George, O., Koob, G. F., & Mandym, C. D. (2014). Hippocampal neurogenesis protects against cocaine-primed relapse. *Addiction Biology*, 19(4), 562–574. <https://doi.org/10.1111/ADB.12019>
- Dhir, S., Teo, W. P., Chamberlain, S. R., Tyler, K., Yücel, M., & Segrave, R. A. (2021). The

- Effects of Combined Physical and Cognitive Training on Inhibitory Control: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128, 735–748. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2021.07.008>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.14.5274>
- Döbrössy, M. D., Drapeau, E., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Molecular Psychiatry*, 8(12), 974–982. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001419>
- Domínguez-Escribà, L., Hernández-Rabaza, V., Soriano-Navarro, M., Barcia, J. A., Romero, F. J., García-Verdugo, J. M., & Canales, J. J. (2006). Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*, 24(2), 586–594. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2006.04924.X>
- Dong, J., Pan, Y. B., Wu, X. R., He, L. N., Liu, X. D., Feng, D. F., Xu, T. Le, Sun, S., & Xu, N. J. (2019). A neuronal molecular switch through cell-cell contact that regulates quiescent neural stem cells. *Science Advances*, 5(2). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAV4416>
- Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G. li, & Song, H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(1), 108–115. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2008.04.001>
- Duff, M. C., Covington, N. V., Hilverman, C., & Cohen, N. J. (2020). Semantic Memory and the Hippocampus: Revisiting, Reaffirming, and Extending the Reach of Their Critical Relationship. *Frontiers in Human Neuroscience*, 13, 488885. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2019.00471/BIBTEX>
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M. D., Panatier, A., Rodríguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olié, S. H. R., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biology*, 5(8), 1683–1694. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050214>
- Dupret, D., O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., & Csicsvari, J. (2010). The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nature Neuroscience*, 13(8), 995–1002. <https://doi.org/10.1038/NN.2599>
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., & Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, 3(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0001959>
- Dutra, L., Stathopoulou, G., Basden, S. L., Leyro, T. M., Powers, M. B., & Otto, M. W. (2008). A meta-analytic review of psychosocial interventions for substance use disorders. *American Journal of Psychiatry*, 165(2), 179–187. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2007.06111851/ASSET/IMAGES/LARGE/S78F2.JPG>
- EDADES 2022. Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas OED
- Ehninger, D., & Kempermann, G. (2006). 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 and Behavior*, 5(1), 29–39.

- <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00129.x>
- Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. (2014). Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron*, 83(4), 764.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.07.032>
- Eichenbaum, H., Stewart, C., & Morris, R. G. M. (1990). Hippocampal Representation in Place Learning. *The Journal of Neuroscience*, 11, 3531-3542.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 123–152.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.30.051606.094328>
- Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13632–13637.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.2234031100>
- Ekstrom, A. D., & Ranganath, C. (2018). Space, time, and episodic memory: The hippocampus is all over the cognitive map. *Hippocampus*, 28(9), 680–687.  
<https://doi.org/10.1002/HIPO.22750>
- Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms*, 9(10), 1079–1087.  
<https://doi.org/10.1242/DMM.026120>
- Epp, J. R., Silva-Mera, R., Köhler, S., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2016). Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference. *Nature Communications*, 7, 10838. <https://doi.org/10.1038/ncomms10838>
- Epp, J. R., Spritzer, M. D., & Galea, L. A. M. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, 149(2), 273–285.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.046>
- Erickson, K. I., Voss, M. W., Prakash, R. S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J. S., Heo, S., Alves, H., White, S. M., Wojcicki, T. R., Mailey, E., Vieira, V. J., Martin, S. A., Pence, B. D., Woods, J. A., McAuley, E., & Kramer, A. F. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3017–3022.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015950108>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Ersche, K. D., Gillan, C. M., Simon Jones, P., Williams, G. B., Ward, L. H. E., Luijten, M., De Wit, S., Sahakian, B. J., Bullmore, E. T., & Robbins, T. W. (2016). Carrots and sticks fail to change behavior in cocaine addiction. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1468–1471. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF3700>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(44), 10074–10086.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Everitt, B. J. (2014). Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories - indications for novel treatments of addiction. In

- European Journal of Neuroscience* (Vol. 40, Issue 1, pp. 2163–2182). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ejn.12644>
- Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3125. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0089>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2000). Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology*, 153(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/S002130000566>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience* 2005 8:11, 8(11), 1481–1489. <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2016). Drug Addiction: Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On. *Annual Review of Psychology*, 67, 23–50. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PSYCH-122414-033457>
- Ewing, S., & Ranaldi, R. (2018). Environmental enrichment facilitates cocaine abstinence in an animal conflict model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 166(January), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.01.006>
- Fabel, K., & Kempermann, G. (2008). Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *NeuroMolecular Medicine*, 10(2), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8031-4>
- Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., & Kempermann, G. (2009). Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 3(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/neuro.22.002.2009>
- Farokhi-Sisakht, F., Sadigh-Eteghad, S., Mohaddes, G., Ebrahimi-Kalan, A., Karimi, P., & Farhoudi, M. (2019). Physical and cognitive training attenuate hippocampal ischemia-induced memory impairments in rat. *Brain Research Bulletin*, 155(October 2019), 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.10.007>
- Feil, J., Sheppard, D., Fitzgerald, P. B., Yücel, M., Lubman, D. I., & Bradshaw, J. L. (2010). Addiction, compulsive drug seeking, and the role of frontostriatal mechanisms in regulating inhibitory control. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(2), 248–275. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2010.03.001>
- Ferreira, A. F. B., Real, C. C., Rodrigues, A. C., Alves, A. S., & Britto, L. R. G. (2011). Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. *Brain Research*, 1425, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.004>
- Flórez-Salamanca, L., Secades-Villa, R., Hasin, D. S., Cottler, L., Wang, S., Grant, B. F., & Blanco, C. (2013). Probability and predictors of transition from abuse to dependence on alcohol, cannabis, and cocaine: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 39(3), 168–179. <https://doi.org/10.3109/00952990.2013.772618>
- Fölsz, O., Trouche, S., & Croset, V. (2023). Adult-born neurons add flexibility to hippocampal memories. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 178. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2023.1128623/BIBTEX>
- Fotros, A., Casey, K. F., Larcher, K., Verhaeghe, J. A. J., Cox, S. M. L., Gravel, P., Reader, A. J.,

- Dagher, A., Benkelfat, C., & Leyton, M. (2013). Cocaine Cue-Induced Dopamine Release in Amygdala and Hippocampus: A High-Resolution PET [18F]Fallypride Study in Cocaine Dependent Participants. *Neuropsychopharmacology*, 38(9), 1780. <https://doi.org/10.1038/NPP.2013.77>
- Fouyssac, M., Puaud, M., Ducret, E., Marti-Prats, L., Vanhille, N., Ansquer, S., Zhang, X., Belin-Rauscent, A., Giuliano, C., Houeto, J. L., Everitt, B. J., & Belin, D. (2021). Environment-dependent behavioral traits and experiential factors shape addiction vulnerability. *The European Journal of Neuroscience*, 53(6), 1794–1808. <https://doi.org/10.1111/EJN.15087>
- Franjic, D., Skarica, M., Ma, S., Arellano, J. I., Tebbenkamp, A. T. N., Choi, J., Xu, C., Li, Q., Morozov, Y. M., Andrijevic, D., Vrselja, Z., Spajic, A., Santpere, G., Li, M., Zhang, S., Liu, Y., Spurrier, J., Zhang, L., Gudelj, I., ... Sestan, N. (2022). Transcriptomic taxonomy and neurogenic trajectories of adult human, macaque, and pig hippocampal and entorhinal cells. *Neuron*, 110(3), 452–469.e14. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2021.10.036>
- Frankland, P. W., Köhler, S., & Josselyn, S. A. (2013). Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends in Neurosciences*, 36(9), 497–503. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2013.05.002>
- Freese, L., Almeida, F. B., Heidrich, N., Hansen, A. W., Steffens, L., Steinmetz, A., Moura, D. J., Gomez, R., & Barros, H. M. T. (2018). Environmental enrichment reduces cocaine neurotoxicity during cocaine-conditioned place preference in male rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 169, 10–15. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2018.04.001>
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., & See, R. E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296–309. <https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1300579>
- Galaj, E., Shukur, A., Manuszak, M., Newman, K., & Ranaldi, R. (2017). No evidence that environmental enrichment during rearing protects against cocaine behavioral effects but as an intervention reduces an already established cocaine conditioned place preference. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 156, 56–62. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2017.04.005>
- Gallagher, M., Burwell, R., & Burchinal, M. R. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 107(4), 618–626. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.107.4.618>
- Gallagher, M., & Nicolle, M. M. (1993). Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behavioural Brain Research*, 57(2), 155–162. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90131-9](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90131-9)
- Gao, A., Xia, F., Guskjolen, A. J., Ramsaran, A. I., Santoro, A., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2018). Elevation of hippocampal neurogenesis induces a temporally graded pattern of forgetting of contextual fear memories. *Journal of Neuroscience*, 38(13), 3190–3198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3126-17.2018>
- Gao, Y., Syed, M., & Zhao, X. (2023). Mechanisms underlying the effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 33(4), 373. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23520>

- García-Fuster, M. J., Flagel, S. B., Mahmood, S. T., Mayo, L. M., Thompson, R. C., Watson, S. J., & Akil, H. (2011). Decreased Proliferation of Adult Hippocampal Stem Cells During Cocaine Withdrawal: Possible Role of the Cell Fate Regulator FADD. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2303. <https://doi.org/10.1038/NPP.2011.119>
- García-Fuster, M. J., Parsegian, A., Watson, S. J., Akil, H., & Flagel, S. B. (2017). Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis selectively in adult bred low-responder rats. *Psychopharmacology*, 234(8), 1293–1305. <https://doi.org/10.1007/S00213-017-4566-0>
- García-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *The European Journal of Neuroscience*, 31(1), 79. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2009.07045.X>
- Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005464>
- Garthe, A., & Kempermann, G. (2013). An old test for new neurons: Refining the morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00063>
- Garthe, A., Roeder, I., & Kempermann, G. (2016). Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 26(2), 261–271. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22520>
- Gawin, F. H. (1991). Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science (New York, N.Y.)*, 251(5001), 1580–1586. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2011738>
- Ge, S., Goh, E. L. K., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2005). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 2005 439:7076, 439(7076), 589–593. <https://doi.org/10.1038/nature04404>
- Ge, S., Yang, C. hao, Hsu, K. sen, Ming, G. li, & Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.002>
- Georg Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., & Peterson, D. A. (2016). Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025981>
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature Reviews Neuroscience* 2011 12:11, 12(11), 652–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3119>
- Gómez-Pinilla, F., So, V., & Kesslak, J. P. (2001). Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Research*, 904(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02394-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02394-0)
- Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Shtrahman, M., Johnston, S. T., Schafer, S. T., Parylak, S. L., Tran, T., Chang, T., & Gage, F. H. (2016). In vivo imaging of dendritic pruning in dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 19(6), 788–791. <https://doi.org/10.1038/NN.4301>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, 167(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>

- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260–265. <https://doi.org/10.1038/6365>
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. M., & Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(7), 2492–2498. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02492.1997>
- Grant, S., London, E. D., Newlin, D. B., Villemagne, V. L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R. L., Kimes, A. S., & Margolin, A. (1996). Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 12040–12045. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.21.12040>
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1700–1706. <https://doi.org/10.1038/nn.3260>
- Gubert, C., & Hannan, A. J. (2021). Exercise mimetics: harnessing the therapeutic effects of physical activity. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(11), 862–879. <https://doi.org/10.1038/S41573-021-00217-1>
- Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 599–606. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2005.08.018>
- Hamilton, G. F., Boschen, K. E., Goodlett, C. R., Greenough, W. T., & Klintsova, A. Y. (2012). Housing in environmental complexity following wheel running augments survival of newly generated hippocampal neurons in a rat model of binge alcohol exposure during the third trimester equivalent. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 36(7), 1196–1204. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2011.01726.X>
- Hamilton, G. F., Jablonski, S. A., Schiffino, F. L., St. Cyr, S. A., Stanton, M. E., & Klintsova, A. Y. (2014). Exercise and environment as an intervention for neonatal alcohol effects on hippocampal adult neurogenesis and learning. *Neuroscience*, 265, 274–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.061>
- Hannula, D. E., & Duff, M. C. (2017). The Hippocampus from Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition. *The Hippocampus from Cells to Systems: Structure, Connectivity, and Functional Contributions to Memory and Flexible Cognition*, 1–589. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50406-3/COVER>
- Harrasz, M. M., Guha, P., Kang, I. G., Semenza, E. R., Malla, A. P., Song, Y. J., Reilly, L., Treisman, I., Cortés, P., Coggiano, M. A., Veeravalli, V., Rais, R., Tanda, G., & Snyder, S. H. (2021). Cocaine-induced locomotor stimulation involves autophagic degradation of the dopamine transporter. *Molecular Psychiatry* 2021 26:2, 26(2), 370–382. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00978-y>
- Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O'Keefe, J. (2013). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1635). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2012.0510>
- Hayes, A. F. (2013). Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process

- Analysis: A regression-based approach. In *Guilford Press*.
- Hearing, C. M., Chang, W. C., Szuhany, K. L., Deckersbach, T., Nierenberg, A. A., & Sylvia, L. G. (2016). Physical Exercise for Treatment of Mood Disorders: A Critical Review. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 3(4), 350–359. <https://doi.org/10.1007/S40473-016-0089-Y/METRICS>
- Hilderbrand, E. R., & Lasek, A. W. (2014). Sex differences in cocaine conditioned place preference in C57BL/6J mice. *Neuroreport*, 25(2), 105–109. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000053>
- Hill, A. S., Sahay, A., & Hen, R. (2015). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 40(10), 2368–2378. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.85>
- Hitchcock, L. N., & Lattal, K. M. (2018). Involvement of the dorsal hippocampus in expression and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Hippocampus*, 28(3), 226–238. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22826>
- Hoffmann, C. M., Petrov, M. E., & Lee, R. E. (2021). Aerobic physical activity to improve memory and executive function in sedentary adults without cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Medicine Reports*, 23. <https://doi.org/10.1016/J.PMEDR.2021.101496>
- Holzschneider, K., Wolbers, T., Röder, B., & Hötting, K. (2012). Cardiovascular fitness modulates brain activation associated with spatial learning. *NeuroImage*, 59(3), 3003–3014. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2011.10.021>
- Homberg, J. R., Karel, P., & Verheij, M. M. M. (2014). Individual differences in cocaine addiction: maladaptive behavioural traits. *Addiction Biology*, 19(4), 517–528. <https://doi.org/10.1111/ADB.12036>
- Hötting, K., & Röder, B. (2013). Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.005>
- Huang, A. M., Jen, C. J., Chen, H. F., Yu, L., Kuo, Y. M., & Chen, H. I. (2006). Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neural Transmission*, 113(7), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0359-4>
- Huckleberry, K. A., Shue, F., Copeland, T., Chitwood, R. A., Yin, W., & Drew, M. R. (2018). Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(12), 2487–2496. <https://doi.org/10.1038/S41386-018-0109-6>
- Huston, J. P., Silva, M. A. D. S., Topic, B., & Müller, C. P. (2013). What's conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(3), 162–166. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2013.01.004>
- Itzhak, Y., & Anderson, K. L. (2012). Changes in the magnitude of drug-unconditioned stimulus during conditioning modulate cocaine-induced place preference in mice. *Addiction Biology*, 17(4), 706–716. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00334.x>
- Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., Gage, F. H., Song, H., & Lie, D. C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for*

- Neuroscience*, 29(25), 7966–7977. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1054-09.2009>
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., & Gage, F. H. (2009). Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(2), 147–154. <https://doi.org/10.1101/LM.1172609>
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., & Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11946–11950. <https://doi.org/10.1073/PNAS.182296499>
- Johnston, S. T., Shtrahman, M., Parylak, S., Gonçalves, T., & Gage, F. H. (2016). Paradox of Pattern Separation and Adult Neurogenesis: A Dual Role for New Neurons Balancing Memory Resolution and Robustness HHS Public Access. *Neurobiol Learn Mem*, 129, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.013>
- Kampman, K. M. (2019). The treatment of cocaine use disorder. *Science Advances*, 5(10), 1532–1548. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAX1532>
- Kapgal, V., Prem, N., Hegde, P., Laxmi, T. R., & Kutty, B. M. (2016). Long term exposure to combination paradigm of environmental enrichment, physical exercise and diet reverses the spatial memory deficits and restores hippocampal neurogenesis in ventral subicular lesioned rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130, 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.01.013>
- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science (New York, N.Y.)*, 197(4308), 1092–1094. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.887941>
- Karssemeijer, E. G. A., Aaronson, J. A., Bossers, W. J. R., Donders, R., Olde Rikkert, M. G. M., & Kessels, R. P. C. (2019). The quest for synergy between physical exercise and cognitive stimulation via exergaming in people with dementia: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13195-018-0454-Z>
- Karssemeijer, E. G. A., Aaronson, J. A., Bossers, W. J., Smits, T., Olde Rikkert, M. G. M., & Kessels, R. P. C. (2017). Positive effects of combined cognitive and physical exercise training on cognitive function in older adults with mild cognitive impairment or dementia: A meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 40(September), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.003>
- Kaufman, J. N., Ross, T. J., Stein, E. A., & Garavan, H. (2003). Cingulate hypoactivity in cocaine users during a GO-NOGO task as revealed by event-related functional magnetic resonance imaging. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(21), 7839–7843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07839.2003>
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H., & Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 10(3), 355–362. <https://doi.org/10.1038/NN1847>
- Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), 3306–3311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03306.2002>
- Kempermann, G. (2002). Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis.

- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience* 20:4, 20(4), 235–245. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x>
- Kempermann, G. & G. F. H. (1999). *Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal* - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10401646/>
- Kempermann, G., Fabel, K., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Garthe, A., & Wolf, S. A. (2010). Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Frontiers in Neuroscience*, 4(DEC). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2010.00189>
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A. F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisén, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 23(1), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 447–452. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2004.05.013>
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. In *Nature* (Vol. 386, Issue 6624, pp. 493–495). <https://doi.org/10.1038/386493a0>
- Keralapurath, M. M., Briggs, S. B., & Wagner, J. J. (2017). Cocaine self-administration induces changes in synaptic transmission and plasticity in ventral hippocampus. *Addiction Biology*, 22(2), 446–456. <https://doi.org/10.1111/ADB.12345>
- Keshavan, M. S., Vinogradov, S., Rumsey, J., Sherrill, J., & Wagner, A. (2014). Cognitive training in mental disorders: update and future directions. *The American Journal of Psychiatry*, 171(5), 510–522. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2013.13081075>
- Kilts, C. D., Schweitzer, J. B., Quinn, C. K., Gross, R. E., Faber, T. L., Muhammad, F., Ely, T. D., Hoffman, J. M., & Drexler, K. P. G. (2001). Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. *Archives of General Psychiatry*, 58(4), 334–341. <https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.58.4.334>
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 675–677. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1585183>
- Kjonigsen, L. J., Lillehaug, S., Bjaalie, J. G., Witter, M. P., & Leergaard, T. B. (2015). Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging. *NeuroImage*, 108, 441–449. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2014.12.080>
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., Horvat, V., Volk, B., & Kempermann, G. (2010). Murine Features of Neurogenesis in the Human Hippocampus across the Lifespan from 0 to 100 Years. *PLOS ONE*, 5(1), e8809. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008809>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2006). Animal Models of Drug Addiction. *Neurobiology of Addiction*, 23–67. <https://doi.org/10.1016/B978-012419239-3/50039-4>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/NPP.2009.110>

- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet. Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kosten, T. R., Scanley, B. E., Tucker, K. A., Oliveto, A., Prince, C., Sinha, R., Potenza, M. N., Skudlarski, P., & Wexler, B. E. (2006). Cue-induced brain activity changes and relapse in cocaine-dependent patients. *Neuropsychopharmacology*, 31(3), 644–650. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300851>
- Kramar, C. P., Flavia Barbano, M., & Medina, J. H. (2014). Dopamine D1/D5 receptors in the dorsal hippocampus are required for the acquisition and expression of a single trial cocaine-associated memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 116, 172–180. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2014.10.004>
- Kreek, M. J., Nielsen, D. A., Butelman, E. R., & LaForge, K. S. (2005). Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1450–1457. <https://doi.org/10.1038/NN1583>
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., & Kempermann, G. (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1505–1513. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.016>
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of Comparative Neurology*, 467(4), 455–463. <https://doi.org/10.1002/CNE.10945>
- Kuhar, M. J., Ritz, M. C., & Boja, J. W. (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends in Neurosciences*, 14(7), 299–302. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90141-G](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90141-G)
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & Memory*, 23(10), 515. <https://doi.org/10.1101/LM.042192.116>
- Ladrón de Guevara-Miranda, D., Moreno-Fernández, R. D., Gil-Rodríguez, S., Rosell-Valle, C., Estivill-Torrús, G., Serrano, A., Pavón, F. J., Rodríguez de Fonseca, F., Santín, L. J., & Castilla-Ortega, E. (2019). Lysophosphatidic acid-induced increase in adult hippocampal neurogenesis facilitates the forgetting of cocaine-contextual memory. *Addiction Biology*, 24(3), 458–470. <https://doi.org/10.1111/adb.12612>
- Langdon, K. D., & Corbett, D. (2012). Improved working memory following novel combinations of physical and cognitive activity. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 26(5), 523–532. <https://doi.org/10.1177/1545968311425919>
- Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., Van Praag, H., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4(12), 2349–2360. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040409>
- Lappan, S. N., Brown, A. W., & Hendricks, P. S. (2020). Dropout rates of in-person psychosocial substance use disorder treatments: a systematic review and meta-

- analysis. *Addiction*, 115(2), 201–217. <https://doi.org/10.1111/ADD.14793>
- Lauenroth, A., Ioannidis, A. E., & Teichmann, B. (2016). Influence of combined physical and cognitive training on cognition: a systematic review. *BMC Geriatrics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12877-016-0315-1>
- Lazic, S. E. (2012). Using causal models to distinguish between neurogenesis-dependent and -independent effects on behaviour. *Journal of the Royal Society, Interface*, 9(70), 907–917. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0510>
- Lazic, S. E., Fuss, J., & Gass, P. (2014). Quantifying the behavioural relevance of hippocampal neurogenesis. *PLoS ONE*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113855>
- LeCocq, M. R., Randall, P. A., Besheer, J., & Chaudhri, N. (2020). Considering Drug-Associated Contexts in Substance Use Disorders and Treatment Development. *Neurotherapeutics*, 17(1), 43–54. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00824-2>
- Leeman, R. F., Robinson, C. D., Waters, A. J., & Sofuoglu, M. (2014). A Critical Review of the Literature on Attentional Bias in Cocaine Use Disorder and Suggestions for Future Research. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 22(6), 469. <https://doi.org/10.1037/A0037806>
- Lemaire, V., Tronel, S., Montaron, M. F., Fabre, A., Dugast, E., & Abrous, D. N. (2012). Long-Lasting Plasticity of Hippocampal Adult-Born Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 32(9), 3101. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4731-11.2012>
- Lespine, L. F., & Tirelli, E. (2019). No evidence that wheel-running exercise impacts cocaine conditioned place preference in male C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 365, 110–113. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2019.03.002>
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., & Shors, T. J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(34), 7477–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0204-04.2004>
- Li, H., Liang, A., Guan, F., Fan, R., Chi, L., & Yang, B. (2013). Regular treadmill running improves spatial learning and memory performance in young mice through increased hippocampal neurogenesis and decreased stress. *Brain Research*, 1531, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.041>
- Li, Y. D., Luo, Y. J., Chen, Z. K., Quintanilla, L., Cherasse, Y., Zhang, L., Lazarus, M., Huang, Z. L., & Song, J. (2022). Hypothalamic modulation of adult hippocampal neurogenesis in mice confers activity-dependent regulation of memory and anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience*, 25(5), 630–645. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01065-x>
- Li, Y. D., Luo, Y. J., & Song, J. (2023). Optimizing memory performance and emotional states: multi-level enhancement of adult hippocampal neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 79, 102693. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102693>
- Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology*, 80(6), 281–307. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2006.11.007>
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron*, 46(5), 703–713. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.05.002>
- Liu, J. F., Tian, J., & Li, J. X. (2019). Modulating reconsolidation and extinction to regulate

- drug reward memory. *The European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2503.  
<https://doi.org/10.1111/EJN.14072>
- Lods, M., Pacary, E., Mazier, W., Farrugia, F., Mortessagne, P., Masachs, N., Charrier, V., Massa, F., Cota, D., Ferreira, G., Abrous, D. N., & Tronel, S. (2021). Adult-born neurons immature during learning are necessary for remote memory reconsolidation in rats. *Nature Communications*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22069-4>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162), 1145–1148.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8178174>
- Lopez-Quintero, C., Cobos, J. P. de los, Hasin, D. S., Okuda, M., Wang, S., Grant, B. F., & Blanco, C. (2011). Probability and predictors of transition from first use to dependence on nicotine, alcohol, cannabis, and cocaine: results of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *Drug and Alcohol Dependence*, 115(1–2), 120–130. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2010.11.004>
- Lou, S. jie, Liu, J. yan, Chang, H., & Chen, P. jie. (2008). Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Research*, 1210, 48–55.  
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.02.080>
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V., & Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), 445–456.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017>
- Lüscher, C., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2020). The transition to compulsion in addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(5), 247–263.  
<https://doi.org/10.1038/S41583-020-0289-Z>
- Lynch, W. J., Piehl, K. B., Acosta, G., Peterson, A. B., & Hemby, S. E. (2010). Aerobic exercise attenuates reinstatement of cocaine-seeking behavior and associated neuroadaptations in the prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*, 68(8), 774.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2010.06.022>
- Mahoney, J. J. (2019). Cognitive Dysfunction in Individuals With Cocaine Use Disorder: Potential Moderating Factors and Pharmacological Treatments. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 27(3), 203. <https://doi.org/10.1037/PHA0000245>
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(24), 9104–9110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09104.2000>
- Marhe, R., Luijten, M., Van De Wetering, B. J. M., Smits, M., & Franken, I. H. A. (2013). Individual differences in anterior cingulate activation associated with attentional bias predict cocaine use after treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(6), 1085–1093.  
<https://doi.org/10.1038/NPP.2013.7>
- Marlatt, M. W., Potter, M. C., Lucassen, P. J., & van Praag, H. (2012). Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Developmental Neurobiology*, 72(6), 943–952.  
<https://doi.org/10.1002/DNEU.22009>
- Martin, T., LaRowe, S. D., & Malcolm, R. (2010). Progress in Cue Exposure Therapy for the Treatment of Addictive Disorders: A Review Update. *The Open Addiction Journal*, 3(2),

92-101. <https://doi.org/10.2174/1874941001003020092>

- Martinez-Canabal, A., Akers, K. G., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2013). Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus*, 23(1), 66-74. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22054>
- Mateo, Y., Lack, C. M., Morgan, D., Roberts, D. C. S., & Jones, S. R. (2005). Reduced Dopamine Terminal Function and Insensitivity to Cocaine Following Cocaine Binge Self-Administration and Deprivation. *Neuropsychopharmacology* 2005 30:8, 30(8), 1455-1463. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300687>
- Mateus-Pinheiro, A., Pinto, L., Bessa, J. M., Morais, M., Alves, N. D., Monteiro, S., Patrício, P., Almeida, O. F., & Sousa, N. (2013). Sustained remission from depressive-like behavior depends on hippocampal neurogenesis. *Translational Psychiatry*, 3. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.141>
- Mathews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A. F., & Gage, F. H. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(22), 4479-4490. <https://doi.org/10.1002/CNE.22489>
- McHugh, S. B., Lopes-dos-Santos, V., Gava, G. P., Hartwich, K., Tam, S. K. E., Bannerman, D. M., & Dupret, D. (2022). Adult-born dentate granule cells promote hippocampal population sparsity. *Nature Neuroscience*, 25(11), 1481-1491. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01176-5>
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Fanselow, M. S., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5834), 94-99. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1140263>
- McKendrick, G., & Graziane, N. M. (2020). Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2020.582147>
- McKenzie, S., Robinson, N. T. M., Herrera, L., Churchill, J. C., & Eichenbaum, H. (2013). Learning Causes Reorganization of Neuronal Firing Patterns to Represent Related Experiences within a Hippocampal Schema. *Journal of Neuroscience*, 33(25), 10243-10256. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0879-13.2013>
- Merkle, F. T., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 704-709. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2006.09.008>
- Meyers, R. A., Zavala, A. R., Speer, C. M., & Neisewander, J. L. (2006). Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 401-412. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.2.401>
- Modi, M. N., Dhawale, A. K., & Bhalla, U. S. (2014). CA1 cell activity sequences emerge after reorganization of network correlation structure during associative learning. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01982>
- Mohapel, P., Mundt-Petersen, K., Brundin, P., & Frielingsdorf, H. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 142(3), 609-613. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.033>
- Montero-Odasso, M., Zou, G., Speechley, M., Almeida, Q. J., Liu-Ambrose, T., Middleton, L. E., Camicioli, R., Bray, N. W., Li, K. Z. H., Fraser, S., Pieruccini-Faria, F., Berryman, N.,

- Lussier, M., Shoemaker, J. K., Son, S., & Bherer, L. (2023). Effects of Exercise Alone or Combined with Cognitive Training and Vitamin D Supplementation to Improve Cognition in Adults with Mild Cognitive Impairment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 6(7), E2324465. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.24465>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 2019 25:4, 25(4), 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986 319:6056, 319(6056), 774–776. <https://doi.org/10.1038/319774a0>
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982 297:5868, 297(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Moser, M., & Moser, E. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608–619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Motta-Teixeira, L. C., Takada, S. H., Machado-Nils, A. V., Nogueira, M. I., & Xavier, G. F. (2016). Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks. *Hippocampus*, 26(6), 794–803. <https://doi.org/10.1002/hipo.22560>
- Mueller, D., & Stewart, J. (2000). Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural Brain Research*, 115(1), 39–47. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00239-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00239-4)
- Murray, E. A. (2007). The amygdala, reward and emotion. *Trends in Cognitive Sciences*, 11(1), 489–497. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2007.08.013>
- Murray, J. E., Belin-Rauscent, A., Simon, M., Giuliano, C., Benoit-Marand, M., Everitt, B. J., & Belin, D. (2015). Basolateral and central amygdala differentially recruit and maintain dorsolateral striatum-dependent cocaine-seeking habits. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS10088>
- Murray, J. E., Belin, D., & Everitt, B. J. (2012). Double dissociation of the dorsomedial and dorsolateral striatal control over the acquisition and performance of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(11), 2456–2466. <https://doi.org/10.1038/NPP.2012.104>
- Mustroph, M. L., Merritt, J. R., Holloway, A. L., Pinardo, H., Miller, D. S., Kilby, C. N., Bucko, P., Wyer, A., & Rhodes, J. S. (2015). Increased adult hippocampal neurogenesis is not necessary for wheel running to abolish conditioned place preference for cocaine in mice. *European Journal of Neuroscience*, 41(2), 216–226. <https://doi.org/10.1111/ejn.12782>
- Mustroph, M. L., Pinardo, H., Merritt, J. R., & Rhodes, J. S. (2016). Parameters for abolishing conditioned place preference for cocaine from running and environmental

- enrichment in male C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 312, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.049>
- Mustroph, M. L., Pinaro, H., Merritt, J. R., & Rhodes, J. S. (2016). Parameters for abolishing conditioned place preference for cocaine from running and environmental enrichment in male C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 312, 366–373. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2016.06.049>
- Mustroph, M. L., Stobaugh, D. J., Miller, D. S., Deyoung, E. K., & Rhodes, J. S. (2011). Wheel running can accelerate or delay extinction of conditioned place preference for cocaine in male C57BL/6J mice, depending on timing of wheel access. *The European Journal of Neuroscience*, 34(7), 1161–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07828.x>
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 2014 511:7509, 511(7509), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature13294>
- Nader, M. A., Daunais, J. B., Moore, T., Nader, S. H., Moore, R. J., Smith, H. R., Friedman, D. P., & Porrino, L. J. (2002). Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 27(1), 35–46. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00427-4](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00427-4)
- Nader, M. A., Morgan, D., Gage, H. D., Nader, S. H., Calhoun, T. L., Buchheimer, N., Ehrenkaufer, R., & Mach, R. H. (2006). PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nature Neuroscience*, 9(8), 1050–1056. <https://doi.org/10.1038/NN1737>
- Nardo, T., Batchelor, J., Berry, J., Francis, H., Jafar, D., & Borchard, T. (2022). Cognitive Remediation as an Adjunct Treatment for Substance Use Disorders: A Systematic Review. In *Neuropsychology Review* (Vol. 32, Issue 1). Springer US. <https://doi.org/10.1007/s11065-021-09506-3>
- Naylor, A. S., Persson, A. I., Eriksson, P. S., Jonsdottir, I. H., & Thorlin, T. (2005). Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Neurophysiology*, 93(5), 2406–2414. <https://doi.org/10.1152/jn.01085.2004>
- Nestler, E. J. (2005). The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Science & Practice Perspectives*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1151/SPP05314>
- Nguemeni, C., McDonald, M. W., Jeffers, M. S., Livingston-Thomas, J., Lagace, D., & Corbett, D. (2018). Short- and Long-term Exposure to Low and High Dose Running Produce Differential Effects on Hippocampal Neurogenesis. *Neuroscience*, 369, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.026>
- Nic Dhonnchadha, B. Á., & Kantak, K. M. (2011). Cognitive enhancers for facilitating drug cue extinction: insights from animal models. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 99(2), 229–244. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2011.01.018>
- Nishijima, T., Kamidozono, Y., Ishiizumi, A., Amemiya, S., & Kita, I. (2017). Negative rebound in hippocampal neurogenesis following exercise cessation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 312(3), R347–R357. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00397.2016>
- Nishijima, T., Llorens-Martín, M., Tejada, G. S., Inoue, K., Yamamura, Y., Soya, H., Trejo, J. L., & Torres-Alemán, I. (2013). Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice.

- Behavioural Brain Research*, 245, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.009>
- Noonan, M. A., Bulin, S. E., Fuller, D. C., & Eisch, A. J. (2010). Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(1), 304–315. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4256-09.2010>
- Noonan, M. A., Choi, K. H., Self, D. W., & Eisch, A. J. (2008). Withdrawal from cocaine self-administration normalizes deficits in proliferation and enhances maturity of adult-generated hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(10), 2516–2526. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4661-07.2008>
- Nuechterlein, K. H., McEwen, S. C., Ventura, J., Subotnik, K. L., Turner, L. R., Boucher, M., Casaus, L. R., Distler, M. G., & Hayata, J. N. (2023). Aerobic exercise enhances cognitive training effects in first-episode schizophrenia: Randomized clinical trial demonstrates cognitive and functional gains. *Psychological Medicine*, 53(10), 4751–4761. <https://doi.org/10.1017/S0033291722001696>
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., McLellan, T., & Ehrman, R. (1990). Integrating systematic cue exposure with standard treatment in recovering drug dependent patients. *Addictive Behaviors*, 15(4), 355–365. [https://doi.org/10.1016/0306-4603\(90\)90045-Y](https://doi.org/10.1016/0306-4603(90)90045-Y)
- O'Callaghan, R. M., Ohle, R., & Kelly, Á. M. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 362–366. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2006.10.018>
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51(1), 78–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Informe 2021. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2021. 243 p.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Informe 2022. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2022. 293 p.
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2022), Informe Europeo sobre Drogas 2022: Tendencias y novedades, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.
- Olpe, C., & Jessberger, S. (2023). Cell population dynamics in the course of adult hippocampal neurogenesis: Remaining unknowns. *Hippocampus*, 33(4), 402–411. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23475>
- Oswald, W. D., Gunzelmann, T., Rupprecht, R., & Hagen, B. (2006). Differential effects of single versus combined cognitive and physical training with older adults: the SimA study in a 5-year perspective. *European Journal of Ageing*, 3(4), 179–192. <https://doi.org/10.1007/S10433-006-0035-Z>
- Otis, J. M., Fitzgerald, M. K., & Mueller, D. (2014). Inhibition of hippocampal  $\beta$ -adrenergic receptors impairs retrieval but not reconsolidation of cocaine-associated memory and prevents subsequent reinstatement. *Neuropsychopharmacology*, 39(2), 303–310. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.187>
- Overall, R. W., Zoicher, S., Garthe, A., & Kempermann, G. (2020). Rtrack: a software package

- for reproducible automated water maze analysis. *BioRxiv*, 2020.02.27.967372.  
<https://doi.org/10.1101/2020.02.27.967372>
- Pallotto, M., & Deprez, F. (2014). Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00166>
- Panlilio, L. V., & Goldberg, S. R. (2007). Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction (Abingdon, England)*, 102(12), 1863. <https://doi.org/10.1111/J.1360-0443.2007.02011.X>
- Papp, E. A., Leergaard, T. B., Calabrese, E., Johnson, G. A., & Bjaalie, J. G. (2014). Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain. *NeuroImage*, 97, 374–386. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2014.04.001>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00088-X)
- Peacock, A., Tran, L. T., Larney, S., Stockings, E., Santo, T., Jones, H., Santomauro, D., & Degenhardt, L. (2021). All-cause and cause-specific mortality among people with regular or problematic cocaine use: a systematic review and meta-analysis. *Addiction (Abingdon, England)*, 116(4), 725–742. <https://doi.org/10.1111/ADD.15239>
- Perry, C. J., & Lawrence, A. J. (2017). Addiction, cognitive decline and therapy: seeking ways to escape a vicious cycle. *Genes, Brain, and Behavior*, 16(1), 205–218. <https://doi.org/10.1111/GBB.12325>
- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trincherro, M. F., & Schinder, A. F. (2011). The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7715–7728. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-11.2011>
- Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 215–238. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2005.04.016>
- Pilz, G. A., Bottes, S., Betizeau, M., Jörg, D. J., Carta, S., Simons, B. D., Helmchen, F., & Jessberger, S. (2018). Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6376), 658. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO5056>
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Römer, B., Rodriguez, G. R., Kronenberg, G., & Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77>
- Potenza, M. N., Hong, K. I. A., Lacadie, C. M., Fulbright, R. K., Tuit, K. L., & Sinha, R. (2012). Neural correlates of stress-induced and cue-induced drug craving: influences of sex and cocaine dependence. *The American Journal of Psychiatry*, 169(4), 406–414. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2011.11020289>
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2007). Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. *Neuropsychopharmacology* 2008 33:1, 33(1), 56–72. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301555>
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience*, 26(47), 12237–12241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006>

- Raybuck, J. D., & Lattal, K. M. (2014). Differential effects of dorsal hippocampal inactivation on expression of recent and remote drug and fear memory. *Neuroscience Letters*, 569, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2014.02.063>
- Regier, P. S., Jagannathan, K., Franklin, T. R., Wetherill, R. R., Langleben, D. D., Gawyrsiak, M., Kampman, K. M., & Childress, A. R. (2021). Sustained brain response to repeated drug cues is associated with poor drug-use outcomes. *Addiction Biology*, 26(5), 1–9. <https://doi.org/10.1111/adb.13028>
- Richetin, K., Leclerc, C., Toni, N., Gallopin, T., Pech, S., Roybon, L., & Rampon, C. (2015). Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain*, 138(2), 440–455. <https://doi.org/10.1093/brain/awu354>
- Rimmele, U., Seiler, R., Marti, B., Wirtz, P. H., Ehlert, U., & Heinrichs, M. (2009). The level of physical activity affects adrenal and cardiovascular reactivity to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 190–198. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2008.08.023>
- Rogers, J. L., & See, R. E. (2007). Selective inactivation of the ventral hippocampus attenuates cue-induced and cocaine-primed reinstatement of drug-seeking in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 688–692. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2007.01.003>
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M. E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., & Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *The European Journal of Neuroscience*, 24(7), 1850–1856. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2006.05059.X>
- Rudy, J. W., Barrientos, R. M., & O'Reilly, R. C. (2002). Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behavioral Neuroscience*, 116(4), 530–538. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.116.4.530>
- Ryan, T. J., & Frankland, P. W. (2022). Forgetting as a form of adaptive engram cell plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 23(3), 173–186. <https://doi.org/10.1038/S41583-021-00548-3>
- Sahani, V., Hurd, Y. L., & Bachi, K. (2022). Neural Underpinnings of Social Stress in Substance Use Disorders. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 54, 483. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2021\\_272](https://doi.org/10.1007/7854_2021_272)
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817.Increasing>
- Saheb, M., Khodadadegan, M. A., Negah, S. S., Saburi, E., & Hajali, V. (2023). Effect of a combined program of running exercise and environmental enrichment on memory function and neurogenesis markers in amyloid-beta-induced Alzheimer-like model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 26(12), 1400–1408. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.70269.15277>
- Sampedro-Piquero, P., Ladrón de Guevara-Miranda, D., Pavón, F. J., Serrano, A., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F., Santín, L. J., & Castilla-Ortega, E. (2019). Neuroplastic and cognitive impairment in substance use disorders: a therapeutic potential of cognitive stimulation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 106, 23–48. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2018.11.015>

- Sampedro-Piquero, P., Millón, C., Moreno-Fernández, R. D., García-Fernández, M., Diaz-Cabiale, Z., & Santin, L. J. (2020). Treadmill Exercise Buffers Behavioral Alterations Related to Ethanol Binge-Drinking in Adolescent Mice. *Brain Sciences*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/BRAINSKI10090576>
- Sampedro-Piquero, P., Moreno-Fernández, R. D., Carmen Mañas-Padilla, M., Gil-Rodríguez, S., Gavito, A. L., Pavón, F. J., Pedraza, C., García-Fernández, M., Ladrón de Guevara-Miranda, D., Santín, L. J., & Castilla-Ortega, E. (2018). Training memory without aversion: Appetitive hole-board spatial learning increases adult hippocampal neurogenesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 151, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.03.023>
- Sánchez-Hervás, E., Juan, J., Llorente, M., Pozo, D., & Hervás, E. S. (2012). Recaídas en la adicción a cocaína: una revisión. *Adicciones*, 24(3), 269–280. <https://doi.org/10.20882/ADICCIONES.98>
- Saxe, M. D., Malleret, G., Vronskaya, S., Mendez, I., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., & Hen, R. (2007). Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4642–4646. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0611718104>
- Schaaf, M. J. M., De Kloet, E. R., & Vreugdenhil, E. (2000). Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 3(3), 201–208. <https://doi.org/10.3109/10253890009001124>
- Schefer, V., & Talan, M. I. (1996). Oxygen consumption in adult and aged C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. *Experimental Gerontology*, 31(3), 387–392. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(95\)02032-2](https://doi.org/10.1016/0531-5565(95)02032-2)
- Schmidt-Hieber, C., Jones, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 2004 429:6988, 429(6988), 184–187. <https://doi.org/10.1038/nature02553>
- SCOVILLE, W. B., & MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11–21. <https://doi.org/10.1136/JNNP.20.1.11>
- See, R. E., Elliott, J. C., & Feltenstein, M. W. (2007). The role of dorsal vs ventral striatal pathways in cocaine-seeking behavior after prolonged abstinence in rats. *Psychopharmacology*, 194(3), 321–331. <https://doi.org/10.1007/S00213-007-0850-8>
- Semerci, F., & Maletic-Savatic, M. (2016). Transgenic mouse models for studying adult neurogenesis. *Frontiers in Biology*, 11(3), 151. <https://doi.org/10.1007/S11515-016-1405-3>
- Shah, T., Verdile, G., Sohrabi, H., Campbell, A., Putland, E., Cheetham, C., Dhaliwal, S., Weinborn, M., Maruff, P., Darby, D., & Martins, R. N. (2014). A combination of physical activity and computerized brain training improves verbal memory and increases cerebral glucose metabolism in the elderly. *Translational Psychiatry*, 4(12), e487–9. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.122>
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, 168(1–2), 3–20. <https://doi.org/10.1007/S00213-002-1224-X>
- Sharma, S., Rakoczy, S., & Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87(17–18), 521. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2010.09.004>

- Shors, T. J. (2014). The Adult Brain Makes New Neurons, and Effortful Learning Keeps Them Alive. *Current Directions in Psychological Science*, 23(5), 311–318. <https://doi.org/10.1177/0963721414540167>
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001 410:6826, 410(6826), 372–376. <https://doi.org/10.1038/35066584>
- Sinha, R. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141, 105–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1441.030>
- Smith, M. A., Iordanou, J. C., Cohen, M. B., Cole, K. T., Gergans, S. R., Lyle, M. A., & Schmidt, K. T. (2009). Effects of environmental enrichment on sensitivity to cocaine in female rats: importance of control rates of behavior. *Behavioural Pharmacology*, 20(4), 312. <https://doi.org/10.1097/FBP.0B013E32832EC568>
- Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *Journal of Neuroscience*, 29(46), 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
- Snyder, J. S., Glover, L. R., Sanzone, K. M., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009). The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 19(10), 898. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20552>
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., & Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4), 843–852. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2004.10.009>
- Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R., & Jaber, M. (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 17145–17150. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0806889105>
- Sordo, L., Indave, B. I., Barrio, G., Degenhardt, L., De la Fuente, L., & Bravo, M. J. (2014). Cocaine use and risk of stroke: a systematic review. *Drug and Alcohol Dependence*, 142, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2014.06.041>
- Soria, G., Barbano, M. F., Maldonado, R., & Valverde, O. (2008). A reliable method to study cue-, priming-, and stress-induced reinstatement of cocaine self-administration in mice. *Psychopharmacology*, 199(4), 593–603. <https://doi.org/10.1007/S00213-008-1184-X>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 2018 555:7696, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.002>
- Spealman, R. D., Barrett-Larimore, R. L., Rowlett, J. K., Platt, D. M., & Khroyan, T. V. (1999). Pharmacological and environmental determinants of relapse to cocaine-seeking behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 64(2), 327–336. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00049-0)

- Spronk, D. B., van Wel, J. H. P., Ramaekers, J. G., & Verkes, R. J. (2013). Characterizing the cognitive effects of cocaine: a comprehensive review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(8), 1838–1859. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2013.07.003>
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
- Steffensen, S. C., Taylor, S. R., Horton, M. L., Barber, E. N., Lyle, L. T., Stobbs, S. H., & Allison, D. W. (2008). Cocaine disinhibits dopamine neurons in the ventral tegmental area via use-dependent blockade of GABA neuron voltage-sensitive sodium channels. *The European Journal of Neuroscience*, 28(10), 2028. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06479.X>
- Steiner, B., Zurborg, S., Hörster, H., Fabel, K., & Kempermann, G. (2008). Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*, 154(2), 521–529. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.04.023>
- Stone, S. S. D., Teixeira, C. M., Zaslavsky, K., Wheeler, A. L., Martinez-Canabal, A., Wang, A. H., Sakaguchi, M., Lozano, A. M., & Frankland, P. W. (2011). Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, 21(12), 1348–1362. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20845>
- Sudai, E., Croitoru, O., Shaldubina, A., Abraham, L., Gispan, I., Flaumenhaft, Y., Roth-Deri, I., Kinor, N., Aharoni, S., Ben-Tzion, M., & Yadid, G. (2011). High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. *Addiction Biology*, 16(2), 251–260. <https://doi.org/10.1111/J.1369-1600.2010.00241.X>
- Sun, W., Winseck, A., Vinsant, S., Park, O. H., Kim, H., & Oppenheim, R. W. (2004). Programmed Cell Death of Adult-Generated Hippocampal Neurons Is Mediated by the Proapoptotic Gene Bax. *The Journal of Neuroscience*, 24(49), 11205. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1436-04.2004>
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Swan, A. A., Clutton, J. E., Chary, P. K., Cook, S. G., Liu, G. G., & Drew, M. R. (2014). Characterization of the role of adult neurogenesis in touch-screen discrimination learning. *Hippocampus*, 24(12), 1581–1591. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22337>
- Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science (New York, N.Y.)*, 189(4199), 303–304. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.49928>
- Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 172(1), 49–84. <https://doi.org/10.1002/CNE.901720104>
- Szalay, J. J., Morin, N. D., & Kantak, K. M. (2011). Involvement of the dorsal subiculum and rostral basolateral amygdala in cocaine cue extinction learning in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 33(7), 1299. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07581.X>
- Takeuchi, H., Sekiguchi, A., Taki, Y., Yokoyama, S., Yomogida, Y., Komuro, N., Yamanouchi, T., Suzuki, S., & Kawashima, R. (2010). Training of working memory impacts structural

- connectivity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3297–3303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4611-09.2010>
- Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: A critical period during an immature stage. *Journal of Neuroscience*, 27(12), 3252–3259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4941-06.2007>
- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., & Gage, F. H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 2006 442:7105, 442(7105), 929–933. <https://doi.org/10.1038/nature05028>
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 53(1), 198–214. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2006.08.002>
- Taylor, J. R., Olausson, P., Quinn, J. J., & Torregrossa, M. M. (2009). Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1(Suppl 1), 186–195. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.07.027>
- Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Moreno-Jiménez, E. P., Rodríguez-Moreno, C. B., Márquez-Valadez, B., Gallardo-Caballero, M., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2023). Methods to study adult hippocampal neurogenesis in humans and across the phylogeny. *Hippocampus*, 33(4). <https://doi.org/10.1002/HIPO.23474>
- Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Rodríguez-Moreno, C. B., Trincherro, M. F., Cafini, F., Rábano, A., & Llorens-Martín, M. (2021). Impact of neurodegenerative diseases on human adult hippocampal neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6571), 1106–1113. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABL5163>
- Thompson, A. M., Swant, J., Gosnell, B. A., & Wagner, J. J. (2004). Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience*, 127(1), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.001>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2018). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 693–709. <https://doi.org/10.1007/S00441-017-2735-4>
- Tomasi, D., Wang, G. J., Wang, R., Caparelli, E. C., Logan, J., & Volkow, N. D. (2015). Overlapping patterns of brain activation to food and cocaine cues in cocaine abusers: Association to striatal D2/D3 receptors. *Human Brain Mapping*, 36(1), 120. <https://doi.org/10.1002/HBM.22617>
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., Van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, 10(6), 727–734. <https://doi.org/10.1038/NN1908>
- Torregrossa, M. M., Corlett, P. R., & Taylor, J. R. (2011). Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 609–623. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2011.02.014>
- Torregrossa, M. M., & Taylor, J. R. (2013). Learning to forget: manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacology*, 226(4), 659–672. <https://doi.org/10.1007/S00213-012-2750-9>
- Trincherro, M. F., Koehl, M., Bechakra, M., Delage, P., Charrier, V., Grosjean, N., Ladeveze, E., Schinder, A. F., & Abrous, D. N. (2015). Effects of spaced learning in the water maze

- on development of dentate granule cells generated in adult mice. *Hippocampus*, 25(11), 1314–1326. <https://doi.org/10.1002/hipo.22438>
- Tronel, S., Charrier, V., Sage, C., Maitre, M., Leste-Lasserre, T., & Abrous, D. N. (2015). Adult-born dentate neurons are recruited in both spatial memory encoding and retrieval. *Hippocampus*, 25(11), 1472–1479. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22468>
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H. R., Gage, F. H., & Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7963–7968. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914613107>
- Trouche, S., Bontempi, B., Roulet, P., & Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5919–5924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811054106>
- Trouche, S., Bontempi, B., Roulet, P., Rampon, C., Troucha, S., Bontempi, B., Roulet, P., & Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5919–5924. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321751/>
- Trouche, S., Perestenko, P. V., Van De Ven, G. M., Bratley, C. T., McNamara, C. G., Campo-Urriza, N., Black, S. L., Reijmers, L. G., & Dupret, D. (2016). Recoding a cocaine-place memory engram to a neutral engram in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 19(4), 564–567. <https://doi.org/10.1038/NN.4250>
- Tseng, W., Guan, R., Disterhoft, J. F., & Weiss, C. (2004). Trace eyeblink conditioning is hippocampally dependent in mice. *Hippocampus*, 14(1), 58–65. <https://doi.org/10.1002/HIPO.10157>
- UNODC, *Cocaine – a spectrum of products*, Cocaine Insights 2, UNODC, Vienna, October, 2021.
- UNODC, Informe mundial sobre las drogas 2022 (publicación de las Naciones Unidas, 2022).
- Vafaie, N., & Kober, H. (2022). Association of Drug Cues and Craving with Drug Use and Relapse: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 79(7), 641–650. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2022.1240>
- Van Der Borght, K., Kóbor-Nyakas, D. É., Klauke, K., Eggen, B. J. L., Nyakas, C., Van Der Zee, E. A., & Meerlo, P. (2009). Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: Temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus*, 19(10), 928–936. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20545>
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266–270. <https://doi.org/10.1038/6368>
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 1999 2:3, 2(3), 266–270. <https://doi.org/10.1038/6368>
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christle, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030A>

- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Journal of Neuroscience*, 25(38), 8680–8685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 2009 10:4, 10(4), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Vaynman, S. S., Ying, Z., Yin, D., & Gomez-Pinilla, F. (2006). Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Research*, 1070(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.11.062>
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gómez-Pinilla, F. (2004). Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *Journal of Neuroscience Research*, 76(3), 356–362. <https://doi.org/10.1002/JNR.20077>
- Verdejo-Garcia, A., Albein-Urios, N., Martinez-Gonzalez, J. M., Civit, E., De La Torre, R., & Lozano, O. (2014). Decision-making impairment predicts 3-month hair-indexed cocaine relapse. *Psychopharmacology*, 231(21), 4179–4187. <https://doi.org/10.1007/S00213-014-3563-9>
- Verdejo-Garcia, A., Garcia-Fernandez, G., & Dom, G. (2019). Cognition and addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 21(3), 281–290. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.3/gdom>
- Veyrac, A., Gros, A., Bruel-Jungerman, E., Rochefort, C., Kleine Borgmann, F. B., Jessberger, S., & Laroche, S. (2013). Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 7062–7067. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220558110>
- Vivar, C., Peterson, B. D., & van Praag, H. (2016). Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells. *NeuroImage*, 131, 29–41. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2015.11.031>
- Vivar, C., Potter, M. C., & van Praag, H. (2012). All about running: Synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15, 189–210. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2012\\_220/FIGURES/3](https://doi.org/10.1007/7854_2012_220/FIGURES/3)
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. -J, Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D. J., Dewey, S. L., & Wolf, A. P. (1993). Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse (New York, N.Y.)*, 14(2), 169–177. <https://doi.org/10.1002/SYN.890140210>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.07.046>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Gatley, S. J., Hitzemann, R., Chen, A. D., Dewey, S. L., & Pappas, N. (1997). Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature*, 386(6627), 830–833. <https://doi.org/10.1038/386830A0>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Childress, A. R., Jayne, M., Ma, Y., & Wong, C. (2006). Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), 6583–6588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1544-06.2006>
- Vonmoos, M., Hulka, L. M., Preller, K. H., Jenni, D., Baumgartner, M. R., Stohler, R., Bolla, K.

- I., & Quednow, B. B. (2013). Cognitive dysfunctions in recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity disorder, craving and early age at onset. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 203(1), 35–43. <https://doi.org/10.1192/BJP.BP.112.118091>
- Vonmoos, M., Hulka, L. M., Preller, K. H., Minder, F., Baumgartner, M. R., & Quednow, B. B. (2014). Cognitive impairment in cocaine users is drug-induced but partially reversible: evidence from a longitudinal study. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2200–2210. <https://doi.org/10.1038/NPP.2014.71>
- Wagner, F. A., & Anthony, J. C. (2002). From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 26(4), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00367-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00367-0)
- Wang, D., Wang, Y., Wang, Y., Li, R., & Zhou, C. (2014). Impact of Physical Exercise on Substance Use Disorders: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 9(10), e110728. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0110728>
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., & Poo, M. M. (2015). Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(22), 8384–8393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4682-14.2015>
- Wang, W., Wang, M., Yang, M., Zeng, B., Qiu, W., Ma, Q., Jing, X., Zhang, Q., Wang, B., Yin, C., Zhang, J., Ge, Y., Lu, Y., Ji, W., Wu, Q., Ma, C., & Wang, X. (2022). Transcriptome dynamics of hippocampal neurogenesis in macaques across the lifespan and aged humans. *Cell Research*, 32(8), 729–743. <https://doi.org/10.1038/S41422-022-00678-Y>
- Wexler, B. E., Gottschalk, C. H., Fulbright, R. K., Prohovnik, I., Lacadie, C. M., Rounsaville, B. J., & Gore, J. C. (2001). Functional magnetic resonance imaging of cocaine craving. *The American Journal of Psychiatry*, 158(1), 86–95. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.158.1.86>
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(6), 483–494. <https://doi.org/10.1038/NRN1406>
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. *The Rat Nervous System*, 635–704. <https://doi.org/10.1016/B978-012547638-6/50022-5>
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, A. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161–253. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90009-9)
- Wong, D. F., Kuwabara, H., Schretlen, D. J., Bonson, K. R., Zhou, Y., Nandi, A., Brašić, J. R., Kimes, A. S., Maris, M. A., Kumar, A., Contoreggi, C., Links, J., Ernst, M., Rousset, O., Zukin, S., Grace, A. A., Rohde, C., Jasinski, D. R., Gjedde, A., & London, E. D. (2006). Increased occupancy of dopamine receptors in human striatum during cue-elicited cocaine craving. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 31(12), 2716–2727. <https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1301194>
- Xie, X., Ramirez, D. R., Lasseter, H. C., & Fuchs, R. A. (2010). Effects of mGluR1 antagonism in the dorsal hippocampus on drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology*, 208(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1007/S00213-009-1700-7>

- Xu, Z., Li, J., Zhang, F., Wu, Y., Gao, Y., Liang, J., & Zhang, C. (2011). Working memory task decreases the survival of newly born neurons in hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(3), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.11.013>
- Yamaguchi, M., Suzuki, T., Seki, T., Namba, T., Juan, R., Arai, H., Hori, T., & Asada, T. (2004). Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1025, 351–362. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1316.043>
- Yamaguchi, M., Suzuki, T., Seki, T., Namba, T., Liu, J., Arai, H., Hori, T., & Shiga, T. (2005). Decreased cell proliferation in the dentate gyrus of rats after repeated administration of cocaine. *Synapse (New York, N.Y.)*, 58(2), 63–71. <https://doi.org/10.1002/SYN.20182>
- Yousef, H., Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, I. M., & Schaffer, D. V. (2015). Age-Associated Increase in BMP Signaling Inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(5), 1577–1588. <https://doi.org/10.1002/STEM.1943>
- Zapata, A., Minney, V. L., & Shippenberg, T. S. (2010). Shift from goal-directed to habitual cocaine seeking after prolonged experience in rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(46), 15457–15463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4072-10.2010>
- Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451(7181), 1004–1007. <https://doi.org/10.1038/NATURE06562>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.01.033>
- Zhou, G., Olofsson, J. K., Koubeissi, M. Z., Menelaou, G., Rosenow, J., Schuele, S. U., Xu, P., Voss, J. L., Lane, G., & Zelano, C. (2021). Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems. *Progress in Neurobiology*, 201. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2021.102027>
- Zschucke, E., Heinz, A., & Strhle, A. (2012). Exercise and physical activity in the therapy of substance use disorders. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/901741>



# ANEXOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Full Length Article



## Sequential treadmill exercise and cognitive training synergistically increase adult hippocampal neurogenesis in mice

F. Ávila-Gámiz<sup>a,b</sup>, A.M. Pérez-Cano<sup>a,b</sup>, J.M. Pérez-Berlanga<sup>a,b</sup>, R.M. Mullor-Vigo<sup>a,b</sup>,  
E.N. Zambrana-Infantes<sup>a,b</sup>, L.J. Santín<sup>a,b,\*</sup>, D. Ladrón de Guevara-Miranda<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, Universidad de Málaga, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Spain

Ávila-Gámiz F, Pérez-Cano AM, Pérez-Berlanga JM, Mullor-Vigo RM, Zambrana-Infantes EN, Santín LJ, Ladrón de Guevara-Miranda D. (2023). Sequential treadmill exercise and cognitive training synergistically increase adult hippocampal neurogenesis in mice. *Physiology & Behavior*, 266:114184.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114184>

### Abstract

Combining physical and cognitive training has been suggested to promote further benefits on brain and cognition, which could include synergistic improvement of hippocampal neuroplasticity. In this paper, we investigated whether treadmill exercise followed by a working memory training in the water maze increase adult hippocampal neurogenesis to a greater extent than either treatment alone. Our results revealed that ten days of scheduled running enhance cell proliferation/survival in the short-term as well as performance in the water maze. Moreover, exercised mice that received working memory training displayed more surviving dentate granule cells compared to those untreated or subjected to only one of the treatments. According to these findings, we suggest that combining physical and cognitive stimulation yield synergic effects on adult hippocampal neurogenesis by extending the pool of newly-born cells and subsequently favouring their survival. Future research could take advantage from this non-invasive, multimodal approach to achieve substantial and longer-lasting enhancement in adult hippocampal neurogenesis, which might be relevant for improving cognition in healthy or neurologically impaired conditions.





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

