

## Reducción del impacto del estrés y prevención de déficits asociados con el envejecimiento en ratas: la estimulación postnatal y el enriquecimiento ambiental

Pilar Ferré\*, Rosa M<sup>a</sup>. Escorihuela, Albert Fernández-Teruel, Joan Francesc Núñez, Ernesto García, Berta González\*\*, Bernardo Castellano\*\* y Adolf Tobeña

*Unidad de Psicología Médica. Dpto. de Farmacología y Psiquiatría*

*\*\*Unidad de Histología. Dpto. de Biología Celular y Fisiología*

*Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona*

**Resumen:** Ante situaciones de alarma (o estrés), los organismos desencadenan una serie de reacciones fisiológicas que, si bien son adaptativas, pueden producir a largo plazo efectos nocivos que se relacionan con los procesos neurales del envejecimiento. Se ha hipotetizado que dos manipulaciones efectuadas en las etapas iniciales del desarrollo -el enriquecimiento ambiental y la estimulación postnatal- podrían prevenir o aminorar los déficits cognitivos y neurales asociados al envejecimiento, y que lo harían mediante una reducción permanente de la reactividad emocional de los sujetos. El presente trabajo pretende revisar la principal evidencia que existe al respecto, y presentar resultados adicionales obtenidos en nuestro laboratorio que corroboran dicha hipótesis.

**Palabras Clave:** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales, glucocorticoides, enriquecimiento ambiental, estimulación postnatal, reactividad emocional, ratas Romanas

**Title:** Stress impact reduction and prevention of deficits associated to rats ageing: The post-natal stimulation and the environmental enrichment.

**Abstract:** When organisms perceive any perturbation in the outside world that can disrupt homeostasis, they engage in a set of physiological responses in order to reestablish homeostasis. But, if maintained for a long time, those responses can be damaging and, in fact, they could be related to the appearance of some age-related deficits. Two early manipulations, such as environmental enrichment and postnatal handling have been hypothesized to prevent age-related cognitive and neural deficits in rodents. A long-lasting reduction of emotional reactivity to stress has been proposed as the main mechanism mediating long-term effects of both treatments. The aim of the present work was to revise some previous findings which are in agreement with that proposal, as well as to report some results from our laboratory which replicate and extend that hypothesis.

**Key words:** HPA axis, glucocorticoids, environmental enrichment, postnatal handling, emotional reactivity, Roman rats.

### 1. Genética y Demencia de Alzheimer

En el presente siglo, la esperanza media de vida de los seres humanos ha aumentado notablemente.

Así, mientras en 1900 se encontraba cerca de la cincuentena, actualmente supera ya de largo los 70 años, en los países industrializados (Olshansky et al. 1990, Piel 1993). Las causas de ello han sido, por una parte, los grandes avances biomédicos, con el desarrollo de métodos preventivos y las aplicaciones tecnológicas que han hecho posible la erradicación definitiva de algunas enfermedades o bien el tratamiento paliativo en otras, y por otra el incremento de la calidad de vida. La contrapartida la constituyen las demencias, que

\* **Dirección para correspondencia:** Pilar Ferré. Unidad de Psicología Médica. Dpto. de Farmacología y Psiquiatría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona 08193.

© *Copyright 1994:* Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Murcia, Murcia (España). ISSN: 0212-9728. *Artículo recibido:* 25-10-94, *aceptado:* 3-11-94.

Este trabajo se ha realizado gracias a una ayuda concedida por el FISS (92/0712) y a una Beca concedida por la Generalitat de Catalunya (DOGC 1371, 1991) a Pilar Ferré.

hacen estragos entre la gente mayor, disminuyendo su calidad de vida y provocando muertes prematuras. Gran número de individuos presentan un deterioro prematuro de las funciones mentales siendo, de hecho, la enfermedad de Alzheimer, responsable de un 70% de los casos de envejecimiento patológico. Los enfermos con demencia de Alzheimer pierden la memoria y otras funciones cognitivas, sufren alteraciones emocionales y se sumergen en un declive progresivo e incapacitante hasta perder toda autonomía.

Las primeras observaciones neuropatológicas indicaron que los cerebros de los enfermos de Alzheimer presentaban unas acumulaciones neurales y placas seniles que contenían elementos neuronales (axones, dendritas) degenerados, junto con depósitos de unas determinadas proteínas: las beta-amiloides (Katman, 1986). Este descubrimiento dirigió la investigación al estudio de los mecanismos biológicos que intervienen en la expresión de las proteínas beta-amiloides. Así, se vio que mientras una forma de la enfermedad de Alzheimer, de aparición temprana, parece estar relacionada con un gen situado en el cromosoma 14 (todavía no identificado), otra forma hereditaria y poco común, que se manifiesta antes de los sesenta años, parece relacionarse con una mutación en el gen de la beta-amiloide, situado en el cromosoma 21. En cambio, otras formas más frecuentes y de aparición tardía podrían estar relacionadas con genes del cromosoma 19 (Selkoe, 1993).

Recientemente, el equipo de Allen Roses de la Duke University Medical Center de Carolina del Norte (Corder et al. 1993) ha descubierto que la acumulación anormal y exagerada de proteínas beta-amiloides, junto con material neuronal degenerado, está asociada a la presencia de una variante de la proteína transportadora del colesterol, la apolipoproteína E4 (ApoE4). El gen de la ApoE4 también se encuentra situado en el cromosoma 19. Además, parece ser que, dependiendo de cuál sea la dosis genética de la ApoE4, el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer aumenta mucho y la edad en que aparece puede disminuir de los 84 hasta los 68 años. Así, en un estudio realizado con 42 familias que presentaban la variedad tardía de la enfermedad (la más común), el equipo de Duke descubrió que el riesgo de presentarla era de un

20% para los individuos sin el alelo ApoE4 en ninguno de los dos cromosomas y que aumentaba progresivamente para los individuos heterocigóticos (con el alelo en uno de los cromosomas) y homocigóticos (en ambos cromosomas), hasta un 90% de probabilidad. Estos trabajos han revolucionado la investigación en el campo de la enfermedad de Alzheimer y actualmente el grupo de Carolina del Norte intenta generalizar aquellos resultados a poblaciones humanas mucho más grandes. Si se confirman, será posible diagnosticar precozmente algunos casos de la forma tardía de la enfermedad mediante la presencia de la ApoE4.

## 2. Reactividad emocional y envejecimiento cerebral

Aparte de los espectaculares avances en el conocimiento de la contribución genética a la aparición y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y de otras demencias, desde diversas líneas de investigación se ha estudiado el papel que pueden desempeñar otros factores. Así, se ha trabajado en el área de las deficiencias alimentarias, de las alteraciones metabólicas y endocrinas, y se ha estudiado también la influencia de los sucesos estresantes a lo largo de la vida de los individuos (Sapolsky, 1992).

En las páginas siguientes nos centraremos en el último aspecto, es decir, en el análisis de las propiedades del estrés como inductor de reacciones hormonales y conductuales que pueden ser lesivas para las células nerviosas situadas en áreas directamente implicadas en las capacidades cognitivas (Sapolsky, 1992). En primer lugar nos ocuparemos de las respuestas biológicas desencadenadas por los sucesos aversivos, haciendo hincapié en la secuencia de reacciones hormonales implicadas. Seguidamente mostraremos la evidencia que indica que aquellas reacciones se modifican durante el proceso de envejecimiento. Finalmente, presentaremos algunos trabajos realizados con ratas de laboratorio que sugieren que el mantenimiento (o la excesiva duración o cronicidad) de aquellas reacciones iniciales ante el estrés puede conllevar consecuencias negativas hasta el punto de provocar disfunciones prematuras de las células cerebrales. Aunque se presentarán datos de di-

versos grupos, en algunos puntos de este apartado incluiremos también resultados obtenidos en nuestro laboratorio, para ilustrar la validez de los modelos animales que se presentarán.

### 2.1. Las reacciones de emergencia

Cuando los organismos perciben algún suceso que amenaza su equilibrio, inician una serie de reacciones con el objetivo de movilizar las reservas energéticas hacia los tejidos que las pueden necesitar, al mismo tiempo que paralizan otros procesos hasta que la situación crítica se normaliza. En el sistema endocrino se ponen en marcha una serie de reacciones en cadena, que implican la síntesis y liberación de varias hormonas en diversas áreas cerebrales (el hipotálamo y la hipófisis, esencialmente) y en algunas regiones periféricas, como las glándulas adrenales. La secuencia principal consiste en la activación del llamado eje **hipotalámico-hipofisario-adrenal (eje HPA)** que, simplificada-mente, funciona de la siguiente manera: la sensación de alerta inicial hace que el hipotálamo sintetice la hormona liberadora de corticotropina (CRF), la cual produce en la hipófisis la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo. Cuando la ACTH llega a las glándulas adrenales situadas sobre los riñones (las terceras protagonistas de la cadena), éstas inician la secreción de los corticosteroides o glucocorticoides. Los más característicos son la corticosterona en ratas de laboratorio y el cortisol en monos y humanos.

La función de los corticosteroides consiste en hacer converger los sistemas fisiológicos hacia una serie de reacciones que, en último término, han de facilitar la huida rápida o la lucha agresiva contra el agente amenazador. Con el fin de obtener el máximo rendimiento, se movilizan las reservas energéticas (los depósitos de azúcares y grasas), se incrementa la capacidad cardiovascular y pulmonar (aumenta la frecuencia cardíaca y la vasodilatación de los bronquios), al mismo tiempo que se produce inmunosupresión y se paralizan los procesos digestivos y reacciones anabólicas, como la síntesis de hormonas del crecimiento y hormonas sexuales.

Ya en el torrente sanguíneo, los corticosteroi-

des son transportados a los órganos periféricos y al cerebro, donde actuarán sobre diversas estructuras. Una de ellas, el hipocampo, es especialmente relevante para los procesos neurales que posibilitan el aprendizaje y la memoria. En esta región hay una gran densidad de receptores para los glucocorticoides que se encargan de regular - mediante un sistema de retroalimentación negativa- los niveles de aquellas hormonas en sangre. Así, otra función de los glucocorticoides sería - mediante los receptores situados en el hipocampo y en el mismo hipotálamo- bloquear las reacciones que han llevado a su liberación (se pararía, por tanto, la liberación de CRF y ACTH; De Kloet and Reul 1987). Este sistema de retroalimentación negativa constituye un mecanismo muy importante para controlar la actividad del eje.

Un ejemplo de reacción en situaciones de emergencia son las respuestas fisiológicas desencadenadas cuando las ratas de laboratorio se enfrentan a tareas que implican un conflicto experimental. Una de las situaciones en que nosotros hemos estudiado esas respuestas es el **aprendizaje de evitación activa en dos sentidos**. En esta tarea, el animal ha de aprender a evitar un shock eléctrico pasando al otro compartimento de una jaula lanzadora. La llegada inminente del shock es anunciada por una luz y un sonido, de manera que la respuesta correcta que permitirá evitar el shock consiste en cambiar de compartimento mientras los indicadores emiten señal. En los primeros ensayos la ansiedad juega un papel fundamental, y así lo indica el hecho de que los fármacos ansiolíticos y ansiogénicos pueden mejorar o empeorar, respectivamente, la ejecución inicial de los animales. En la Tabla 1 se muestran estos efectos, facilitadores o dificultadores, sobre el número de evitaciones, de algunas benzodiazepinas ansiolíticas (el alprazolam, diazepam y adinazolam), y de sustancias ansiogénicas que actúan también sobre los receptores benzodiazepínicos, como el FG 7142 o el Ro 15-4513 (Fernández-Teruel et al. 1991).

Utilizando este mismo modelo, observamos que el conflicto experimental provocaba importantes incrementos en los niveles plasmáticos de corticosterona, los cuales correlacionaban negativamente con el rendimiento, de forma que en las ratas que habían realizado menos respuestas de

evitación en una sesión completa de 40 ensayos los niveles de corticosterona eran más elevados, mientras que las ratas más evitadoras (que habían resuelto mejor el conflicto) mostraron niveles inferiores (Boix et al. 1992).

**Tabla 1.** Validación psicofarmacológica de la adquisición de la evitación activa en dos sentidos como modelo de ansiedad. Efecto de sustancias ansiolíticas y ansiógenas (tomado de Fernández-Teruel et al. 1991). \*  $p < .05$  respecto el correspondiente vehículo (Test de Duncan).

Ansiolíticos		
	Dosis	Evitaciones
<b>Vehículo</b>		4.9±1.1
<i>Pentobarbital</i>	1.25	4.4±1.7
<i>Pentobarbital</i>	2.5	6.6±3.0
<i>Pentobarbital</i>	5.0	12.4±2.6*
<b>Vehículo</b>		14.7±2.9
<i>Alprazolam</i>	1.0	21.8±4.7
<i>Alprazolam</i>	1.25	25.2±4.3*
<i>Alprazolam</i>	1.5	23.1±2.3
<i>Diazepam</i>	2.0	14.3±4.4
<i>Diazepam</i>	4.0	31.2±1.3*
<b>Vehículo</b>		14.4±2.7
<i>Adinazolam</i>	1.0	14.0±2.7
<i>Adinazolam</i>	2.0	19.8±4.1
<i>Adinazolam</i>	4.0	19.3±3.4
<i>Adinazolam</i>	6.0	27.9±1.6*
Ansiogénicos		
	Dosis	Evitaciones
<b>Vehículo</b>		16.5±3.7
<i>Ro 15-4513</i>	2.0	16.8±4.5
<i>Ro 15-4513</i>	5.0	13.4±3.4
<i>Ro 15-4513</i>	10.0	3.2±1.0*
<b>Vehículo</b>		6.6±1.5*
<i>FG 7142</i>	5.0	4.0±1.4*
<i>FG 7142</i>	10.0	8.7±3.5*

Resultados paralelos habían sido descritos en humanos por Ursin et al. (1978) al estudiar los aumentos de cortisol en un grupo de 72 soldados durante los 11 primeros saltos de un procedimiento de entrenamiento para saltar con paracaídas. Las medidas se tomaron inmediatamente antes y

20 minutos después del salto. De forma similar a lo que pasó en las ratas durante la adquisición de la evitación activa, las subidas de cortisol (respuesta fisiológica que se produce en los primeros saltos) fueron reduciéndose a medida que los soldados perdían el miedo a saltar, es decir, con la resolución correcta de la tarea. De manera que, al quinto salto, ya no habían diferencias con los niveles de cortisol basales.

Este conjunto de reacciones, que constituyen una respuesta adaptativa en situaciones de emergencia, pueden llegar a ser lesivas si el eje HPA es activado muy a menudo y con mucha intensidad. Por ejemplo, las úlceras de estómago que sufren personas sometidas a presiones psicológicas importantes, podrían ser consecuencia de las alteraciones de los procesos digestivos provocados por aquellas reacciones fisiológicas (Wolf and Wolff 1947, Ader 1979). Otros ejemplos son la hipertensión inducida por el estrés o la mayor susceptibilidad a enfermar, consecuencia de la vulnerabilidad inmunológica (inmunosupresión) que puede acompañar a los estados de ansiedad severa prolongados (Sapolsky 1991). Así pues, resulta que si bien la respuesta hormonal en situaciones de emergencia es vital para el afrontamiento de peligros pasajeros, puede provocar también disfunciones graves si es activada en exceso o si el organismo es incapaz de suspenderla en el momento adecuado. Por tanto, ante el riesgo que comporta una exposición continuada a niveles elevados de glucocorticoides, se entiende la importancia del mecanismo de retroalimentación negativa, por el cual se inhibe la ulterior liberación de CRF y ACTH cuando el organismo percibe que la situación amenazante ha desaparecido.

## 2.2. Envejecimiento y fisiología de la emergencia

Los animales viejos son más espantadizos y miedosos que los jóvenes. Es decir, situaciones que en el individuo joven no generan sensación de peligro, en el viejo pueden ser percibidas como muy críticas. Con el envejecimiento aumentan, por tanto, las oportunidades de sufrir situaciones aversivas y de sentirse amenazado, con lo cual también lo hace el número de respuestas fisiológi-

cas de emergencia.

Las investigaciones llevadas a cabo con roedores viejos demuestran que si bien el funcionamiento básico del eje HPA no cambia con la vejez, sí que hay modificaciones importantes en los niveles basales (en ausencia de estresor alguno) de corticosterona; en la duración de las reacciones hormonales y en el número de receptores para los glucocorticoides en el hipocampo.

Respecto a los niveles basales, en un reciente trabajo Robert Sapolsky (1992) revisó experimentos donde se medían los niveles de corticosterona de ratas jóvenes y viejas durante el día y la noche (ya que, en condiciones basales, la secreción de esta sustancia presenta oscilaciones día-noche) y comprobó que, en la mayoría de los casos, los niveles de hormona eran 4 veces superiores en las ratas viejas si los estudios se habían realizado de día; en las mediciones nocturnas, esa diferencia se doblaba.

En cuanto a la duración de la respuesta del eje HPA, se determinó midiendo las concentraciones plasmáticas de las hormonas en diversos momentos después de un episodio estresante. Sapolsky et al. (1992) intentaron descubrir si había diferencias entre ratas jóvenes y viejas en aquella reacción; para ello se inmovilizaron durante 60 minutos (procedimiento habitual para producir estrés en animales de laboratorio) y a continuación se les midió la corticosterona a intervalos de 60 minutos. En la Figura 1A se ve cómo las ratas viejas mantenían niveles altos en circulación, tres horas después de haber acabado la inmovilización, mientras que las ratas jóvenes habían vuelto a los niveles basales (inmediatamente anteriores al inicio del estrés) al cabo de una hora y media.

En cuanto al tercer aspecto que se modifica con la edad -el número de receptores para los glucocorticoides-, se ha visto que en los animales viejos se produce una pérdida en diversas áreas del hipocampo (Figura 1B) que en algunos casos llega a ser del 50% (Sapolsky 1992). Además, parece que esta disminución en el número de receptores es selectiva para el hipocampo y no se observa en otras zonas como la amígdala, el hipotálamo o el córtex.

Por tanto, respecto a la respuesta endocrina, los organismos viejos se caracterizan por una ma-

yor vulnerabilidad a sentir su equilibrio amenazado, por una mayor concentración de corticosteroides en situación basal, por una mayor dificultad para acabar con la reacción de emergencia cuando ya ha desaparecido el estímulo amenazante, y por una menor densidad de receptores para los glucocorticoides en el hipocampo.

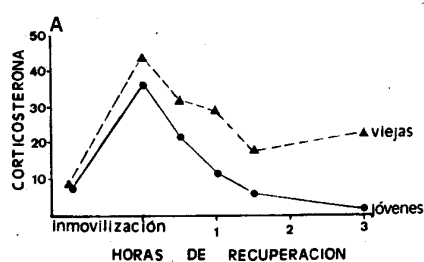


Figura 1A: Variaciones en los niveles de corticosterona plasmática producidas por la inmovilización, en ratas jóvenes y viejas (sacado de Sapolsky, 1992).

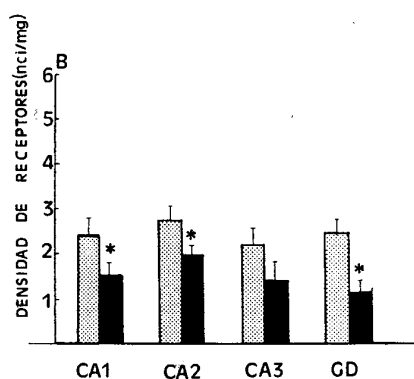


Figura 1B: Densidad de receptores de glucocorticoides en diversas regiones del hipocampo en ratas jóvenes y viejas: capas CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado.. \* p<.05 respecto de las ratas jóvenes (sacado de Sapolsky, 1992).

### 2.3. Los Glucocorticoides pueden lesionar las neuronas

Existe amplia evidencia experimental que muestra que la exposición prolongada a los corticosteroides tiene efectos nocivos que conducen a la muerte neuronal y al aumento de reactividad glial en el hipocampo (dos procesos característicos del envejecimiento) además de producir una

disminución en la capacidad de las neuronas hipocámpicas para enfrentarse a agentes tóxicos o manipulaciones traumáticas que producen degeneración neural, como la hipoxia-isquemia o las convulsiones excitotóxicas (Sapolsky et al. 1986). Esto ha llevado a pensar que la elevación prolongada de los niveles de estas sustancias podría acelerar la pérdida neuronal durante el envejecimiento y aumentar la severidad de los déficits neurológicos inducidos por agentes tóxicos.

Sapolsky (1990) intentó evaluar cuáles eran los efectos de los niveles elevados de corticosteroides, administrados externamente, en el hipocampo de monos. Para ello implantó a cuatro monos una cápsula que liberaba cantidades muy pequeñas, pero constantes, de cortisol en uno de los hipocampos y una cápsula control en el hipocampo contralateral (en dos de los monos la cápsula de cortisol se introdujo en el hipocampo derecho y en los otros dos en el izquierdo). Un año después, los hipocampos que habían recibido cortisol tenían las capas celulares desorganizadas y se les detectaron neuronas atrofiadas con árboles dendríticos muy poco ramificados.

En otros trabajos centrados en el hipocampo, además de evaluar los efectos lesivos de los corticosteroides utilizando medidas morfológicas, se ha investigado si se producen cambios en los marcadores electrofisiológicos del envejecimiento. Así, Steven Kerr y sus colaboradores (1991) estudiaron la actividad eléctrica, es decir, la respuesta funcional, de las neuronas hipocámpicas, en ratas viejas y jóvenes que previamente habían sido sometidas a largos períodos de estrés. Los animales pasaron por un entrenamiento de 6 meses en la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (la cual puede comportar un importante nivel de ansiedad), procedimiento que se había visto que incrementaba los niveles de corticosterona en plasma. Los resultados indicaron que la función neural hipocámpica en los animales viejos, y también en los animales jóvenes sometidos a estrés, era inferior a la detectada en las ratas jóvenes no sometidas al estrés. También demostraron que los largos períodos de estrés provocaban un incremento de la muerte neuronal en las ratas viejas, pero no así en las ratas jóvenes. Los autores concluyeron que, si bien el funcionamiento de las neuronas puede ser alterado

neuronas puede ser alterado como consecuencia de episodios graves sufridos en etapas juveniles, en edades más avanzadas dichos sucesos pueden llegar a provocar la muerte de las células nerviosas. Ello indica que los individuos viejos se muestran más sensibles que los jóvenes a las acciones neurodegenerativas del estrés crónico.

### 3. Estudios experimentales sobre el deterioro de las capacidades cognitivas

Además de haberse estudiado las alteraciones fisiológicas y morfológicas que se producen con el envejecimiento, existen una serie de trabajos que han intentado abordar el problema desde el punto de vista conductual, y para ello se han elaborado modelos centrados, básicamente, en el estudio del deterioro de las capacidades cognitivas.

Una de las estrategias la han constituido los paradigmas experimentales que intentan evaluar la capacidad de orientación espacial y los déficits que en ella aparecen con la edad. Un ejemplo de este tipo de procedimientos es un estudio (Beatty 1988) en que los sujetos (mujeres jóvenes y viejas) tenían que planear y ejecutar la ruta más eficaz (medida por la distancia recorrida) para reunir una serie de productos previamente especificados. La prueba se realizaba en dos situaciones diferentes: a) en un supermercado habitual y b) en un supermercado nuevo, que se les había permitido explorar durante un corto período de tiempo. Las trayectorias de las mujeres jóvenes fueron similares en los dos tipos de supermercados, es decir, fueron eficaces en los dos contextos. En cambio, las trayectorias de las mujeres mayores fueron más largas en el supermercado nuevo que en el conocido, es decir, que en un territorio prácticamente desconocido les era más difícil orientarse.

En animales de laboratorio se han desarrollado paradigmas análogos. Uno de los más utilizados han sido los laberintos, donde los sujetos tienen que aprender y recordar cuál es el camino correcto (previamente determinado por el experimentador) para obtener una determinada recompensa (normalmente en forma de comida o agua) o para acabar con una estimulación aversiva (usualmente en forma de shock eléctrico; Rawlins y Deacon 1993). El interés por utilizar este tipo de

tareas en la evaluación de la capacidad de aprendizaje de animales viejos radica en una serie de resultados experimentales que indican que el hipocampo (que sufre dramáticas modificaciones con la edad) tiene un importante papel en los procesos relacionados con la orientación espacial de los animales (O'Keefe and Nadel 1978). Basado en este dato se ha elaborado un modelo, el "**test acuático de Morris**", que consiste en una piscina redonda, llena de agua, en donde es colocado el animal, y para escapar de la cuál tiene que encontrar una plataforma que está sumergida. Para realizar dicha tarea, el animal se sirve de señales contextuales externas al aparato: elementos espaciales claramente perceptibles como ventanas, puertas y fotografías colgadas en las paredes (Stewart y Morris 1993). Utilizando dicho paradigma, Rapp et al. (1987) observaron que no existían diferencias entre los animales viejos y los jóvenes cuando la plataforma que tenían que localizar no estaba sumergida; en cambio, si la plataforma se sumergía y se colocaba en un lugar diferente, dentro de la piscina, los animales viejos tenían más dificultades para aprender a localizarla en la nueva posición.

#### 4. Prevención del deterioro cognitivo y neural: la estimulación postnatal y el enriquecimiento ambiental

Tras los múltiples trabajos que indicaban que en la enfermedad de Alzheimer se producían alteraciones de diversos sistemas de neurotransmisión cerebral, se han dedicado grandes esfuerzos a la búsqueda de tratamientos curativos o preventivos de tipo farmacológico, es decir, basados en la actuación sobre los sistemas neurales que se creen implicados. Por otra parte, otra línea de investigación ha puesto en evidencia la capacidad que tienen determinados tratamientos de tipo psicológico, concretamente de estimulación infantil, de prevenir la aparición de déficits cognitivos y la degeneración neural asociados con la edad. Seguidamente vamos a hablar de dichas intervenciones (del enriquecimiento ambiental y la estimulación postnatal) y de sus efectos beneficiosos.

##### 4.1. Enriquecimiento ambiental

En el siglo XIX aparecieron una serie de trabajos que evaluaban los efectos de la experiencia en la organización cerebral, aunque los primeros datos publicados sobre los efectos neuroanatómicos del enriquecimiento ambiental datan de 1962 (Rosenzweig et al. 1962). En dichos trabajos, el procedimiento consistía básicamente en situar grupos de animales (8-10 si eran ratas, 15-20 si se trataba de ratones) en jaulas grandes durante un período que variaba entre semanas y meses. En las jaulas había objetos situados en diversos sitios (juguetes, estructuras metálicas que formaban escaleras, etc.) que eran cambiados diariamente o en días alternos. A partir de estos primeros estudios, se han introducido cambios en la duración del proceso de enriquecimiento, en el tipo de estimulación, en el número de animales que se colocan en la jaula, etc. En todos ellos los resultados han indicado, básicamente, que el enriquecimiento ambiental produce modificaciones morfológicas y neuroanatómicas en diversas áreas del Sistema Nervioso Central: aparece un aumento en el peso de la corteza cerebral (efecto especialmente marcado en la corteza occipital) y un incremento en el número de células gliales. También se produce un aumento en el número y tamaño de las ramificaciones dendríticas en algunas áreas visuales. Asimismo se ha detectado una densidad superior de espinas dendríticas y, en las sinapsis, un aumento en el tamaño de las espinas y en el número total y en el área de contactos sinápticos, sobre todo en el hipocampo y en el cerebelo (Rosenzweig et al. 1972).

Recientemente ha sido descrito un efecto del enriquecimiento ambiental en el aumento del número de receptores para los glucocorticoides en el hipocampo, fenómeno que va acompañado de una disminución del nivel de corticosteroides circulantes (Sapolsky 1993). Este dato es de singular importancia, puesto que podría explicar el efecto beneficioso del tratamiento en la prevención de los déficits asociados al envejecimiento ya que, como se ha visto, una exposición prolongada a dichas hormonas tendría un efecto nocivo.

Respecto a los efectos de aquel tratamiento en parámetros conductuales, algunos resultados han

mostrado que los animales enriquecidos son superiores en tareas de aprendizaje espacial (Renner y Rosenzweig 1987). Además, dicha mejora se mantiene a largo plazo, puesto que se ha observado hasta 300 días después de haber acabado el período de enriquecimiento (Denenberg et al. 1968). Por otra parte, algunos datos obtenidos en nuestro laboratorio (Escorihuela et al. 1994) nos han sugerido que el enriquecimiento podría tener efectos en la emotividad de los animales. Por ejemplo, en una "tabla con agujeros", que es una situación experimental empleada clásicamente para medir la actividad exploratoria de los animales, se observó que el grupo de animales enriquecidos pasaba más tiempo explorando los agujeros que el de los no enriquecidos (Tabla 2). Asimismo, en otra prueba usada para evaluar la ansiedad de los animales, el "laberinto elevado en cruz", el grupo enriquecido mostró una mayor actividad en los brazos abiertos del aparato (medida usada tradicionalmente como indicador de la emotividad de los animales, Tabla 2). De acuerdo con lo anterior, se observó que los mismos sujetos ejecutaban un mayor número de evitaciones (resolvían mejor, por tanto, el conflicto) en la tarea de adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Tabla 2). Dichos resultados, junto con los efectos neuroanatómicos del enriquecimiento, nos sugirieron que en este tipo de intervención podría estar implicada una reducción en la emotividad.

#### 4.2. La estimulación postnatal

Otro tratamiento que ha mostrado tener efectos beneficiosos a largo plazo es la estimulación táctil-cinestésica (estimulación postnatal). De hecho, ha constituido un tratamiento de elección (combinada con estímulos visuales, auditivos o sociales; Kramer y Pierpont 1976, Scarr-Salapack y Williams 1973) en la prevención de posibles dificultades en el aprendizaje y alteraciones conductuales en niños prematuros. Así, aunque se han utilizado procedimientos diversos (algunos autores se han centrado en la administración, varias veces al día, de caricias en la cara, extremidades y espalda de los niños, Solkoff et al. 1969, mientras que otros han introducido, además, flexiones de las piernas y los brazos; Field et al. 1986), los re-

sultados de los diversos trabajos han indicado que los niños estimulados son más activos, que engordan más deprisa (Solkoff et al. 1969), que permanecen más tiempo despiertos y que muestran índices más elevados de habituación, orientación y maduración motora y conductual que los no manipulados (Field et al. 1986).

**Tabla 2.** Efectos del enriquecimiento ambiental en la conducta de las ratas en tareas relacionadas con la exploración y la emotividad. \*  $p < .05$  (t-test).

	Laberinto elevado EBA	Tabla de agujeros TE	Evitación activa EV
Control	4.1±0.5	6.6±1.4	47.9±5.3
Enriquecido	5.9±1.1	16.4±4.3*	61.4±3.2*

En 1988, un equipo de investigadores de la McGill University de Montreal (Meaney et al. 1988) administró tratamientos de estimulación táctil y cinestésica a ratas de laboratorio durante el período de lactancia (estimulación postnatal). Esta manipulación retrasaba la muerte de neuronas hipocámpicas y la aparición de déficits de aprendizaje y memoria en ratas viejas, en uno de los tests espaciales usados para evaluar dichos parámetros (el "test acuático de Morris"). Los animales viejos tardaban más tiempo y recorrían más distancia que los jóvenes antes de encontrar la plataforma. En cambio, los animales viejos que habían recibido estimulación táctil/cinestésica durante la lactancia se comportaban como ratas jóvenes. Por otra parte, las ratas viejas mostraban hipersecreción y una pérdida de receptores de glucocorticoides y de neuronas en el hipocampo, mientras que en los animales estimulados no había hipersecreción de glucocorticoides y se observaba una disminución de la muerte neuronal en el hipocampo. Los autores hipotetizaron que estos efectos de la estimulación postnatal se deberían a una menor exposición a los glucocorticoides a lo largo de toda la vida de los animales.

De hecho, estos mismos autores han descrito los efectos del tratamiento de estimulación en el eje HPA. Por una parte, los animales estimulados presentan niveles basales de corticosterona más bajos que los no tratados. Asimismo, el retorno a



la línea basal tras los incrementos producidos por el estrés (ej: inmovilización) es más rápido en los animales estimulados), indicando por tanto una recuperación más rápida. Dichos efectos constituyen precisamente el fenómeno contrario al que se observa con el envejecimiento, es decir, los animales viejos presentan niveles basales de corticosterona más elevados y necesitan más tiempo para retornar al estado basal tras un estrés (Figura 1A, Sapolsky 1992).

La mayor eficacia que presentan los animales precozmente estimulados en retornar el eje HPA a su funcionamiento basal tras un estrés podría estar mediada por una mayor sensibilidad de las neuronas del hipocampo a los glucocorticoides circulantes y por un número superior de receptores para los glucocorticoides en esta área. De hecho, se ha visto que la estimulación postnatal produce un incremento en el número de dichos receptores (Sarricau et al. 1988, Meaney et al. 1989). La importancia de estos resultados radica en que la disminución en el número de receptores para los glucocorticoides comporta un aumento en el nivel de corticoides circulantes, conductas y reacciones fisiológicas menos adaptativas en situaciones estresantes y una mayor probabilidad de aparición de déficits neuroanatómicos (muerte neuronal incrementada en el hipocampo) y déficits cognitivos (de aprendizaje y memoria) que se agravarían con la edad. Por lo tanto, un aumento en el número de aquellos receptores induciría los efectos contrarios: el nivel de corticoides circulantes sería más bajo, retrasándose la aparición de problemas de aprendizaje, déficits de memoria y muerte neuronal en el hipocampo (Meaney et al. 1987, 1988, 1989, 1991).

Meaney et al. (1988) hipotetizaron que el mecanismo explicativo de los efectos de la estimulación postnatal podría ser la **reducción permanente de la reactividad emocional, con una menor exposición, a lo largo de toda la vida del animal, a niveles elevados de corticosteroides**. Por ese motivo, en nuestro laboratorio nos ha interesado estudiar si efectivamente así sucede, es decir, medir en trabajos longitudinales si los animales que han recibido estimulación postnatal son menos reactivos que aquellos que no la han recibido. Para comprobarlo, hemos estudiado la conducta

de estos animales en diversas situaciones experimentales donde se evalúa la reactividad emocional espontánea, el miedo a la novedad y la capacidad para resolver tareas que implican un elevado grado de conflicto.

En los dos apartados que siguen presentaremos trabajos recientemente realizados en nuestro laboratorio, con el objetivo de descubrir si el tratamiento de estimulación post-natal tiene efectos en la reactividad emocional a largo plazo y si la combinación de esta manipulación con el enriquecimiento ambiental produce efectos aditivos, es decir, si las mejoras conseguidas con cada uno de los tratamientos por separado se potencian al ser administradas conjuntamente, ya que ambas muestran, en algunos casos, efectos paralelos en la emotividad que podrían relacionarse con la expresión de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo.

## 5. Estudios recientes de intervención temprana

### 5.1. La estimulación postnatal en pruebas de emotividad

El procedimiento de estimulación postnatal consistió en separar a las crías de sus madres y, manipulándolas muy suavemente, colocarlas en jaulas individuales (forradas con papel suave), donde permanecían durante 15 minutos, para ser devueltas después a su madre. Esta intervención se efectuó cada día a la misma hora, durante los 22 primeros días de vida de los animales (período de lactancia).

Cuando tenían un mes de vida se hizo un primer estudio de los efectos del tratamiento en un test de **reacción a la manipulación** donde se evaluó la reactividad emocional a partir de la observación de si mostraban resistencia a ser cogidos y si intentaban huir cuando el experimentador los tenía atrapados. Los resultados indicaron que los sujetos estimulados durante los primeros días de vida exhibieron una menor reactividad emocional. Así, ningún animal del grupo estimulado se resistió a ser cogido, respecto a un 80% en el grupo no tratado. Una vez cogidos, solamente el 5% de los

estimulados intentaban huir, respecto al 40% de los no estimulados. Respecto a la generalidad de los efectos, han sido también observados tanto en machos como en hembras, manteniéndose cuando los animales son adultos.

Otra situación donde la estimulación postnatal tiene efectos claramente reductores de la reactividad emocional es la **hiponeofagia alimentaria**. Se trata de un modelo basado en la inhibición o disminución de la conducta de ingesta provocada por el miedo a la novedad. El procedimiento consiste en habituar a los animales a comer durante una sola hora cada día a lo largo de 15 días, para que se reduzca su peso al 80% aproximadamente. El día de la prueba se les presenta su comida habitual (o también se les puede dar comida nueva, como chocolate, manzana, galletas, etc; Shepard et al. 1982, Bodnoff et al. 1987) en una situación nueva, produciéndose una inhibición de la ingesta, que puede ser revertida con tratamientos que reducen la ansiedad, como los fármacos ansiolíticos (Shepard et al. 1982, Soubrié et al. 1975). Utilizando dicho modelo en nuestros animales estimulados se observó el mismo fenómeno, es decir, mostraron una menor inhibición alimentaria que el grupo control, ya que pasaron más tiempo comiendo, ingirieron más cantidad de alimento y tardaron menos tiempo en comer que los sujetos no tratados (Figura 2A), lo cual indica que el tratamiento de estimulación postnatal produce una disminución en el miedo a la novedad. Obtuvimos efectos concordantes en el **laberinto elevado en cruz** (Pellow et al. 1985), que es una prueba comúnmente utilizada para medir la reactividad emocional en los roedores. El aparato consta de dos brazos abiertos y dos cerrados y está levantado del suelo; contiene, por tanto, tres elementos ansiógenos: el espacio abierto, la altura y la novedad. Por ello, cuando los animales son colocados en esta situación tienden a pasar la mayor parte del tiempo en los brazos cerrados, y la cantidad de tiempo que pasan en los brazos abiertos es considerada un índice de su reactividad emocional. Ello se debe a que los fármacos ansiolíticos, como las benzodiazepinas clásicas y también fármacos de acción serotoninérgica como la ketanserina y la buspirona (Chopin and Briley 1987) aumentan de forma selectiva el tiempo pasado en los brazos

abiertos, mientras que los ansiogénicos lo disminuyen (Pellow and File 1986), indicando que el test es sensible a manipulaciones del estado emotivo de los animales. En este modelo, nuestros resultados indican que los animales estimulados mostraban más actividad (más entradas) en los brazos abiertos (Figura 2B), lo cual sugiere nuevamente una reducción en la emotividad.

Finalmente, estudiamos los efectos de la estimulación postnatal en la adquisición de la evitación activa en dos sentidos, tarea que (como se ha comentado anteriormente) implica un elevado grado de conflicto entre la tendencia a la evitación pasiva y la activa (ya que, en cada ensayo, los animales han de cruzar al compartimento donde han recibido el shock en el anterior ensayo si quieren evitar el siguiente). Se hicieron 5 sesiones de 30 ensayos cada una. En esta situación, se volvió a constatar la superioridad del grupo estimulado (Figura 2C), como indica el mayor número de evitaciones a lo largo de las 5 sesiones. Así, de un total de 150 ensayos, los animales estimulados realizaron un número medio de 63.5 evitaciones (que representa el 42.3%), mientras que los no tratados solamente llegaron a las 36.3 (24.2%). Además, los efectos de la estimulación postnatal eran ya visibles en los primeros ensayos de la adquisición, justamente aquellos que comportan mayor grado de ansiedad.

Todos estos resultados indicaron que la adaptación, en una etapa muy temprana del desarrollo, a un estrés de mediana intensidad (estimulación postnatal) produce una reducción en la actividad emocional y una mayor capacidad para enfrentarse a las situaciones estresantes durante la vida del individuo: situaciones que implican novedad o conflicto (de difícil resolución para los animales), no solamente en la infancia, sino de forma perdurable a lo largo de toda la vida del organismo (Daly 1973, Fernández-Teruel et al. 1992, Meaney 1988).

## 5.2. Efectos de la combinación de tratamientos en pruebas de aprendizaje y en la histología hipocámpica en ratas Romanas emotivas

Con el objetivo de evaluar si los efectos bene-

ficiosos que habíamos observado con el tratamiento de estimulación postnatal, tanto en lo referente a la reducción de la reactividad emocional como a la prevención de déficits cognitivos y neurales asociados al envejecimiento, podían ser aditivos con los del enriquecimiento ambiental, nos planteamos el estudio de su efecto conjunto.

Una de las tareas escogidas para ponerlo a prueba (dado nuestro interés por estudiar si los dos tratamientos sumaban sus efectos positivos en situaciones de conflicto) fue la adquisición de evitación activa en dos sentidos. Pudimos observar que los sujetos estimulados durante el período de lactancia y enriquecidos hasta los 4 meses de edad (representados por triángulos en la Figura 3A), resolvían mucho mejor la evitación activa en dos sentidos. De hecho, en la segunda sesión de aprendizaje este grupo de ratas hizo aproximadamente 14 evitaciones (cada sesión constaba de 20 ensayos), mientras que el grupo control (representado por los puntos negros en la Figura 3A) únicamente consiguió evitar 5 shocks, lo cual representa casi un 200% de mejora para los animales estimulados (Escorihuela et al. 1994).

En otra serie experimental nos interesó evaluar el efecto de los dos tratamientos en el deterioro de las capacidades cognitivas en animales viejos. Para hacerlo, empleamos el "test acuático de Morris" y decidimos trabajar con unos animales especiales, la cepa de ratas **Roman Low Avoidance (RLA)**, seleccionada genéticamente por una conducta relacionada con la emotividad, como es la gran dificultad en aprender la tarea de adquisición de la evitación activa en dos sentidos. Estos animales son miedosos y muestran una elevada reactividad emocional en medidas conductuales y en parámetros hormonales de reacción al estrés en un amplio abanico de situaciones experimentales. Esto los convierte en sujetos muy valiosos para estudiar la potencia de algunas manipulaciones ambientales en la modulación de caracteres determinados genéticamente.

Los resultados del trabajo indicaron que los animales seniles de 24 meses de edad (las ratas de laboratorio viven poco más de dos años, por regla general) que habían sido sometidos en edades tempranas a estimulación táctil-cinestésica y a un ambiente enriquecido (representados por los trián-

triángulos en la figura 3B), se orientaban con la misma facilidad que las ratas jóvenes (representadas por los cuadrados) en esta tarea acuática de orientación espacial. En cambio, los animales viejos controles recorrían a lo largo de todo el entrenamiento distancias más largas hasta encontrar la plataforma, mientras que en los animales viejos estimulados la distancia era prácticamente la misma que en los jóvenes.

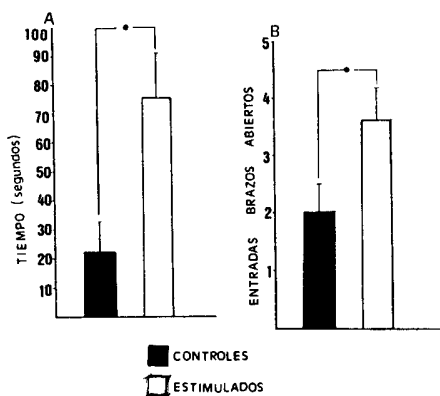


Figura 2A: Tiempo que los animales pasan comiendo en el test de Hiponeofagia Alimentaria. \* p<.05 (t-test).

Figura 2B: Número de entradas efectuadas en los brazos abiertos del Laberinto Elevado en Cruz en animales estimulados y no estimulados. \* p<.05 (t-test).

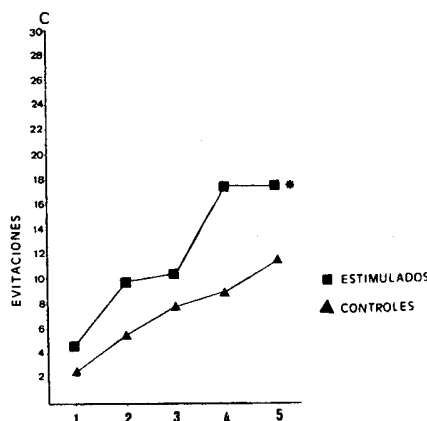
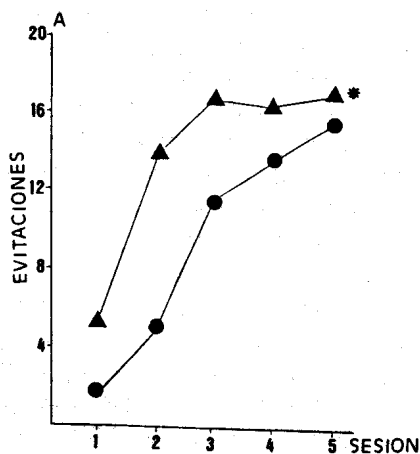
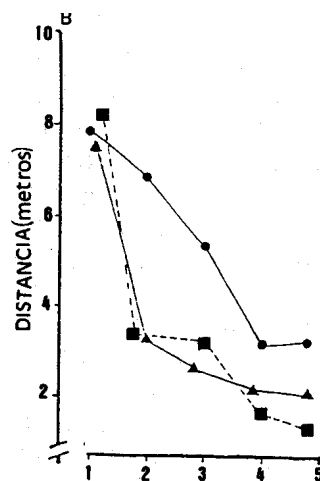


Figura 2C: Número de evitaciones realizadas por los animales control y estimulados a lo largo de 5 sesiones de adquisición de la evitación activa en dos sentidos, de 30 ensayos cada una. Se observa una ejecución superior del grupo estimulado.

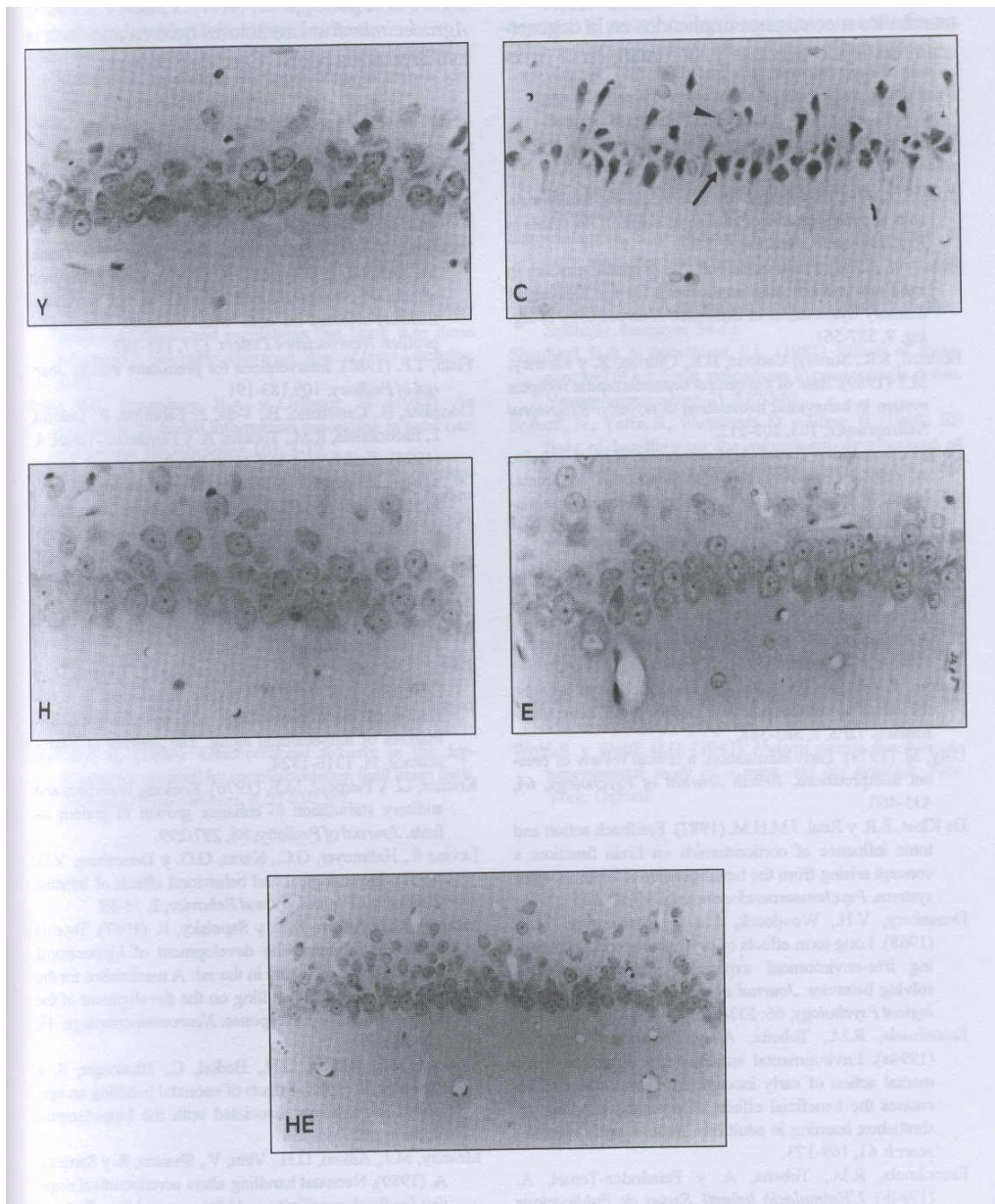
Lo más interesante es que los estudios histológicos preliminares (Figura 4) indican que aquellos tratamientos de estimulación y/o enriquecimiento administrados en estadios iniciales del desarrollo, además de mantener las capacidades cognitivas casi intactas en las ratas viejas, podrían haber retrasado la muerte de las células cerebrales. Tanto es así que, mientras que en las preparaciones de ratas viejas control hay una clara evidencia de atrofia neuronal y desorganización de las capas celulares, las preparaciones de las ratas viejas tratadas muestran un aspecto muy parecido al de las ratas jóvenes: las capas neuronales del hipocampo están perfectamente estructuradas, se ven pocas neuronas atrofiadas y las que hay en funcionamiento muestran citoplasmas bien redondeados (González et al. 1994).



**Figura 3A:** Número de evitaciones hechas por las ratas control (puntos) y estimuladas (triángulos) en 5 sesiones consecutivas de 20 ensayos de evitación activa en dos sentidos (sacado de Escorihuela et al., 1994a). Los animales estimulados presentan una ejecución superior a lo largo de todas las sesiones. \*  $p < .05$  (test de Duncan).



**Figura 3B:** Distancia recorrida por ratas jóvenes de 5 meses (cuadrados), viejas de 24 meses (puntos) y viejas estimuladas y enriquecidas (triángulos) de la cepa RLA/Vern hasta encontrar la plataforma en el Morris Water Test, en 5 sesiones consecutivas de 4 ensayos cada una. Se observa como los animales estimulados y enriquecidos no se diferencian de los jóvenes, y en cambio sí son diferentes de los viejos control. \*  $p < .05$  a lo largo de todas las sesiones.



**Figura 4:** Neuronas piramidales en la capa CA1 del hipocampo en animales jóvenes (Y), animales viejos no tratados y ratas RLA viejas que han recibido un tratamiento de estimulación postnatal, enriquecimiento ambiental o ambos (H, E y HE, respectivamente).

Si todos estos hallazgos se confirman, quizá podríamos hablar de procedimientos que nos permitan retrasar los relojes celulares que ponen en marcha los mecanismos implicados en la degeneración del tejido nervioso y, por tanto, en el envejecimiento. Esta es, pues, el apasionante reto

vejecimiento. Esta es, pues, el apasionante reto que se nos plantea.

*Agradecimientos:* Los autores quieren agradecer la ayuda prestada por M<sup>a</sup> Carmen Reboreda.

## Referencias bibliográficas

- Ader, R. (1971). Experimentally induced gastric lesions: results and implications of studies in animals. *Advances in Psychosomatic Medicine*, 6, 1-39.
- Beatty, W. (1988). Preservation and loss of spatial memory in aged rats and humans: implications for the analysis of memory dysfunction in dementia. *Neurobiology of Aging*, 9, 557-561.
- Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B.E., Quirion, R. y Meaney, M.J. (1989). Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioral habituation to novelty. *Behavioral Neuroscience*, 103, 209-212.
- Boix, F., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M. y Tobeña, A. (1992). Two-way active avoidance as an animal model of anxiety: negative correlation between plasma-corticosterone levels and avoidance performance. *Pharmacological Research*, 25 (Supl.2), 5-6.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261, 921-923.
- Chopin, P. y Briley, M. (1987). Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. *TIPS*, 8, 383-388.
- Daly, M. (1973). Early stimulation: a critical review of present interpretations. *British Journal of Psychology*, 64, 435-460.
- De Kloet, E.R. y Reul, J.M.H.M. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, 12, 83-105.
- Denenberg, V.H., Woodcock, J.M. y Rosenzweig, M.R. (1968). Long-term effects of preweaning and postweaning free-environment experience on rats problem-solving behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66: 533-535.
- Escorihuela, R.M., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (1994a). Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 61, 169-173.
- Escorihuela, R.M., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (1994b). *L'Estimulació Infantil. Servei de Publicacions de la U.A.B.* Bellaterra.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Núñez, J.F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W. y Tobeña, A. (1991). The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: Psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin*, 26, 173-176.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Núñez, J.F., Gomà, M., Driscoll, P. y Tobeña, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neuroscience Letters*, 137, 185-188.
- Field, T.F. (1986). Interventions for premature infants. *Journal of Pediatrics*, 109, 183-191.
- González, B., Castellano, B., Vela, J., Fábregas, P., Dalmau, I., Escorihuela, R.M., Tobeña, A. y Fernández-Teruel, A. (1994). Enrichment and early handling protect against age-related deficits. A behavioral and histological study in RHA/Verh and RLA/Verh rats. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones: "Deterioration, stability and regeneration of the brain during normal aging". Madrid: Edición Peninsular, Serie Universitaria (en prensa).
- Katzman, R. (1986) Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 314, 964-973.
- Kerr, D.S., Campbell, L.W., Applegate M.D., Brodish, A. y Landfield, P.W. (1991). Chronic stress-induced acceleration of electrophysiological and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *The Journal of Neuroscience*, 11, 1316-1324.
- Kramer, L.I. y Pierpont, M.E. (1976). Rocking waterbeds and auditory stimulation to enhance growth of preterm infants. *Journal of Pediatrics*, 88, 297-299.
- Levine S., Haltmeyer, G.C., Karas, G.G. y Denenberg, V.H. (1967). Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiology and Behavior*, 2, 55-59.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H. y Sapolsky, R. (1987). Thyroid hormones influence the development of hippocampal glucocorticoid receptors in the rat: A mechanism for the effects of postnatal handling on the development of the adrenocortical stress response. *Neuroendocrinology*, 45, 278-283.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Berkel, C., Bhatnagar, S. y Sapolsky, R. (1988) Effects of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*, 239: 766-768.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S. y Sarrieau, A. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*, 50:597-604.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bhatnagar, S. y Sapolsky, R. (1991). Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical and cognitive dysfunctions associated

- with aging in female rats. *Neurobiology of Aging*, 12: 31-38.
- O'Keefe, J. y Nadel, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. London: Oxford University Press.
- Olshansky, S.J., Carnes, B.A. y Cassel, C. (1990). In search of Methuselah: estimating the upper limits to human longevity. *Science*, 250: 634-640.
- Pellow S., Chopin P., File S.E. and Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167.
- Pellow, S. y File, S. (1986), Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 525.
- Piel, J. (1993). Medicine: a powerful healing technology seeks institutions and regulations that bring it to those who need it. *Scientific American, Special Issue Medicine*, 4-10.
- Rapp, P.R., Rosenberg, R.A. y Gallager, M. (1987). An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behavioral Neuroscience*, 101, 3-12.
- Rawlins, J.N.P. y Deacon, R.M.J. (1993). Further developments on maze procedures. In: Sahgal A.(Ed.) *Behavioural Neuroscience: A practical approach*, 95-106. New York: Oxford University Press.
- Renner, M.J. y Rosenzweig, M.R. (1987). *Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior*. New York: Springer-Verlag.
- Rosenzweig, M.R., Krech, D., Bennett, E.L. y Diamond, M.C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55, 429-437.
- Sapolsky, R. (1986). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. *Journal of Neuroscience*, 6, 2240-2247.
- Sapolsky, R.M., Uno, H., Rebert, C.S. y Finch, C.E. (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *Journal of Neuroscience*, 10, 2897-2902.
- Sapolsky, R. (1992). *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*. Massachusetts: The Mit Press.
- Sapolsky, R. (1993), Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 57, 175-182.
- Sarrieu, A., Sharma, S. y Meaney, M.J. (1988). Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Developmental Brain Research*, 43,158-162.
- Scarr-Salapack, S. y Williams, M.L. (1973). The effects of early stimulation on low birthweight infants. *Child Development*, 33: 94-101.
- Selkoe, D.J. (1993) Amyloid protein and Alzheimer disease. *Scientific American*, 54-61.
- Shephard, R.A. y Broadhurst, P.L. (1982). Effects of diazepam and of serotonin agonists on hyponeophagia in rats. *Neuropharmacology*, 21, 337-340.
- Solkoff, N., Yaffe, S., Weintraub, D. y Blase, B. (1969). Effects of handling on the subsequent development of premature infants. *Developmental Psychology*, 1, 765-768.
- Soubrié, P., Kulkarni, S., Simon, P. y Boissier, J.R. (1975). Effects des anxiolytiques sur la prise de nourriture de rats et de souris placés en situation nouvelle ou familière. *Psychopharmacologia*, 45, 203-210.
- Stewart, C.A. y Morris, R.G.M. (1993). The watermaze. In: Sahgal A.(Ed.) *Behavioural Neuroscience: A practical approach* (I), 107-121. New York: Oxford University Press.
- Ursin H., Baade, A. y Levine, S. (1978). *Psychobiology of stress: a study of coping men*. London: Academic Press.
- Wolf, S. y Wolff, H.G. (1947). *Human gastric function: An experimental study of a man and his stomach*. New York: Oxford.

