



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional De Ciencias Biológicas

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

TESIS

Efectos del aislamiento social sobre la morfología neuronal de Corteza prefrontal, Núcleo Accumbens e Hipocampo en etapas críticas del desarrollo en la rata Sprague Dawley

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Quimicobiológicas

PRESENTA:
Ma. del Rocio Ivett Martínez Rios

Directores de tesis:

Dr. Fidel de la Cruz López
Dr. Gonzalo Flores Álvarez

INDICE

Resumen	Pág.2
Abstract	Pág.3
Introducción	Pág.5
1.- Conducta social en la rata	Pág.7
2.- Aislamiento social	Pág.9
2.1.- Características principales del aislamiento	
2.2.-Áreas de relación con el aislamiento social	
2.2.1.-Sistema Límbico	Pág.10
2.2.2.- Corteza prefrontal	Pág.11
2.2.3- Núcleo Accumbes	Pág.12
2.2.4.-Hipocampo	Pág.13
3.-Características de las neuronas piramidales	Pág.14
4.-Características de las neuronas espinosas medianas	Pág.14
Justificación	Pág.21
Hipótesis	Pág.22
Objetivo general	Pág.23
Objetivo(s) particular (es)	Pág.23
Metodología	Pág.24
Resultados	Pág.31
Conclusión	Pág.40
Perspectivas	Pág.53
Bibliografía	Pág.54

Abreviaturas

CPF.- Corteza prefrontal

NAcc.- Núcleo Accumbens

Hc.- Hipocampo

AS.- Aislamiento social

ASp.- Aislamiento social post-destete

E1.- Etapa de juego (21 días posnatal)

E2.- Etapa de Pubertad (44 días posnatal)

E3.- Etapa Adulta (70 días posnatal)

ACTH.-adrenocorticotropina

AVP.- vasopresina

AVT.- área ventral tegmental

BDNF.-factor neurotrófico derivado del cerebro

CA.-cuernos de Ammon

NMDA.-ácido N- metil- D- aspartato

PCREB.-factor trasncripcional del BDNF

PD.- día posnatal

RESUMEN

El aislamiento social (AS) se ha definido como la separación de individuos o grupos resultando en falta de o disminución de contacto social y/o comunicación.

En estudios pioneros, Spitz demostró que algunos niños criados en orfanatos o bien hospitalizados por largos períodos de tiempo presentaban alteraciones conductuales, caracterizadas por estereotipias motoras, apatía, labilidad emocional y escasa interacción social.

En la rata (animal sociable) las etapas previas y posteriores a la pubertad son críticas para adquirir, establecerse y aprender su organización social, identificación al grupo, conductas sexuales, maternas, etc. Durante este periodo las ratas jóvenes emplean gran parte de su tiempo en la interacción y el juego social. La conducta de juego social en la rata se da desde el día 18 posnatal (p18), observando picos entre los días p28 a p35, y posteriormente la actividad se reduce con la edad y la maduración sexual. Así que se considera que esta interacción social es importante para establecer la organización social del grupo. En el aislamiento social en la rata se ha caracterizado la presencia de un síndrome que consiste en hiperactividad con un incremento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso, en el umbral al dolor y una alteración en la respuesta a drogas neurolépticas.

Nuestro objetivo fue determinar en que etapa de desarrollo el aislamiento produce alteraciones en actividad locomotora, así como en la morfología neuronal en Corteza prefrontal, Hipocampo y Núcleo Accumbens.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague Dawley, previamente destetadas a los 21 días (p21), dividiéndolo en 3 grupos de edad para considerar 3 etapas de desarrollo:

-Etapa de juego (21 días) -Etapa de pubertad (44días) -Etapa adulta de (70 días)

Para el aislamiento social (14 días) se colocaron **3 animales por caja** (50x35x18 cm) para el **grupo control** y **1 animal por caja** para el **grupo de aislamiento**, en el día de edad correspondiente al inicio de la etapa correspondiente. Al día 15 de aislamiento se realizaron las pruebas de actividad locomotora ante ambiente novedoso los resultados muestra en las tres etapas un aumento significativo de la actividad en las ratas aisladas con respecto al grupo control. En la arborización y longitud total de neuronas piramidales en la CPF no se encontró cambios significativos en ninguna de las tres etapas de aislamiento, y al mismo tiempo tampoco se encontró un cambio significativo en la morfología de neuronas espinosas medianas del NAcc en el aislamiento en etapa de juego y pubertad. Concluyendo que 14 días son suficientes para producir alteraciones en la conducta motora ante ambiente novedoso, faltando por relacionarlo con la morfología neuronal.

ABSTRACT

The social isolation (AS) has defined as the separation of individuals or groups being in lack of or diminution of social contact and/or communication. In pioneering studies, Spitz demonstrated that some children bred in orphanages or hospitalized by long periods of time presented/displayed behavioural alterations, characterized by estereotipias motorboats, apathy, emotional lability and little social interaction. In the rat (sociable animal) later the previous stages and to the puberty are critics to acquire, to settle down and to learn their social organization, sexual, maternal identification to the group, conducts, etc. During this period the young rats use great part of their time in the interaction and the social game. The conduct of social game in the rat occurs from day 18 posnatal (p18), observing tips between the days p28 p35, and later the activity is reduced with the age and the sexual maturation. So it is considered that this social interaction is important to establish the social organization of the group. In the social isolation in the rat the presence of a syndrome has been characterized that consists of hyperactivity with an increase in the locomotive activity before novel atmosphere, in the threshold to the pain and an alteration in the answer to neurolépticas drugs. Our objective was to determine in that development stage the isolation produces alterations in locomotive activity, as well as in the neuronal morphology in prefrontal Crust, Seahorse and Accumbens Nucleus. Male rats of the stock Sprague Dawley, previously weanling were used to the 21 days (p21), dividing it in 3 groups of age to consider 3 stages of development: - Stage of game (21 days) - Stage of puberty (44dias) - Adult Stage of (70 days) For the social isolation (14 days) 3 animal by box (50x35x18 cm) for the group were placed control and 1 animal by box for the isolation group, in the day of corresponding age at the beginning of the corresponding stage.

To day 15 of isolation the tests of locomotive activity were realised before novel atmosphere the results shows in the three stages a significant increase of the activity in the rats isolated with respect to the group control. In the arborization and length overall of pyramidal neurons in the CPF one was not significant changes in any of the three stages of isolation, and at the same time was not a significant change in the morphology of thorny neurons medians of the NAcc in the isolation in game stage and puberty either. Concluding that 14 days is sufficient to produce alterations in the conduct motorboat before atmosphere novedos, lacking to relate it to the neuronal morphology.

INTRODUCCION

A una especie sociable se le caracteriza por tener un nivel de organización social, con grupos permanentes de adultos viviendo juntos, y relaciones entre individuos que duren de un encuentro a otro, por la existencia de una interacción entre los miembros de esta, en donde la conducta de cada miembro es con el fin de realizar actividades en conjunto y apoyo para el bienestar todos los miembros, como por ejemplo; recolección de comida, construcción de nidos, cuidado de las crías, protección de depredadores.

Aunque podemos considerar que todos los animales son sociales hasta cierto punto, la reproducción sexual requiere animales que se pongan en contacto para aparearse, y en animales que muestran algún grado de cuidado parental hay una mínima unidad social de uno o más parientes y sus crías.

El comportamiento y la organización de los animales sociales se ha estudiado ampliamente en psicología comparativa, etología, sociobiología, ecología de la conducta y ciencias de la computación (inteligencia artificial).

En este tema existe gran interés en la conducta social de algunos animales como: Gorilas, Perros, Lobos, Leones, Chimpancés, conejos, ratones, ratas, y principalmente de comprender la conducta social del hombre la cual es altamente compleja y diversa.

Los seres vivos nacen con un potencial genético y biológico de amplias posibilidades de desarrollo. El hombre es un ser social por naturaleza y durante toda la vida vive un proceso continuo de desarrollo y aprendizaje, así que el medio ambiente del hombre es básicamente su medio social. Resulta entonces fundamental al desarrollo de las habilidades que permitan relaciones interpersonales satisfactorias y efectivas.

En el comportamiento social, tanto para el hombre como para otras especies sociales por naturaleza, el aprendizaje a lo largo del desarrollo del individuo se torna mas y más complejo ya que se incluyen aspectos cognitivos, afectivos, sociales y morales, a través de un proceso de maduración y aprendizaje con el medio social. El aprendizaje social sostiene que el funcionamiento psicológico y el desarrollo social responden a la interacción de múltiples factores ambientales, individuales y de conducta de la persona. El comportamiento interpersonal se aprende por asociación y por aprendizaje instrumental, siendo el refuerzo social uno de los reforzadores más poderosos para la adquisición y mantención de la conducta interpersonal,

además de que también existe aprendizaje por observación el cual requiere de procesos tales como: percepción, atención y memoria. Considerando así que este aprendizaje social se puede ver influido y afectado por factores externos diversos que alteren la conducta de un individuo en un futuro.

“procesos de apreciación” que no son ni mas ni menos que la participación de los afectos y las emociones, que el individuo pone en juego para llevar a cabo dicha apreciación e interpretación.

Los vínculos tempranos madre-hijo han sido un tema de estudio de gran relevancia para el campo de la psicopatología, si tenemos en cuenta la importancia que estos adquieren en el desarrollo del niño y del adolescente. Los estudios en ratas demuestran que el reconocimiento entre la madre y la cría dependen del olfato que desencadena una respuesta neurobioquímica en las células del bulbo olfativo; y de este hacia el sistema límbico. La rata preñada, al llegar al término de la gestación, al parecer por acción de la oxitocina, comienza a preparar el nido y una vez que nacen sus crías se come la placenta y comienza a lamer a sus crías. En ese momento se suceden cambios en forma bidireccional entre la madre y la cría, producidos por lo que en el lenguaje popular se denomina instinto materno, que es el resultado de la activación de la corteza prefrontal y del sistema límbico. Si la rata es primeriza, se activa la corteza prefrontal, y aprende las funciones maternas, pero es el olfato el que le permite reconocer a su cría.

La cría responde a los cuidados maternos lamiendo a la madre. La rata madre se arquea para que la cría pueda succionar. La cría, en un esbozo de plasticidad cerebral, busca en forma particular uno de los pezones.

CONDUCTA SOCIAL EN RATA

Las habilidades sociales dependen no sólo de la constitución genética, puesto que también es influenciado por otros factores como condiciones las prenatales, el sexo, jerarquía social del animal y experiencias sociales tempranas (Meaney y cols., 1979, Suomi y cols., 1974).

Las ratas, al igual que el hombre, son animales sociables por naturaleza, por ello las etapas previas y posteriores a la pubertad de cada individuo son críticas para adquirir, establecerse y aprender su organización social, identificación al grupo, conductas sexuales, maternas, etc. Durante este periodo las ratas jóvenes emplean gran parte de su tiempo en la interacción y el juego social (T. Hol, 1999).

En diversos estudios detallados y descriptivos del desarrollo del comportamiento social en la rata (Baenninger LP., 1967; Meaney y cols., 1979; Peijs, 1977) se ha demostrado que durante este desarrollo pueden ser distinguidos ciertos períodos específicos (Scott JP., 1962; Scott JP. Y Marston 1950). La hipótesis del período crítico (Scott JP., 1962) postula que los individuos jóvenes de la mayoría de las especies sociales pasan por períodos cronológicos durante los cuales el estímulo social específico es necesario para un adecuado desarrollo social subsecuente. Las ratas son inusualmente susceptibles a las influencias ambientales durante el período en el cual se forman los enlaces sociales primarios (Scott JP. Y Marston 1950). Durante este período, las ratas jóvenes pasan cada vez más tiempo lejos de su madre y su nido, observándose las primeras interacciones sociales no-maternas, es decir comportamiento social de juego. En gran parte los patrones del comportamiento agresivo, sexual y social en los adultos se pueden reconocer en el juego social, aunque la mayor parte del tiempo en las formas modificadas y exageradas (Pellis SM y Pellis VC., 1990; Poole TB y Fish J., 1976; Taylor GT., 1980).

Durante los primeros días de vida el cuidado materno es importante en la rata, estos cuidados maternos se dan hasta el día 21 (p21), que es cuando se desteta y convive con sus demás integrantes de la camada sin depender de los cuidados maternos.

La frecuencia de la conducta de juego social, observada en la rata durante el desarrollo, sigue la forma de U invertida, inicia alrededor del día 18 posnatal (p18), observando su pico máximo durante los días p28 a p35 (semanas 4 y 5 de la edad), y posteriormente la actividad se decrementa con la edad y la maduración sexual (Baenninger LP., 1967; Meaney y Stewart J., 1981; Thor DH y Holloway WR., 1984; Vanderschuren LJMJ. y cols 1997). Así que se considera

que esta interacción social es importante para establecer la organización social del grupo (Vanderschuren LJM., 1997).

Así, un grupo de investigadores (Nature Neuroscience, 2000) demostró que las madres que ejercían conductas maternas adecuadas para con sus crías (medidas a través de las conductas de licking y grooming se traducían en:

- un aumento de la densidad neuronal y del volumen del hipocampo
- un aumento del ARNm para ciertos factores neurotróficos
- un aumento del número de cierto tipo de receptores
- una mayor disponibilidad de ciertos neurotransmisores en ciertas áreas del cerebro
- una mayor liberación de proteínas vinculadas a la adhesión neuronal
- una significativa mejoría en el *performance* de las conductas relacionadas con el aprendizaje y la memoria.

Mientras que los estudios realizados en crías de ratas sometidas a una privación de contacto y atención materna por un período de 3 horas diarias (recordar que 10-11 días en la vida de una rata equivale a 40-50 días en la vida de un humano) resultaron en una disfunción de dicho eje que se ponía de manifiesto a través del desarrollo de un estado de hipercortisolemia el cual ejerce un efecto neurotóxico a través de:

- una acelerada pérdida neuronal y un retraso en la mielinización.

Anormalidades en el desarrollo de un adecuado *pruning* (“poda”) que se manifiesta a través de un proceso de *overpruning* (“pelado”) de las espinas dendríticas neuronales. La repercusión a nivel conductual de este evento biológico fue que los roedores presentaron una marcada disminución en las pruebas de *performance* y aprendizaje

1.9 Separación Materna

La separación materna se ha estudiado durante décadas. Los efectos a corto y largo plazo son variables y algunas veces opuestos (Ladd y cols, 2004, Lehmann y Feldon, 2000, Pryce y Feldon, 2003). Por ejemplo, se ha reportado que los animales separados de su madre a una edad temprana desarrollan ansiedad exacerbada y conductas hiperactivas en la edad adulta; otros investigadores han hallado cambios en la estructura cerebral, lo cual se ha relacionado con la presencia de ciertas psicopatologías; algunos autores reportan lo contrario, una respuesta menos activa, o bien, ninguna diferencia en la actividad de los animales estresados mediante la separación materna y los que no han sido separados. (Flores y cols, 2005)

Una repetida separación entre las crías y la madre de 2 horas, incluso hasta 6 horas durante las primeras semanas de vida produce un fenotipo con una alteración en la reactividad del eje HPA ante estresores breves (Plotsky y Meane, 1993; Liu y cols. 1999; Liu y cols. 2000; Francis y cols. 2002; Ladd y cols. 2004.), a través de un aumento en la expresión del ARNm de CRH en la amígdala central y en PVNh y un decremento en el ARNm de RG principalmente en áreas corticales (Francis y cols. 1999). Además de una acelerada pérdida neural, retraso en la mielinización, disminución de espinas dendríticas y deficiencias en las pruebas de memoria (Lehmann y cols. 2002; Hsu y cols. 2003; Colorado, 2006) y mayor vulnerabilidad a enfermedades relacionadas con el estrés (Francis y cols. 2002).

Los cuidados suministrados por la madre a sus crías en la primera semana después del parto incrementan la densidad de las sinapsis en el hipotálamo, desarrollan la función hipocámpica y mantienen en buen funcionamiento el mecanismo de producción de los glucocorticoides. El momento en el que se aplica la separación materna es determinante, ya que si es aplicada antes del periodo de hiporrespuesta (PD1 al PD3) del eje HPA al estrés reduce significativamente la densidad de espinas dendríticas a nivel de las neuronas piramidales de la tercera capa de la CmPF, mientras que durante el periodo de baja respuesta (PD5 al PD7) al estrés, no se observan diferencias en la morfología dendrítica (Bock y cols. 2005). Los periodos prolongados de separación de la madre están asociados con aumento de la apoptosis y disminución de la producción de factores neurotróficos, del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento neuronal (NGF) que son responsables de los cambios en la citoarquitectura y de la reparación neuronal, aumentan la producción de nuevos brotes terminales y estimulan la sinaptogénesis. El BDNF y el NGF estimulan los microtúbulos, la reparación celular y el crecimiento de las células musgosas del hipocampo que se conectan con las células de la capa CA3 y las células colaterales. La disminución en la producción de los factores protectores neuronales ocasiona atrofia y muerte de las células de la capa CA3 y de las células musgosas (Kehoe, 1999).

Sin embargo, a través del estudio realizado por Meaney lo que queda en evidencia es que **1)** a pesar de una mala susceptibilidad genética, un entorno ambiental favorable tendrá la capacidad de generar importantes cambios plásticos aumentando la potencia sináptica en determinadas áreas del cerebro (que intervienen en el procesamiento de información proveniente del entorno) y protegiéndolo de los fenómenos de excitotoxicidad y **2)** un entorno ambiental caracterizado por el desarrollo de estresores y situaciones traumáticas podrá tener un efecto favorable, a través del aumento de la resiliencia del individuo; o bien desfavorable aumentando la

vulnerabilidad del individuo, caracterizada por la mayor susceptibilidad del SNC a diferente tipos de noxas que resultarán en daño cerebral (atrofia de las estructuras neurales con disminución de las arborizaciones y desarrollo de espinas dendríticas). El desarrollo de estos fenómenos de resiliencia o vulnerabilidad en la niñez traerá aparejado la modulación de ciertos procesos del neurodesarrollo como son por ejemplo la migración y diferenciación neuronal, la proliferación sináptica, etc. El adecuado desarrollo de estos procesos podrá intervenir en el desarrollo, conformación y mantenimiento de circuitos especializados en el procesamiento de la memoria y el aprendizaje lo que podrá traducirse en un conjunto de propiedades cognitivas, afectivas, vinculares, etc., así como en su capacidad de respuesta (reactividad normal / hiporeactividad / hiperreactividad) ante la exposición a subsecuentes situaciones de estrés.

Además del cuidado materno en la rata se han delimitado muy bien tres etapas importantes de desarrollo:

- ❖ Etapa de juego: inicia aproximadamente al día 18 posnatal (p18).
- ❖ Etapa de pubertad: inicio a los 44 días posnatal (44p).
- ❖ Etapa Adulta: inicio a los 70 días posnatal (70p).

AISLAMIENTO SOCIAL

El *aislamiento social* se ha definido como la separación de individuos o grupos resultando en falta de o disminución de contacto social y/o comunicación. Esta separación puede ocurrir por separación física, barreras sociales y por mecanismos psicológicos.

El aislamiento social es considerado uno de los posibles pródromos iniciales en los “estados mentales de alto riesgo” en el desarrollo de psicosis, es un factor de vulnerabilidad y / o riesgo para el desarrollo de enfermedades psiquiátricas que no tiene la relevancia que merece. El 9% de los casos (Martin LM, y cols., 2008) quedan sin resolver deberían ser explorados beneficiándose de un diagnóstico, tratamiento o posible ingreso hospitalario según procediera en cada caso.

CARACTERÍSTICAS DEL AISLAMIENTO SOCIAL

Existe evidencia clara de que eventos durante el inicio de la vida influyen en el desarrollo cerebral y conductas posteriores en la edad adulta; causando un factor importante en el desarrollo de de desordenes psiquiátricos en la edad adulta, como la esquizofrenia y la depresión. El aislamiento social se ha estudiado como uno de los factores importantes que ocasionan deficiencias en el desarrollo y cambios en la conducta.

En estudios pioneros Spitz en 1946 demostró que algunos niños criados en orfanatos o bien hospitalizados por largos períodos de tiempo presentaban alteraciones conductuales, caracterizadas por estereotipias motoras, apatía, labilidad emocional y escasa interacción social

Esta disfunción social ha sido implicada en el desarrollo y el curso de la esquizofrenia (American Psychiatry Association, 1994) en la cual los pacientes tienden al aislamiento social antes de que los síntomas aparezcan, y en cuanto los síntomas aparecen el aislamiento social se exagera (K . Baum,1995; S . Hans, 1992; G .Ihnen, 1998; E .F. Walker, 1994).

En el aislamiento social en la rata se ha caracterizado la presencia de un síndrome que consiste en hiperactividad con un incremento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso y agonistas dopaminérgicos (F .S. Hall, 1998; G .H. Jones, 1992), decremento en el umbral al dolor, déficit en la inhibición de prepulso (A . Domeney, 1998; M .A. Geyer, 1993; G .B. Varty,

1995; I .C. Weiss, 1999; L .S. Wilkinson, 1994) y una alteración en la respuesta a drogas neurolépticas (B .J. Sahakian, 1977).

En ratas aisladas (durante **8 semanas**) se encontrado aumento en la actividad locomotora ambiente novedoso y decremento de longitud dendrítica y densidad de espinas en neuronas piramidales de CPF y NAcc (Adriana B, 2003).

Prescott (1971) fue uno de los primeros autores en sugerir la potencial vulnerabilidad del cerebelo frente a la deprivación social, estructura que no sólo participa en las clásicas funciones de regulación motora, sino también afectiva (Lane RD, 1997; Reiman,1997) y cognitiva (Courchesne, 1994; Helmpkamp, 1999). Estudios de Pascual, (2001) aislando (durante 14 días) ratas P18 comprobaron que existe una disminución en la interacción social, así como disminución en la arborización dendrítica y de densidad de espinas en las células de purkinje en el cerebelo, y este deterioro se mantuvo incluso después de 30 días de interacción social normal P62.

ÁREAS DE RELACIÓN CON EL AISLAMIENTO SOCIAL

Existen evidencias que sugieren que el sistema dopaminergico participa en las alteraciones conductuales observadas en el aislamiento social, además los agonistas, como la amfetamina y la cocaína incrementan la locomoción en animales con AS (F .S. Hall, 1998; G. H. Jones, 1992). En adicción, la actividad locomotora ante ambiente novedoso se incrementa en el aislamiento social (G. H. Jones, 1992), y los datos de microdiálisis de *d-amfetamina* in vivo, sugieren que el aislamiento social produce incremento en los niveles de Dopamina del NAcc en condiciones basales (G. H. Jones, 1992). Así que es evidente sugerir que la hiperactividad presentada en el aislamiento social, es mediada primariamente por mecanismos dopaminergicos en el Nacc.

El Hc y la CPF envían proyecciones excitatorias al NAcc (A .Y. Deutch, 1992; Y. Goto, 2001; D .R. Weinberger 1995), además de que las tres estructuras mencionadas también reciben proyecciones dopaminérgicas provenientes de área ventral tegmental (como se mostrara mas adelante en diagrama 2).

El aislamiento social en ratas muestra un aumento en la presynapsis dopaminérgica y serotoninérgica en NAcc, asociado con un decremento en la presinapsis serotoninérgicas en

CPF e Hc. Este desbalance neuroquímico puede contribuir a la exagerada respuesta de la rata aislada ante un ambiente novedoso o un estímulo externo, y cambios en la conducta. (M. D.S. Lapid, 2003)

SISTEMA LIMBICO

El sistema límbico, también llamado cerebro medio, es la porción del cerebro situada inmediatamente debajo de la corteza cerebral, y que comprende centros importantes como el

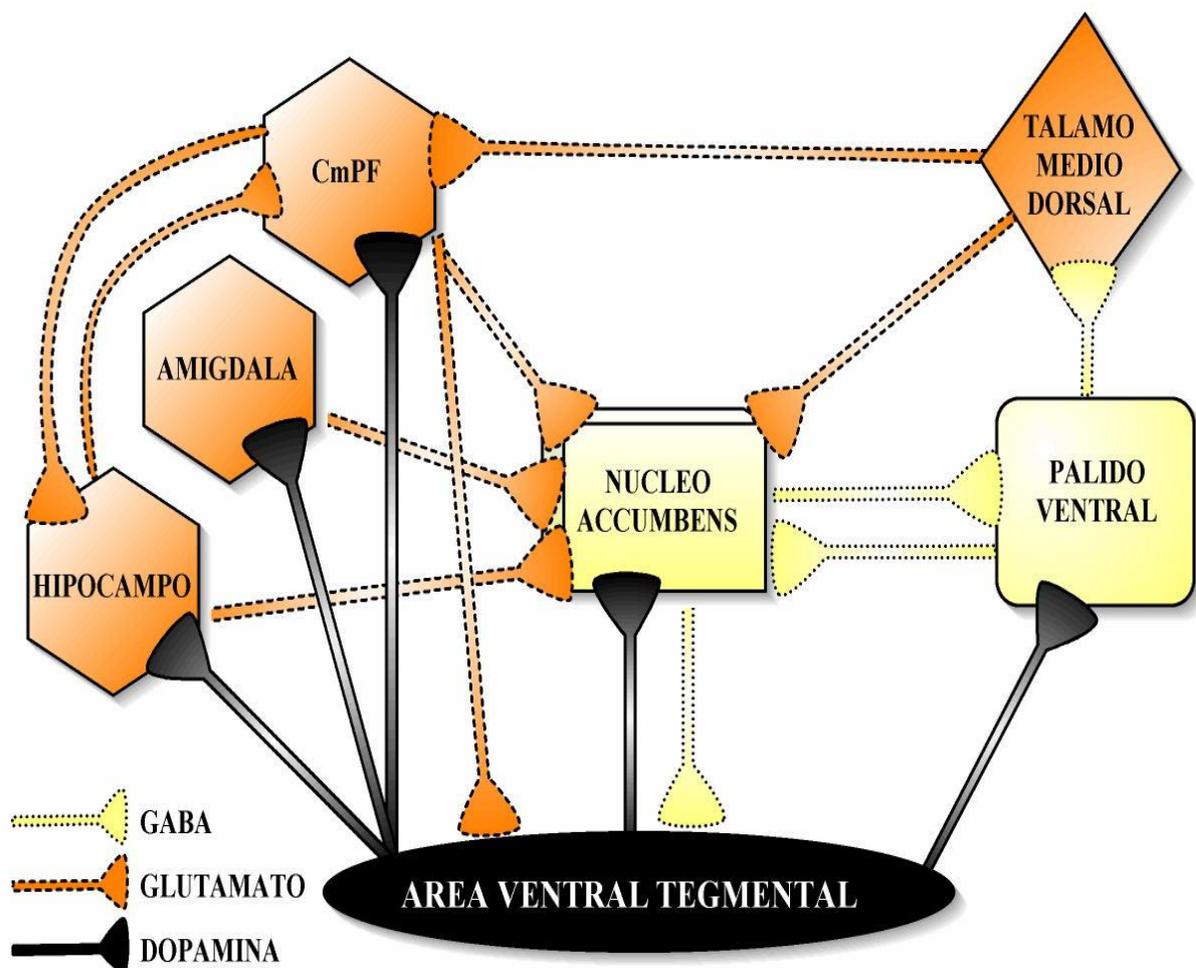


DIAGRAMA 1.- Interconexiones del sistema límbico con las demás estructuras cerebrales, eferencias y eferencias de cada estructura junto con los tipos de neurotransmisores que interviene en cada conexión.

CORTEZA PREFRONTAL

Existe el consenso de que los procesos implicados en la cognición humana dependen de la corteza prefrontal. Esta zona del cerebro tiene las propiedades necesarias para el control de la ejecución de tareas: plasticidad sináptica por la experiencia, gran cantidad de conexiones intrínsecas e integración de mucha información extrínseca, entre ellas su regulación por los sistemas neuromoduladores del cerebro medio, que ayudan a actualizar la información (Miller y Cohen, 2001).

La corteza prefrontal (CPF) constituye el nivel más elevado en la jerarquía cortical dedicada a la representación y ejecución de acciones y es la región neocortical más evolucionada en primates. Esta región se considera que esta implicada en conductas cognitivas complejas de planeación, expresión de la personalidad y conductas sociales correctas. Además del control cognitivo, la CPF juega un papel primordial en gran número de funciones cerebrales superiores como el control de la conducta y del afecto (Fuster, 1997, 2001; Miller y Cohen, 2001). Los elementos celulares clave para la realización de estas funciones son las neuronas piramidales y el proceso básico en el que se basa la operatividad de la CPF es la memoria a corto plazo (*working memory*), proceso esencial para la cognición humana (Goldman-Rakic, 1995).

La actividad básica de esta región cerebral es considerada ser la orquestadora de los pensamientos y las acciones de acuerdo a metas internas. El término neurológico típico para las funciones desempeñadas por la corteza prefrontal es de *Función Ejecutiva*. Las funciones ejecutivas se relaciona a las habilidades para diferenciar entre pensamientos conflictivos, determinar que es bueno y que es malo, que es mejor y que es óptimo, lo mismo y diferente, consecuencias futuras y actividades corrientes, trabajar hacia una meta definida, predicción de resultados, expectación basada en acciones, y “**control**” **social** (la habilidad de suprimir actos, que si no son suprimidos, podrían conducir a falta de aceptación social o resultados ilegales).

NUCLEO ACCUMBENS

El Núcleo accumbens (NAcc) pertenece al estriado ventral (Voorn *et al*, 2005). Este núcleo se ha involucrado en la integración entre motivación y acción motora conocida como interfase límbico-motora (Fernández Espejo, 2000), esto ha llevado a decir que el papel neurobiológico del NAcc es transferir información motivacional relevante para que se realicen actos motores.

El NAcc posee dos territorios diferentes tanto en sus conexiones como neuroquímicamente: el *core* y la *shell* (Meredith *et al*, 1995), la *shell* presenta principalmente conexiones de carácter límbico como son las aferencias glutamatérgicas provenientes del hipocampo y la amígdala, así como una importante entrada dopaminérgica proveniente del área ventral tegmental (AVT) mientras que el *core* recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza prefrontal (CPF) y dopaminérgicas de la SNc (Voorn *et al*, 2005). El esquema propuesto por Fernández en el 2000 (diagrama 2) muestra el circuito neuronal de la interacción límbico motora, aquí la *shell* recibe aferencias de la corteza prefrontal y del AVT, la información de salida de la *shell* se dirige hacia el pálido ventromedial, el cual inerva el tálamo, que a su vez envía fibras hacia la CPF que a su vez proyecta fibras glutamatérgicas al *core*, el cual presenta conexiones de salida al pálido ventral.

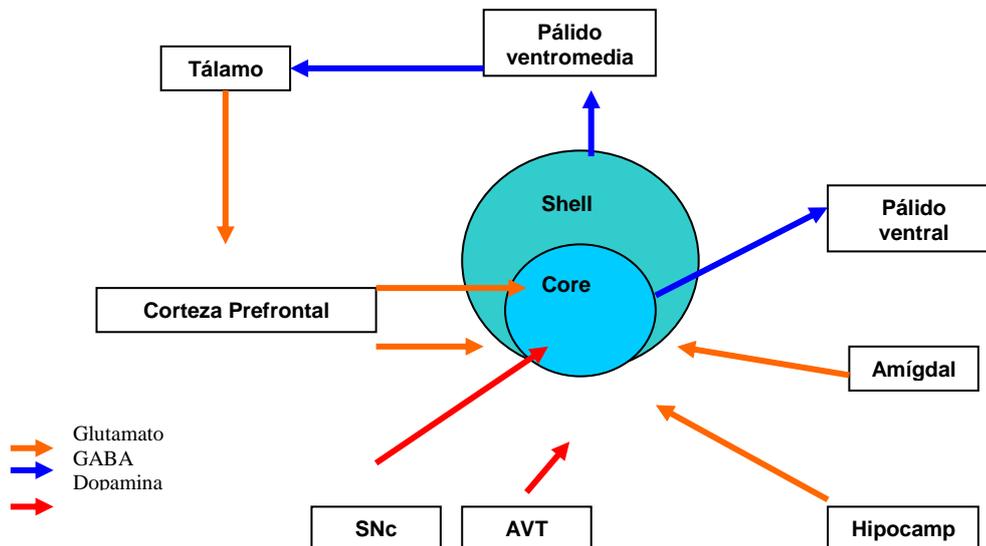


DIAGRAMA 2. Esquema de los circuitos que conectan al NAcc (Fernández, 2000)

HIPOCAMPO

El hipocampo forma una parte del sistema límbico y participa en la memoria y la orientación espacial.

El papel del hipocampo es la regulación de las acciones agresivas y endocrinas, otras importantes funciones de esta formación incluyen el aprendizaje, la memoria de los hechos recientes (de corto plazo) y la memoria espacial. Estas funciones se encuentran relacionadas con la atención, a través de la capacidad hipocámpica de abstraer y categorizar apropiadamente cualquier información importante.

El hipocampo es una estructura del sistema límbico ampliamente relacionada con varios núcleos del sistema nervioso central; entre estos se encuentran la corteza prefrontal, núcleo accumbens, amígdala y área ventral tegmental (Grace, 2000) que en conjunto forman el sistema dopaminérgico mesolímbico y está implicado en la regulación de conductas motivadas (Vallone y cols, 2000). Para su estudio se divide en cuatro regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 basándose en el tamaño y las conexiones de las células piramidales que residen en ellas (Kandel, 2000); (Fig. 2). El hipocampo tiene conexiones con casi todas las partes del sistema límbico, incluyendo especialmente amígdala, circunvolución del hipocampo, circunvolución del cíngulo, hipotálamo y otras zonas estrechamente relacionadas con el hipotálamo (Guyton, 1967). Casi todos los tipos de experiencia sensorial originan activación instantánea en diversas partes del hipocampo, el cual a su vez, distribuye muchas señales de salida hacia el hipotálamo y otras partes del diencefalo a través del fórnix (Guyton, 1967).

El hipocampo ejerce una actividad glutamatérgica que modula la actividad de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal al igual que las espinosas medianas del núcleo accumbens, vía glutamato, mientras que la corteza prefrontal modula también la actividad de las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens (NAcc) por una innervación de tipo glutamatérgico, de tal manera que el hipocampo vendría modulando la actividad de las neuronas del núcleo accumbens directamente e indirectamente vía corteza prefrontal. Por otra parte, el hipocampo ejerce una influencia moduladora sobre la actividad locomotora dependiente de dopamina (DA) y la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Mogenson y Yim, 1991). Las neuronas dopaminérgicas que proyectan al núcleo accumbens juegan un papel crítico en la apertura y switch entre fuentes de información alternantes, además de participar en la atención y orientación a estímulos, los que están significativamente alterados en algunos

trastornos conductuales (Sesack and Pickel, 1990). El NAcc recibe inervación dopaminérgica del área ventral tegmental e inervación glutamatérgica del hipocampo, predominantemente del hipocampo ventral (HV) (Groenewegen, 1991). Además, proyecciones hipocampales glutamatérgicas hacen contacto sináptico con las mismas neuronas GABAérgicas del NAcc que hacen sinapsis con las terminales dopaminérgicas mesolímbicas (Whishaw y Mittleman, 1991).

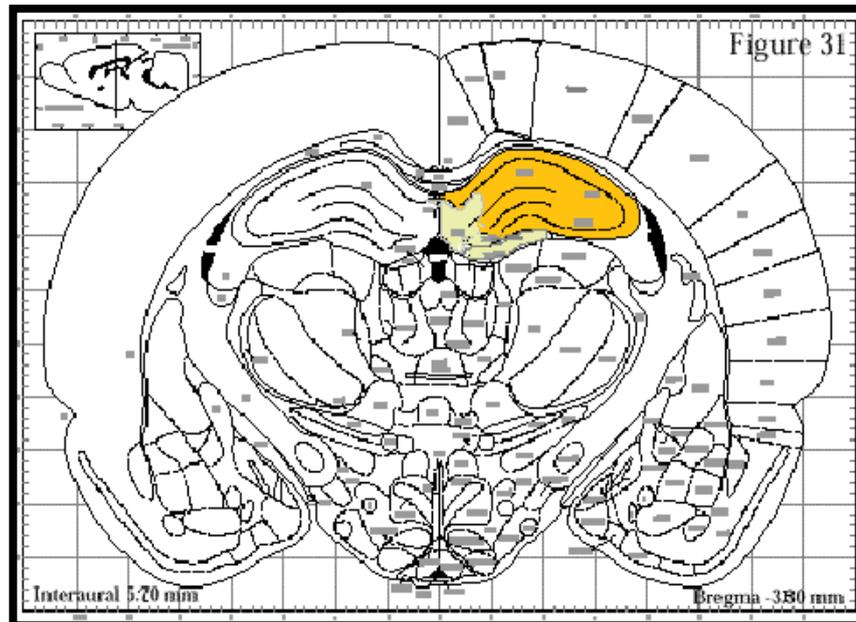


Figura 2. Se muestra la región del Hipocampo (en cuatro regiones separadas, CA1, CA2, CA3 y CA4)

CARACTERÍSTICAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES

A nivel morfológico, están constituidas por un soma triangular de aproximadamente 25-50 μm de diámetro, un conjunto de dendritas basales que se encuentran cerca del soma y una dendrita apical, que proyecta hacia las capas superficiales. Gracias a esta dendrita apical las neuronas piramidales tienen la capacidad de captar la información que llega a través de las distintas capas corticales y una vez integrada emitir un impulso eléctrico hacia las áreas de proyección. Las neuronas piramidales son la población neuronal mayoritaria en la corteza (alrededor de un 75-80% del total) y son glutamatérgicas. Existe una especificidad laminar en el

tipo de proyecciones de la corteza frontal: las neuronas piramidales de las capas II/III tienden a proyectar a otras áreas de la corteza, las de la capa VI al tálamo y algunas zonas corticales y son principalmente las neuronas piramidales de capa V las que canalizan la señal de salida hacia la multitud de estructuras subcorticales.

CARACTERÍSTICAS DE LAS NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS

Más del 95% de la población neuronal del estriado está formada por las neuronas espinosas medianas que son el blanco de la mayoría de las aferencias extrínsecas e intrínsecas del mismo y que constituyen el centro integrador de la información debido a sus arborizaciones que ejercen simultáneamente sinapsis con aferencias extrínsecas como así también intrínsecas.

Las neuronas espinosas medianas en el NAcc son identificadas por su tamaño del soma, su extensión dendrítica y gran número de espinas dendríticas, descritas por Flores 2005.

JUSTIFICACIÓN

Las experiencias postnatales adversas constituyen importantes factores de riesgo que podrían contribuir al desarrollo de diversos trastornos neuropsiquiátricos en individuos genéticamente vulnerables (Courchesne E., 1994; Dawson G, 1994; Einsenberg L,1995). El posible sustrato neurobiológico que podría dar cuenta de estos desórdenes conductuales resulta obviamente difícil de abordar en estudios con seres humanos. En este contexto, la utilización de modelos animales ha sido particularmente útil considerando las limitaciones que comportan los estudios clínicos que, al margen de su incuestionable valor, son generalmente retrospectivos y con numerosas variables difíciles de controlar. Al respecto, el modelo animal que se ha utilizado con mayor frecuencia es el aislamiento social temprano en ratas de laboratorio, donde se inducen condiciones ambientales adversas y evalúan luego sus consecuencias conductuales y neuronales (Geyer MA, 1993; Kim JW, 1996; McKinney WT, 1995).

La investigación realizada desde el aprendizaje social, tomando como base el enfoque del análisis experimental, ha llevado a desarrollar diferentes estrategias y modelos que han permitido reproducir conductas sociales en ambientes controlados de laboratorio (Baker & Rachlin, 2002; Catania, 1992), las investigaciones que se han realizado con técnicas no invasivas en humanos han sugerido que la exclusión social ocasiona cambios en el cerebro y que estos cambios cerebrales provocan a su vez incapacidad de decisión y una disminución de la capacidad de aprendizaje: el cerebro realmente registra el aislamiento social del individuo y se ve afectado en su rendimiento y funcionamiento.

Existen reportes de gran variedad de protocolos de aislamiento social y mediciones de conductas que se piensa afectarían en este caso, además estudios estimativos que sugieren la participación importante de áreas cerebrales involucradas en este proceso. Pero aun así falta definir con claridad áreas alteradas y que se encuentran muy relacionadas con los datos reportados previamente como CPF, Hipocampo y NAcc, además de que no existe un reporte que determine en que etapas del desarrollo social, el aislamiento ocasiona daños mas significativos, aunado a esto aun no se estandarizado un modelo de aislamiento social el cual pueda relacionar con mas precisión los daños al organismo, las implicaciones psicológicas y sociales ocasionadas por el aislamiento social.

HIPOTESIS

El Aislamiento Social dependiendo de la etapa que se aplique, etapa de juego, etapa de pubertad o etapa adulta, y el tiempo de aislamiento, induce cambios conductuales y morfológicos, y estos cambios variarán, principalmente en la morfología de neuronas espinosas medianas de Núcleo Accumbens (NAcc), y neuronas piramidales de Corteza Prefrontal (CPF) e Hipocampo (Hp); así como también en la conducta motora ante ambiente novedoso de los animales aislados con respecto a los controles.

OBJETIVO GENERAL

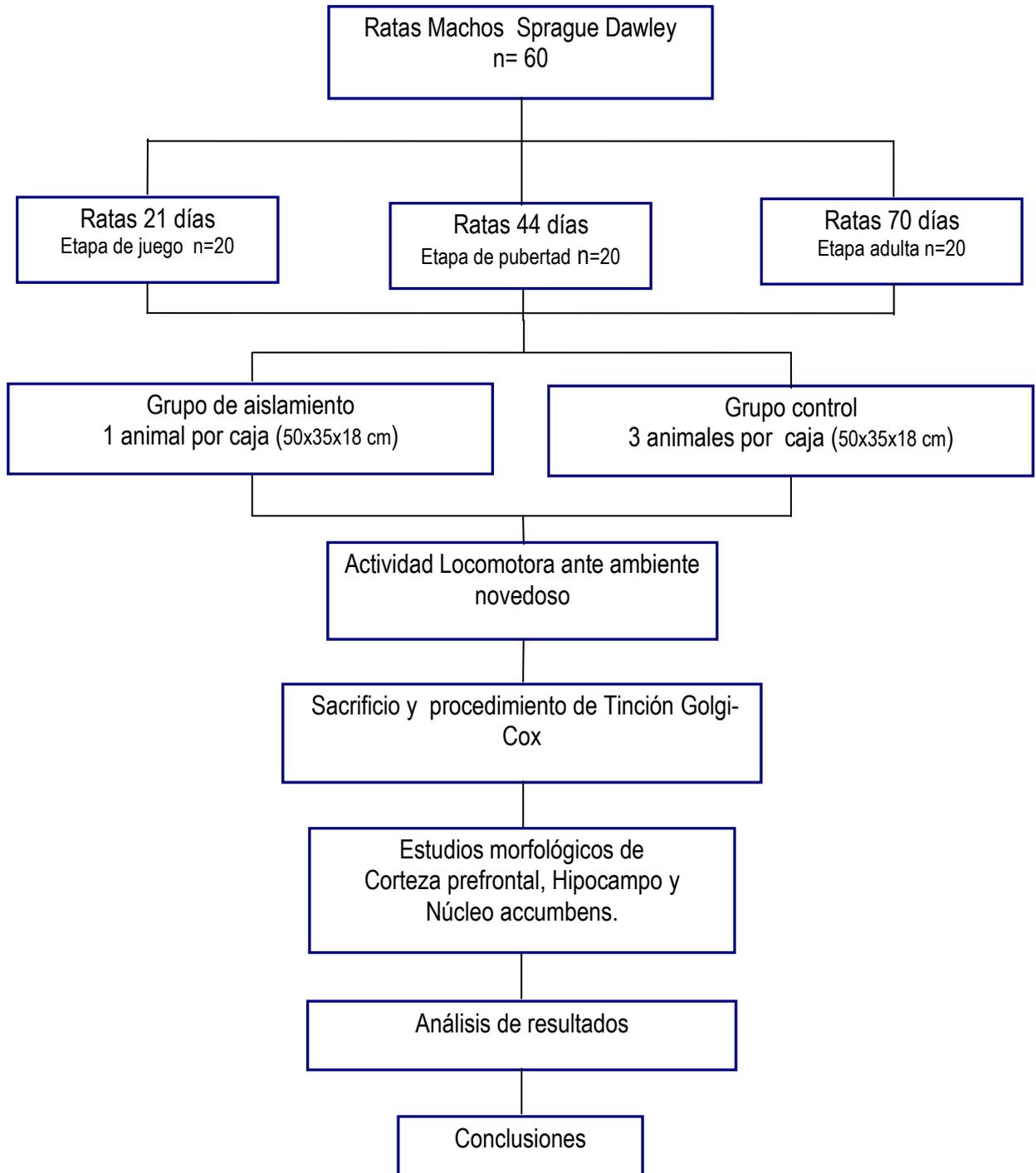
Determinar si el Aislamiento Social en las etapas de juego, etapa de pubertad y etapa adulta de la rata durante 14 días es suficiente para producir diferencias; en la conducta motora ante ambiente novedoso y cambios morfológicos en neuronas piramidales de CPF, Hp y neuronas espinosas medianas en NAcc.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existen variaciones de acuerdo a la etapa de aislamiento, en la actividad locomotora ante ambiente novedoso en los animales de aislamiento social, en las etapas de desarrollo de juego, pubertad, y adulta.
2. Evaluar la arborización y densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales, capa 3 de la corteza prefrontal y en hipocampo, en los grupos de aislamiento social y grupos control.
3. Evaluar la arborización y densidad de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del NAcc en los diferentes grupos de aislamiento social y control.
4. Establecer si la variación en los efectos provocado por el aislamiento social, depende de la etapa de desarrollo social en la que se encuentre el individuo durante el aislamiento.

METODOLOGIA

Diagrama de trabajo



CRONOGRAMA DE MANEJO DE ANIMALES PARA AISLAMIENTO

GRUPO	destete	etapa de aislamiento	Medición de actividad locomotora	Sacrificio y extracción de cerebros
etapa de juego	21 días	día 21 al día 35 (14 días)	día 36	día 36 al 51 (15 días)
etapa de pubertad	21 días	día 44 al día 58 (14 días)	día 59	día 59 al 74 (15 días)
etapa de juego	21 días	día 70 al día 84 (14 días)	día 85	día 85 al 100 (15 días)
grupo control	21 días	sin aislamiento	dependiendo de la etapa	15 días posteriores al sacrificio

Animales de Experimentación

Para el presente proyecto se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague Dawley (previamente destetados a los 21 días posnatal) de 21 días (p21), 44 días (p44), y 70 días (p70), respectivamente para cada grupo experimental; proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología, BUAP, el cual se encuentra en condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas, las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico de 50x35x18 cm., y recibieron ciclos de luz oscuridad de 12 horas y con libre acceso de agua y alimentos.

Aislamiento social

El aislamiento social se realizó por un periodo de 14 días, los animales del grupo de AS se colocaron en cajas individuales y al mismo tiempo los animales del grupo control se colocaron 3 en cada caja. Las condiciones de los 2 grupos serán las mismas, el aislamiento será solo de forma física ya que se colocaran las cajas en el mismo cuarto teniendo la capacidad de oler, oír y ver a los demás animales. Este protocolo de aislamiento esta reportado por Flores (2003).

Actividad locomotora

Se realizaron mediciones de actividad locomotora ante ambiente novedoso a los tres grupos de **AS** en **E1**, **E2** y **E3** y grupos controles respectivos las mediciones se realizaron al día siguiente de finalizar la etapa de aislamiento correspondiente a cada grupo, para poder evaluar los cambios con respecto a la hiperactividad.

Esta se medio colocando a la rata en una caja cerrada de 48 cm. de largo por 28 cm. de ancho, con una profundidad de 30 cm. La caja posee 8 pares de fotodiodos colocados a lo largo de las paredes laterales de la caja. Los fotodiodos se encuentran conectados a un actímetro. La actividad locomotora se cuantifico registrando las cuentas de movimiento cada 10 minutos, durante dos horas. Inmediatamente después de las mediciones los animales se sacrificaran para el estudio morfológico que se describe a continuación.

Protocolo de actividad locomotora.

Esta prueba se realizó en el laboratorio de neuropsiquiatría del Instituto de Ciencias Fisiológicas de la BUAP, en el área específica para este fin. El día de la prueba las ratas permanecieron en el área durante 30 minutos, este tiempo permitió la adaptación al laboratorio.

Esta prueba se realizó a la misma hora y bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura.

Las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico de 44 cm de largo por 22 cm de ancho y 22 cm de altura, estas cajas tienen instalados 8 pares de fotodiodos en las paredes laterales, de tal forma que el movimiento de las extremidades interrumpe la trayectoria de un haz de luz infrarroja imperceptible para el animal, dicha interrupción se cuantifica como un desplazamiento. La contabilización de los desplazamientos se realizó por un contador computarizado que permite registrar el número de desplazamientos de los animales en 6 intervalos sucesivos de diez minutos cada uno, de modo que el registro de actividad locomotora tuvo la duración de 2 horas (Fig. 6) (Flores, 1996).

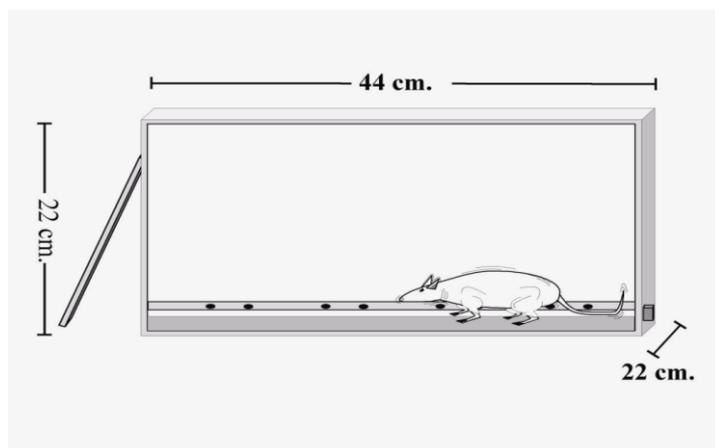
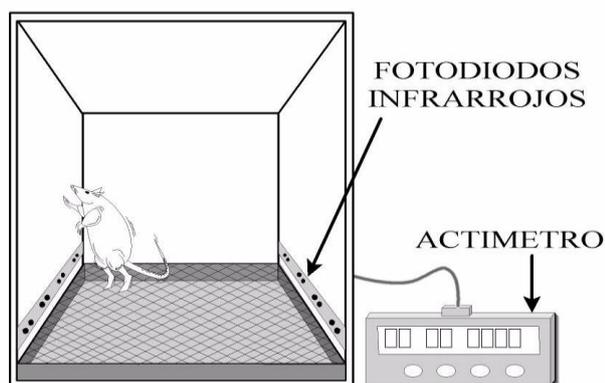


Figura 6. Prueba de Actividad Locomotora

Protocolo de la tinción de Golgi-Cox.

1. Se anestesia al animal con Pentobarbital sódico a una dosis de 65 mg/kg. Figura 1 (A)
2. Se perfundió solución salina al 0.9 % a través del ventrículo izquierdo del corazón, previa ligadura de la arteria aorta descendente y corte de la aurícula derecha, con la finalidad de eluir los eritrocitos del tejido cerebral. Figura 1 (B)

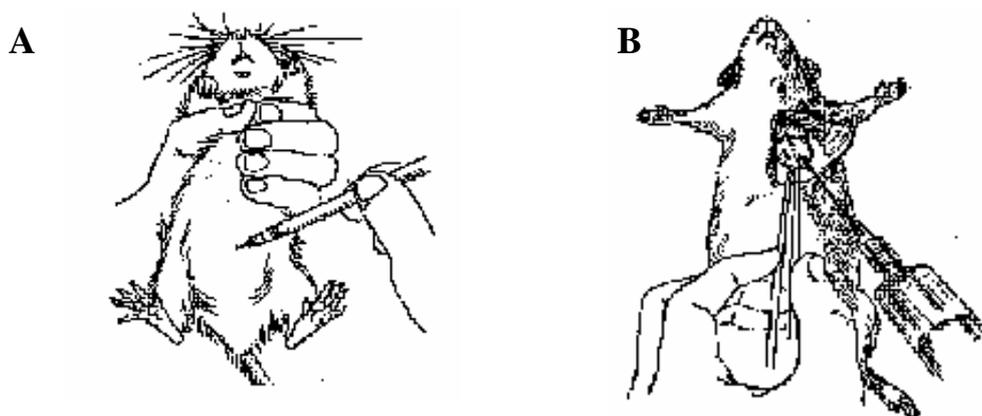


Figura 1. A) inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. B) perfusión intracardiaca de NaCl 0.9%.

3. Se procedió a remover los cerebros y ponerlos en 20 ml de la solución de Golgi-Cox para ser almacenarlos en la oscuridad durante 14 días. Después de este tiempo se reemplaza la solución de Golgi-Cox por una solución de sacarosa al 30%. Los cerebros serán almacenados en la oscuridad por 2 días más antes de cortar, (la duración de este paso por sacarosa no es crítico para cortar el tejido, pero se recomienda conservar el tejido durante dicho tiempo para evitar posibles fracturas del mismo durante el corte).
4. Se montó el cerebro en la platina del vibrotomo utilizando pegamento cianoacrílico y fue sumergido en solución de sacarosa al 6%, una vez colocado en la cámara del vibrotomo, con suficiente solución de sacarosa para cubrir el tejido y la navaja.
5. Se procedió a realizar los cortes después de un lavado de la navaja durante 5 minutos con alcohol removiendo así el exceso de grasa.
6. Se cortó el tejido haciendo rebanadas de 150-200 μm de grosor.
7. Se montaron las rebanadas en laminillas gelatinizadas al 2%, presionándolas uniformemente con papel filtro. Figura 2



Figura 2. Montaje del tejido en laminillas.

8. Las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda máximo 24 horas hasta el proceso de revelado.
9. Se procedió a revelar la tinción.

Protocolo de revelado de la tinción de Golgi-Cox.

Todo el procedimiento se realizó en total oscuridad, en el siguiente orden: hidróxido de amonio 30 min, fijador rápido de Kodak 30 minutos, lavado de agua y deshidratado del tejido con concentraciones crecientes de etanol, 15 minutos con xileno. Posteriormente se cubrieron las laminillas con resina sintética y cubreobjetos en los cortes ya revelados.

Observación y trazado de neuronas contrastadas con la tinción de Golgi-Cox.

Se localizaron las áreas de interés (CPF, Hipocampo y NAcc) de acuerdo a Paxinos y Watson 1986, después de localizar el área de interés, se dibujaron neuronas piramidales de Cpf (capa 3) e Hipocampo y neuronas espinosas medianas en Nacc; utilizando un microscopio óptico marca Leica modelo DMSL acoplado a una cámara lúcida marca Leica con un objetivo de 40X. Figura 3 (A).

Las espinas dendríticas de todas las neuronas que se analizaran se dibujarán en el mismo equipo a 100x.

Análisis de resultados morfológicos.

La evaluación de los datos morfológicos se realizó mediante el análisis de Sholl, el cual consiste en sobreponer una hoja transparente con una serie de círculos concéntricos, colocando el círculo central alrededor del cuerpo de la neurona y de esta manera determinar el número de dendritas que interceptan

cada uno de los círculos. Para el análisis, cada caso fué representado por el valor promedio obtenido por cada círculo de radio diferente (la separación entre cada círculo es de 10 micrómetros), obteniéndose el número de dendritas que cruzan cada círculo de tal forma que se gráfica el número de intersecciones entre las dendritas identificadas y cada círculo concéntrico contra el número ordinal de cada círculo que se encuentra a 10 μm uno de otro, por tanto, contra distancia o longitud del árbol dendrítico. Figura 3 (B). Por otro lado, para calcular la densidad de las espinas, bajo la cámara lucida se trazó una porción distal de la dendrita de más de 10 μm de longitud a una ampliación de 100x y sobre este dibujo se contaron el número de espinas por cada 10 μm , entonces se obtiene el promedio de espinas por cada 10 μm

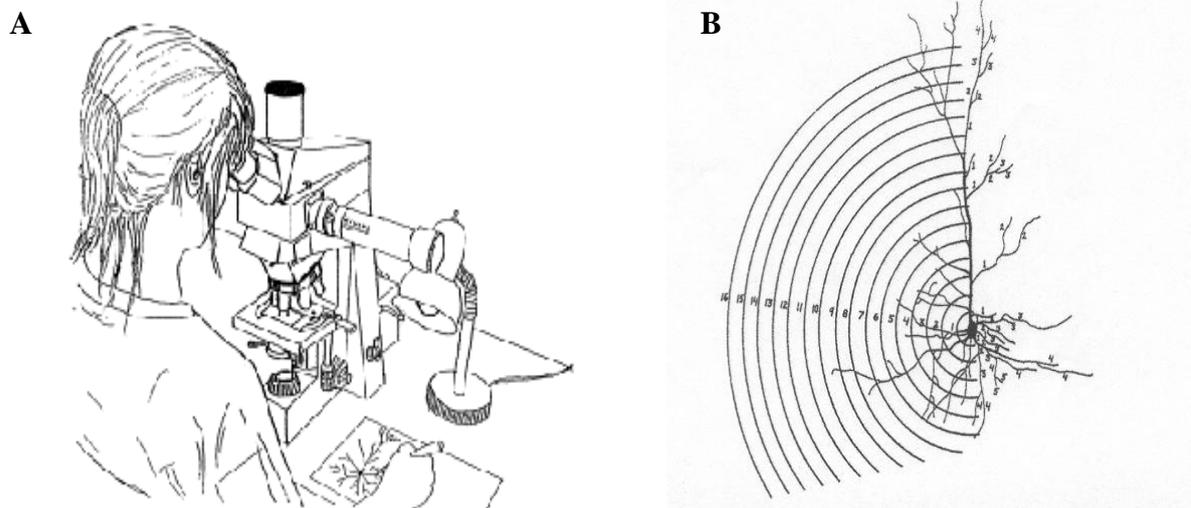
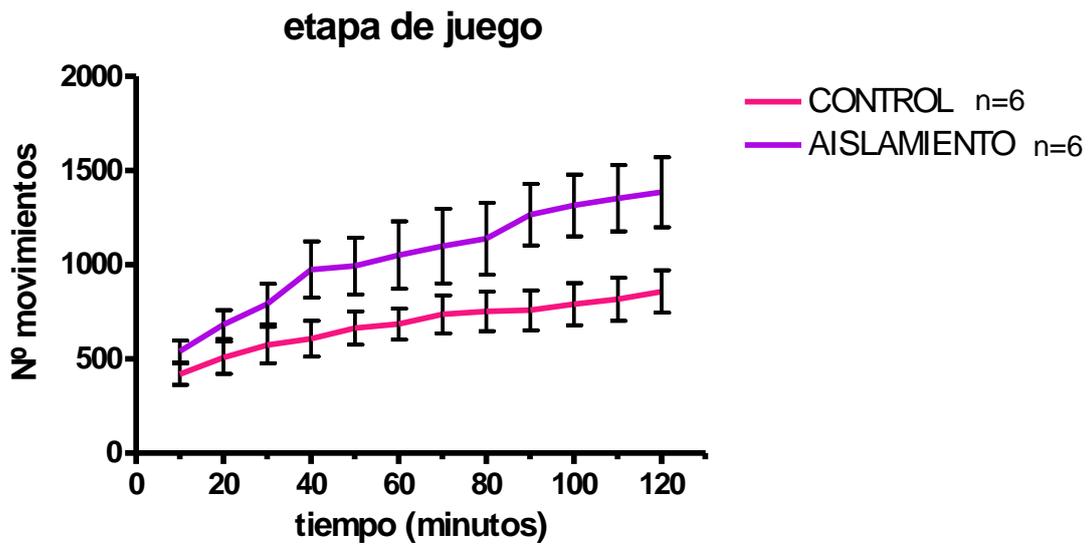


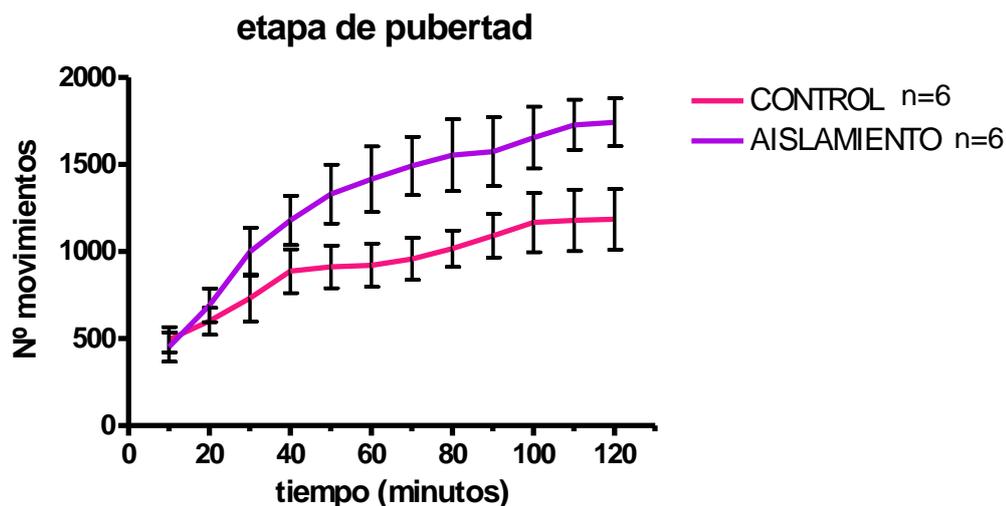
Figura 3. A) Se muestra el equipo y acción de observación y trazado de neuronas mediante la cámara lúcida para su posterior análisis de Sholl. **B)** Diagrama en el que se muestra la plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl. Cada disco concéntrico está calibrado para que el primer círculo corresponda a un radio de 10 μm , el segundo a 20 μm y sucesivamente todos representan 10 μm más.

RESULTADOS

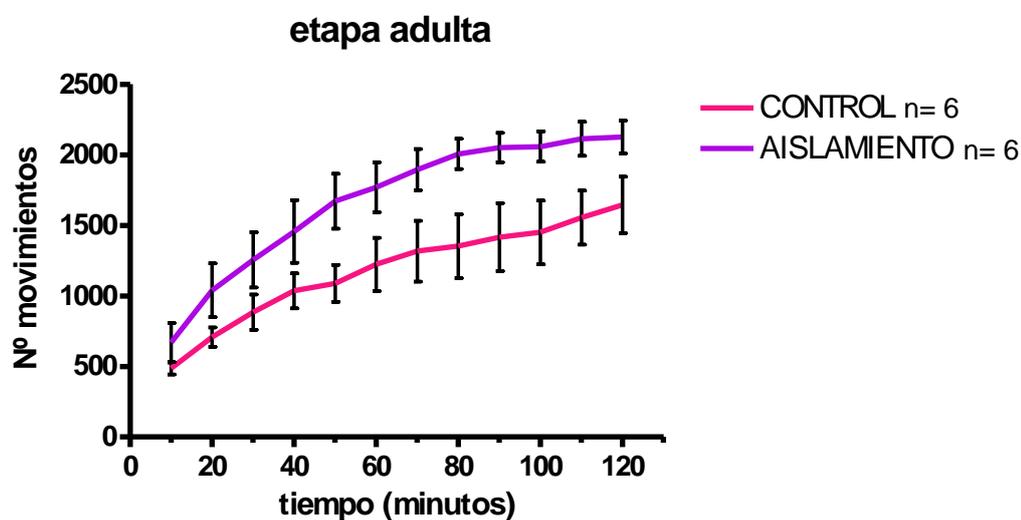
Conducta motora ante ambiente novedoso



Actividad locomotor medida en animales de 36 días de edad, comparando a animales aislados del día 21 al 35 con respecto a su control, mostrando un aumento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso en el grupo aislado.

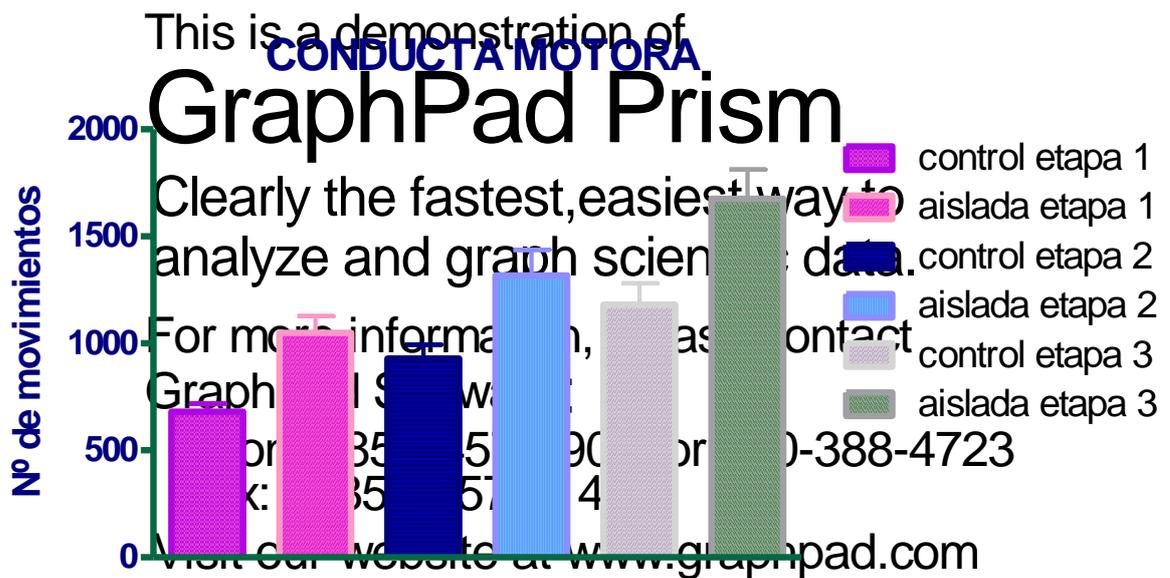


Actividad locomotor medida en animales de 59 días de edad, comparando a animales aislados del día 44 al 58 con respecto a su control, mostrando un aumento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso en el grupo aislado.



Actividad locomotor medida en animales de 85 días de edad, comparando a animales aislados del día 70 al 84 con respecto a su control, mostrando un aumento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso en el grupo aislado.

Los datos de las tres etapas en que se aplico el aislamiento y los controles correspondientes en cada etapa para comparar el aumento de actividad locomotora, se presentan en la siguiente grafica.



Promedios de N° de movimientos presentados en la actividad locomotora ante ambiente novedoso en las tres etapas en las que se realizo el aislamiento.

RESULTADOS

RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Morfología dendrítica en hipocampo dorsal (CA1)

El análisis de Sholl se realizó en dendritas de neuronas piramidales de Hipocampo en neuronas de ratas macho.

Los datos presentados muestran que hay una menor arborización de las neuronas piramidales de hipocampo (CA1) en el grupo de separación materna con respecto al control al igual que la longitud dendrítica total se ve disminuida. En cuanto a la longitud de orden de ramificación, se encontraron cambios significativos a nivel del cuarto y quinto orden.

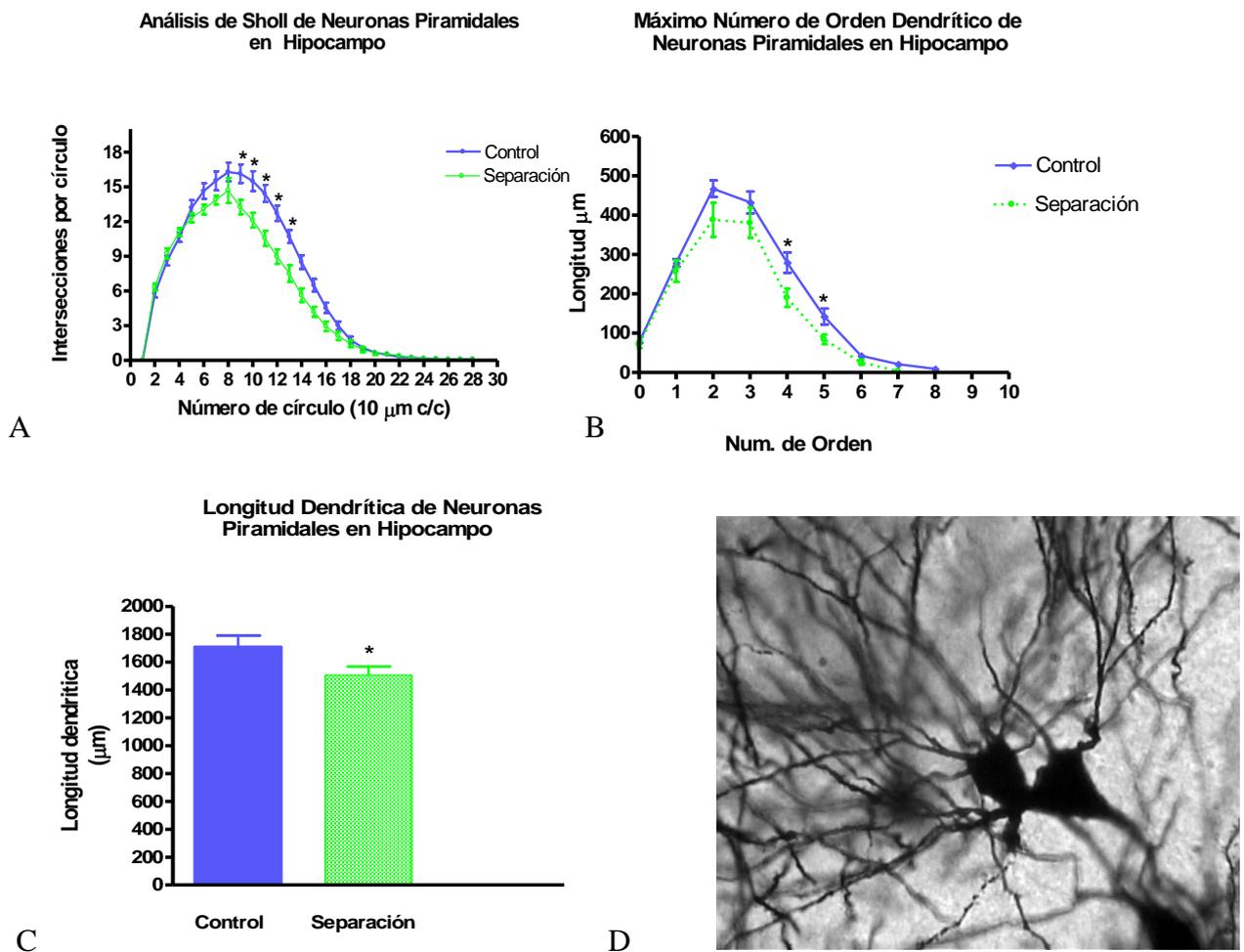


Figura. 11. A) Gráfica que muestra la arborización total de las neuronas piramidales de Hipocampo cada grupo con n=10. B) Gráfica que muestra la longitud de orden de ramificación, cada grupo n=10. C)

Gráfica que muestra la longitud dendrítica total de neuronas piramidales cada grupo $n=10$, los valores indican el promedio \pm SEM de 100 neuronas por cada grupo experimental, con una $* p \leq 0.05$ vs control
D) Neurona piramidal de Hipocampo (CA1) de un animal control (40x).

7.3 Densidad de espinas en las dendritas de neuronas piramidales de Hipocampo



Figura. 12 Espinas Dendríticas en rata control

con separación



Figura. 13 Espinas Dendríticas en rata

Las figuras 12 y 13 muestran microfotografías con escala de $10 \mu\text{m}$ de espinas dendríticas de neuronas piramidales de hipocampo, correspondientes a cada grupo experimental, cada fotografía corresponde a una ampliación de una dendrita en la zona distal en 100x para poder observar las espinas. Se puede observar que no existe una diferencia en la densidad de estas.

En la figura 14 se muestra una representación gráfica que describe la densidad de espinas por unidad de longitud, en la cual se puede observar que no existe una diferencia significativa en la densidad de espinas en neuronas piramidales de Hipocampo.

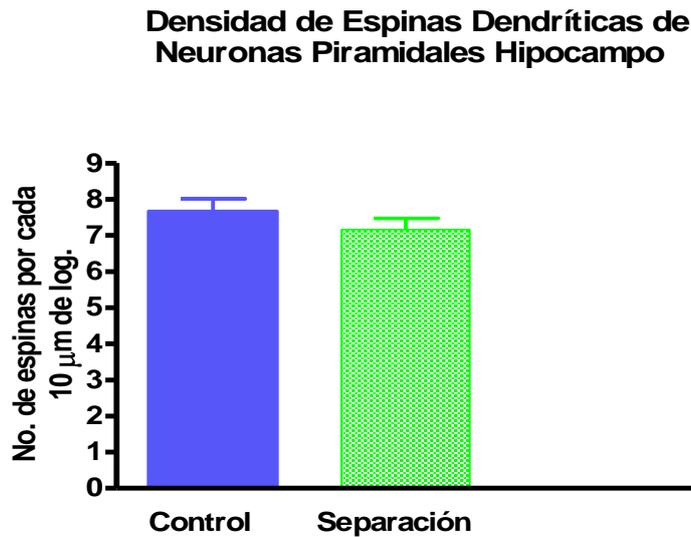
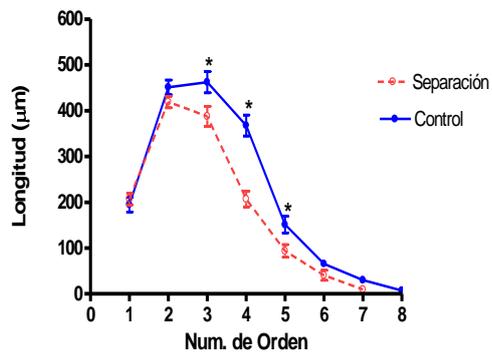


Figura 14. Las barras describen la densidad de espinas dendríticas por unidad de longitud en dendritas distales de neuronas que fueron incluidas en el análisis de Sholl. Los valores indican el promedio \pm SEM con una $n = 100$.

7.4 Morfología dendrítica en Núcleo Accumbens

Análisis de Sholl en dendritas de neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens, el estudio se efectuó en neuronas de ratas macho. Los datos presentados muestran que hay una menor arborización de las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens en el grupo de separación materna con respecto al control al igual que la longitud dendrítica total se ve disminuida. En cuanto a la longitud de orden de ramificación, se encontraron cambios significativos a nivel del tercer, cuarto y quinto orden (ver figura 15).

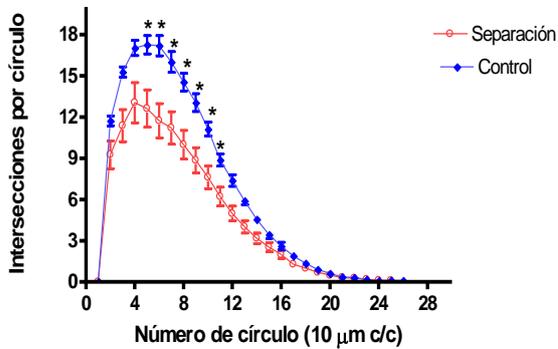
Máximo Número de Orden Dendrítico de Espinosas Medianas del Núcleo Accumbens



A

B

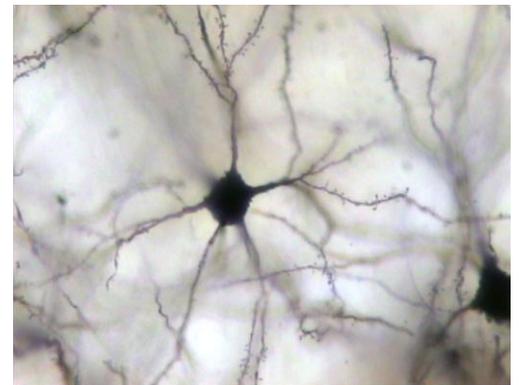
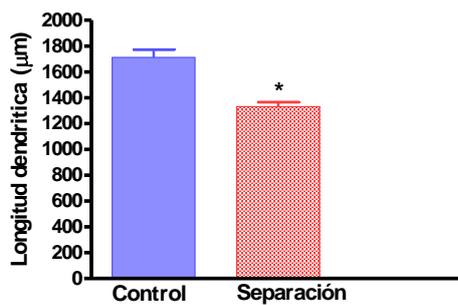
Análisis de Sholl de Espinosas Medianas del Núcleo Accumbens



C

D

Longitud Dendrítica de Espinosas Medianas del Núcleo Accumbens



Aumentar tamaño de gráficas

Figura. 15. **A)** Gráfica que muestra la arborización total de las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens cada grupo con n=10. **B)** Gráfica que muestra la longitud de orden de ramificación, cada grupo n=10. **C)** Gráfica que muestra la longitud dendrítica total de neuronas piramidales cada grupo n=10, los valores indican el promedio ± SEM de 100 neuronas por cada

grupo experimental, con una * $p \leq 0.05$ vs control **D)** Neurona espinosa mediana del núcleo accumbens de un animal control (40x).

Densidad de espinas en las neuronas espinosas medianas del Núcleo Accumbens.



Figura. 16 Espinas dendríticas en rata control
rata con separación

Figura. 17 Espinas dendríticas en

Las figuras 16 y 17 muestran fotomicrografías con escala de $10 \mu\text{m}$ de espinas dendríticas de neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens, correspondientes a cada grupo experimental, cada fotografía corresponde a una amplificación de una dendrita en la zona distal en $100 \times$ para poder observar las espinas. En la figura 18 se muestra una representación gráfica que describe la densidad de espinas por unidad de longitud, en la cual se puede observar que si existe una diferencia significativa en la densidad de espinas en las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens.

Densidad de Espinas Dendríticas de Neuronas en Núcleo Accumbens

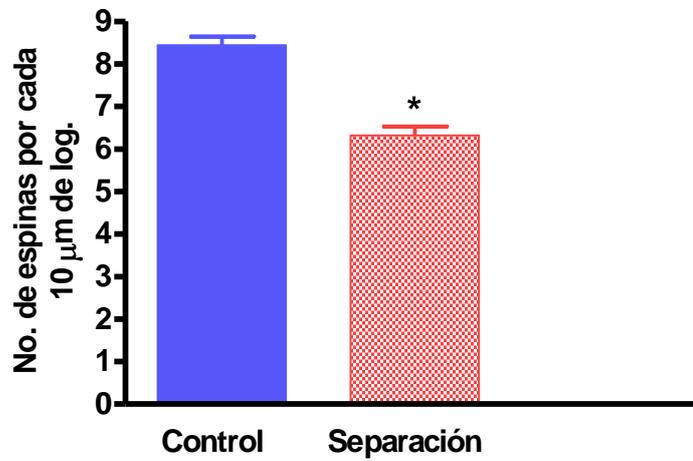


Figura 18. Las barras describen la densidad de espinas dendríticas por unidad de longitud en dendritas distales de neuronas que fueron incluidas en el análisis de Sholl. Los valores indican el promedio \pm SEM con una $n = 100$ con una $p < 0.05$, * < 0.05 y un intervalo de confianza de 95%.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó en la rata Sprague Dawley los efectos del aislamiento social durante 14 días, en tres etapas que consideramos importantes durante la vida del animal, la etapa de juego y desapego de la madre, la etapa de pubertad y la etapa adulta. Esto con la intención de identificar si existe algún periodo crítico en donde el aislamiento social contribuya a una alteración en la conducta social del animal, y además de que el tiempo de aislamiento sea significativo para efectuar estos cambios conductuales.

Nuestros resultados en la medición muestran que existe una disminución significativa de la actividad locomotora de los animales aislados con respecto al grupo control, en los tres periodos en los que se aplicó el aislamiento.

Se ha reportado que los infantes de una gran variedad de especies responden ante el aislamiento con incremento en la vocalización, la actividad locomotora y la activación autonómica y adrenocortical (Shirley, Porynta, 1941; Seitz, 1959; 1961; Kaufman, Hinde 1961; Coe, Mendoza, Levine 1978) lo que se relaciona con nuestros resultados del aumento de actividad locomotora, y los trabajos de Adriana B. y cols., 2003 donde reportan el mismo aumento de la actividad locomotora en ratas aisladas del día 21p hasta el día 81p este periodo abarcaría las 3 etapas de aislamiento realizadas en nuestro trabajo.

La arborización dendrítica de las principales neuronas de muchas regiones del cerebro están cubiertas con pequeñas protrusiones conocidas como espinas dendríticas, éstas estructuras son los principales sitios de entrada de la información y juegan un rol clave en la plasticidad del cerebro, además son un indicador de la conectividad neuronal y pueden ser vistas con microscopios de luz (Fiala *et al.*, 2002).

Durante el periodo de sinaptogénesis, dinámicas, protrusiones semejantes a dedos, comienzan a surgir de las dendritas, los filopodios. Los filopodios son apéndices dendríticos más largos y delgados que las espinas (miden entre 3 y 40 μm de longitud), las espinas generalmente miden menos de 2 μm de longitud, éstas son móviles y pueden, de hecho, experimentar cambios de morfología que tal vez expliquen algunos tipos de aprendizaje y memoria (Portera-Cailliau y Yuste, 2001). En el hipocampo de ratas se observan filopodios en el día 4 posnatal (Fiala *et al.*, 2002). En los cultivos de neuronas del hipocampo, los filopodios

aparecen y desaparecen rápidamente con un tiempo de vida medio de aproximadamente 10 minutos, mientras que las espinas son estructuras más permanentes y casi nunca desaparecen por completo (Portera-Cailliau y Yuste, 2001).

En el humano las espinas dendríticas en la región CA1, son duplicadas entre el día postnatal 15 y la adultez. La motilidad de las protrusiones dendríticas disminuye con la madurez, las espinas pueden ser relativamente inmóviles en un cerebro normal maduro, pero aún así la motilidad latente de las espinas puede permitir cambios rápidos en la densidad de éstas, y probablemente contribuir a condiciones patológicas. La densidad de espinas en las dendritas está relacionada con el grado de conectividad entre estas neuronas y los axones que pasan a través de sus árboles dendríticos (Fiala *et al.*, 2002). Así las dendritas y las espinas dendríticas son sitios donde ocurre la mayoría de las sinapsis y están asociados con la plasticidad sináptica (McAllister, 2000; Fiala *et al.*, 2002).

Muchas condiciones pueden llevar al decremento de la densidad de espinas dendríticas. La pérdida de espinas puede ser causada por la pérdida de axones que normalmente hacen sinapsis con la espina. Se han demostrado cambios cualitativos y cuantitativos en la arborización y en la densidad de espinas dendríticas en varias regiones del cerebro en animales después de un cambio en su ambiente, ya sea enriquecido o de privación (Silva-Gomez *et al.*, 2003).

Las hormonas pueden modificar la densidad de espinas, la corticosterona y la hormona de crecimiento podrían producir cambios en la morfología dendrítica de las neuronas corticales (Kuhn y Schanberg, 1998; Wellman, 2001; Gibb y Kolb, 2005). El decremento en la densidad de espinas dendríticas de neuronas del NAcc podría ser reflejo de la pérdida de las entradas excitatorias (Flores *et al.*, 2005). El estrés agudo puede incrementar la densidad de espinas en el hipocampo en machos; prolongado estrés parece producir atrofia hipocampal a través de la acción de hormonas adrenales. Exposición a estrés crónico, resulta en atrofia del árbol dendrítico de la región CA3. La pérdida de espinas en la neocorteza y en el hipocampo ha sido reportado en ratones expuestos a estrés crónico (Fiala *et al.*, 2002). Los resultados presentados anteriormente son análogos a la disminución en el número de espinas, que nosotros encontramos en las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens, en el grupo de ratas con separación materna del PD1 al PD14 (mecanismo de estrés crónico).

Las neuronas espinosas medianas del NAcc, poseen campos dendríticos con entradas hipocámpicas, amigdalinas y prefrontocorticales. Las aferencias corticofrontales se distribuyen en los extremos dendríticos, mientras que las entradas hipocámpicas y amigdalinas se sitúan en los tallos proximales dendríticos. La inervación dopaminérgica del AVT, a través de la vía mesolímbica, ejerce efectos moduladores sobre la actividad neural en la coraza del NAcc (Fernandez-Espejo, 2000). Cambios en el número de espinas dendríticas de las neuronas podrían contribuir a modificar las funciones de la dopamina mesolímbica. La superficie dendrítica distal de las neuronas espinosas medianas del NAcc es el sitio de convergencia de las aferentes dopaminérgicas del área ventral tegmental (Flores *et al.*, 2005), y los aminoácidos aferentes excitatorios de la CPF, el hipocampo y la amígdala (Freund *et al.*, 1984). Los aminoácidos excitatorios, generalmente glutamatérgicos, que vienen de la CPF y del hipocampo hacen contacto neuronal asimétrico con la cabeza de las espinas y regulan las funciones de las neuronas espinosas medianas (Floresco *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2005).

Es evidente que el principal papel neurobiológico del NAcc es transferir información motivacional relevante para que se codifiquen actos motores o en otras palabras, reconocer situaciones de importancia adaptativa, para que el animal desarrolle una conducta motora apropiada (Fernandez-Espejo, 2000). Por tanto, se sugiere que las alteraciones en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del NAcc podrían resultar en modificaciones de las entradas dopaminérgicas y glutamatérgicas hacia el NAcc y en consecuencia provocar cambios en las propiedades funcionales de esas neuronas (Flores *et al.*, 2005). Además si hay alteraciones en la longitud dendrítica total, se modifica de igual manera la superficie dendrítica distal, nosotros observamos que hay disminución de la LDT en hipocampo y núcleo accumbens, lo que hace suponer que hay alteraciones en las entradas glutamatérgicas de la CPF que podrían resultar en una reorganización de las entradas dopaminérgicas al NAcc con cambios consiguientes en el tono dopaminérgico mesolímbico en ésta área (Brake *et al.*, 2004; Meaney *et al.*, 2002), es entonces como el aumento en la actividad locomotora es explicable con la reducción en la densidad dendrítica y en la LDT en el NAcc, alterando el circuito dopaminérgico, en animales con separación materna.

La amígdala participa en la integración emocional y autónoma. El hipocampo desempeña un papel amnésico y de cartografía espacial de primer orden. La coraza del NAcc se activa cuando recibe información simultánea de éstas estructuras. En otras palabras la corteza prefrontal permite fijar la atención sobre una determinada situación y valorar su

importancia adaptativa. Si dicha situación se acompaña de cierta carga emocional y sus características temporo-referenciales se analizan a nivel hipocámpico, ensambles de neuronas de la corteza del NAcc se situarían en estado activo (Fernandez-Espejo, 2000). Todo lo anterior explica en gran medida como es que exponer a las ratas neonatas, durante su periodo de sinaptogénesis a ambientes modificadores de la conducta materna, lleva finalmente a una disminución en la densidad de espinas y longitud dendrítica en el núcleo accumbens.

Reducciones importantes en la estructura dendrítica de neuronas piramidales en la corteza media prefrontal e hipocampo se han observado previamente en ratas neonatales Sprague-Dawley que se aislaron después de destetar, mientras la actividad locomotora aumento en respuesta a un ambiente novedoso. Estos resultados muestran correlación con el mecanismo Dopaminérgico (DA) que ocurre en el núcleo accumbens, ya que los niveles de dopamina parecen aumentados en núcleo accumbens en respuesta a un aislamiento social, debido a la conectividad del Núcleo Accumbens con el hipocampo y Corteza media prefrontal. (Silva-Gómez, AB 2003) El Hipocampo envía proyecciones excitadoras a las regiones de Corteza Media Prefrontal y esta proyecta al Área ventral tegmental, fuente de proyecciones dopaminérgicas mesocorticolímbicas. Además la Corteza media prefrontal e Hipocampo envían proyecciones excitadoras al Núcleo Accumbens. (Zhou FM, 2002).

La separación materna interfiere con la maduración de las funciones endocrinas y conductuales en roedores y primates, incluido el hombre (Heim y Nemeroff, 2001; Pryce y Feldon, 2003). El cuidado de los padres tiene una función importante en el desarrollo cognitivo y emocional de la progenie. No obstante, la interacción madre- cría es compleja. (Kaffman y Meaney, 2007). La cría es capaz de detectar la separación materna y comenzar una respuesta adaptativa por la ausencia de la madre. Las respuestas fisiológicas de la cría asociadas con la separación materna incluyen intentar trasladarse al nido, liberación de hormonas del estrés e inhibición de varias vías anabólicas asociadas con el desarrollo y crecimiento (Hofer, 1994; Kuhn y Schanberg, 1998; Levine, 1975). La liberación de las hormonas del estrés como corticosterona es importante para la gluconeogénesis necesaria para mantener un nivel adecuado de glucosa en ausencia de suministro alimenticio externo, varios reportes sugieren que la corticosterona podría regular la organización sináptica a nivel cortical. En resumen, la pérdida del respaldo maternal causa que la separación materna parezca inicialmente inhibir la secreción de la hormona de crecimiento y la síntesis del ADN (Kuhn y Schanberg, 1998; Levine, 2000). La corticosterona y la hormona de crecimiento podrían producir cambios en la morfología dendrítica

de las neuronas corticales (Scott y cols, 2006; Cergueira y cols, 2007; Wellman, 2001; Magariños y cols, 1998; Woolley y cols, 1990; Noguchi y Sugisaki, 1985; Noguchi y cols, 1983).

Los cambios en el número de espinas y en la arborización dendrítica, especialmente a nivel del tercer al quinto orden de ramificación de las neuronas espinosas medianas de NAcc podrían alterar las funciones de la dopamina mesolímbica. Por ejemplo, adultos con separación materna presentaron incremento en la sensibilidad a los efectos de la cocaína sobre la actividad locomotora y una mayor sensibilidad al estrés inducido por los efectos de anfetaminas sobre la actividad locomotora (Brake y cols, 2004; Meaney y cols, 2002). En comparación al sitio de convergencia de las aferentes de dopamina y los aminoácidos excitatorios aferentes de la corteza, en las neuronas espinosas medianas del caudado putamen se encuentra a nivel de la superficie dendrítica distal (Freund y cols, 1984; Groves y cols, 1994), especialmente a nivel del tercer y cuarto orden (Solis y cols, 2007). Tomando en cuenta esto, junto con nuestros resultados, creemos que las alteraciones en las entradas glutamatérgicas de la CPF podrían resultar en una reorganización de las entradas dopaminérgicas al NAcc con cambios consiguientes en el tono dopaminérgico mesolímbico en ésta área, como ha sido mostrado (Brake y cols, 2004; Meaney y cols, 2002).

Los mecanismos por los cuales la separación materna induce cambios a largo plazo en la arquitectura dendrítica en hipocampo y neuronas de NAcc no son claros. De hecho las neuronas piramidales prelimbicas de la tercera capa de la CPF, tanto como las neuronas espinosas medianas de NAcc, reciben proyecciones excitatorias directas de la región CA1/subiculum del hipocampo (Jay y Witter, 1991; Aylward y Totterdell, 1993; Thierry y cols, 2000). De manera interesante, la separación materna también reduce la expresión de los receptores NMDA en el hipocampo (Jay y Witter, 1991; Aylward y Totterdell, 1993; Thierry y cols, 2000) sugiriendo que la pérdida de aferentes excitatorias durante el desarrollo podrían participar en este proceso. Se sabe que el crecimiento dendrítico y la densidad de espinas está relacionado con el grado de conectividad y actividad aferente (McAllister, 2000). Por ejemplo, el decremento de la actividad aferente in vivo del bloqueo del receptor NMDA disminuye el crecimiento dendrítico y la ramificación de neuronas cerebelares y tectales (Kalb, 1994; Vogel y Prittie, 1995; Rajan y cols, 1999).

Otros posibles candidatos que regulan el crecimiento dendrítico son las neurotrofinas (Lo y cols, 1996), las cuales son alteradas por la separación materna. Reportes

recientes han demostrado que los animales con SM presentan disminuciones en el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo sin cambios en la corteza prefrontal y NAcc (Lippmann y cols, 2007; Rociri y cols, 2007). Sin embargo, en otros reportes se ha encontrado que aumenta o que no hay cambios en el BDNF en ratas adultas con separación materna (Greisen y cols, 2005). Otra neurotrofina, el factor de crecimiento neuronal (NGF) también se ha reportado alterada en ratas con separación materna (Faure y cols, 2005). Las neurotrofinas son expresadas en casi todas las poblaciones neuronales en el SNC, SNP y sus efectos pueden ser neuro-específicos, y las neuronas en cada capa cortical responden a subpoblaciones de neurotrofinas con distintos efectos sobre las dendritas basales o apicales (McAllister y cols, 1995).

El cuidado de los padres tiene una función importante en el desarrollo cognitivo y emocional de la progenie. No obstante, la interacción madre- cría es compleja.

Además de las alteraciones en la expresión de glucocorticoides hipocampales, el aumento en la conducta de Licking-grooming(lamer-acicalar) en la primera semana de vida se relaciona con el aumento de la sobrevivencia de las neuronas hipocampales , la sinaptogenesis y la mejora del rendimiento cognitivo bajo condiciones estresantes. Estos hallazgos sugieren amplia influencia de la conducta materna sobre la expresión de genes del hipocampo (Liu y cols. 2000)

En humanos se ha reportado que la relación padre-hijo es altamente correlacionada con la magnitud de respuesta de DA ante estrés en el NAcc.

CONCLUSIONES

- El Aislamiento social durante 14 días es suficiente para inducir aumento en la actividad locomotora.
- El daño provocado por el aislamiento social es mas severo si es aplicado en etapas tempranas del desarrollo, por la tendencia de un mayor daño en las ratas aisladas en etapa de juego, aunque falta corroborarlo con un análisis estadístico adecuado y el aumento de la n.
- El aislamiento social en la etapa de pubertad y el inicio de la edad adulta también ocasiona cambios conductuales reflejados en el aumento de la actividad locomotora.
- El aumento de la actividad locomotora en los tres grupos analizados, muestra que el aislamiento social provoca daños a nivel conductual cuando se aplica en etapas importantes en el desarrollo conductual en la rata, aunque falta relacionarlo con el análisis morfológico y establecer las áreas cerebrales afectadas.

PERSPECTIVAS

El decremento la función del CREB en animales SM, produce alteraciones en los niveles de BDNF que contribuyen a cambios funcionales en la plasticidad neural que subrayan conductas semejantes a la depresión, incluyendo alteraciones en la actividad locomotora, observándose un significativo decremento de los niveles de BDNF en el estriado de ratas que sufrieron separación neonatal crónica y conducta estereotipada (Lippmann *et al.*, 2007), así este mecanismo molecular podría explicar nuestros resultados en la densidad y longitud dendríticas en el NAcc, con la consecuente alteración en la actividad motora.

Se ha mostrado que la regulación de expresión BDNF en células postmitóticas es controlada por la metilación del ADN. La habilidad que tiene el cuidado materno para regular los factores neurotróficos provee un simple mecanismo para explicar su habilidad para influenciar en estructuras genómicas, celulares y conductuales. Los trabajos muestran que la metilación del ADN establecida en la vida temprana juega un rol en la regulación de genes que modifican las propiedades de la matriz extracelular (ECM), propiedades relevantes de la neuroplasticidad, y que la ECM juega un rol en el mantenimiento de algunas secuelas conductuales en el cuidado maternal (Kaffman y Meaney, 2007). Se han observado modificaciones también en la metilación del ADN, en el exón 17, en la región del promotor del receptor de glucocorticoides, que es particularmente activo en neuronas y es regulado por experiencias tempranas (Francis *et al.*, 2002).

En suma a estos eventos hay diversos cambios en la expresión de genes, como en las subunidades de receptores para GABA y receptores NMDA (Kaffman y Meaney, 2007). Cambios en la excitabilidad cortical, principalmente mediada por glutamato controla la creación de espinas (McAllister, 2000). Además un alto cuidado materno permanentemente incrementa la expresión de los receptores de glucocorticoides (O'Donnell y Grace 1993), este efecto ocurre durante la primera semana de vida y es dependiente de un incremento en la actividad pituitaria-tiroidea y del sistema de serotonina ascendente. Estudios *in vivo* en neuronas hipocampales cultivadas indican que 5HT puede directamente incrementar los niveles de receptores de glucocorticoides y este efecto es mediado por el incremento en la formación de AMPc, y la activación de proteína cinasa A y la expresión de ciertos factores transcripcionales inducibles de AMPc (Meaney *et al.*, 2000).

BIBLIOGRAFIA

A . Domenev, J. Feldon, (1998). The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect?, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 883–890.

A .Y. Deutch, (1992). The regulation of subcortical dopamine systems by the prefrontal cortex: interactions of central dopamine systems and the pathogenesis of schizophrenia, *J. Neural Transm. (Suppl.)* 36, 61–89.

Adriana B; Silvia-Gomez; Rojas D.; Juarez I.; Flores G (2003) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats, *Brain Research* 983-1 128–136

Almeida O. F. 2000. Subtle shifts in the ratio between pro and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J.* 14: 779-790.

American Psychiatry Association,(1994) in: *Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders*, 4th Edition, American Psychiatric Press, Washington, DC.

Anim Learn Behav 1979;7(3):397–405.

Anisman H., Zaharia M.D., Meaney M.J. y Merali Z. 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience.* 16(3-4):149-64.

Aylward R.L. y Totterdell, S.1993. Neuronas en el subiculum de ventral, amígdala y corteza de entorhinal que sobresale al núcleo accumbens: su contribución de somatostatina - boutons de inmunoreactiva. *J. Chem. Neuroanat.* 6: 31-42.

B .J. Sahakian, T.W. Robbins, (1977). Isolation-rearing enhances tail pinch induced oral behavior in rats, *Physiol. Behav.* 18, 53–58.

Baenninger LP. Comparison of behavioural development in socially isolated and grouped rats. *Anim Behav* 1967;15:312–23.

Baker, F., & Rachlin, H. (2002). Teaching and learning in a probabilistic Prisoner's Dilemma. *Behavioural Processes*, 57, 211-226.

Barbas H. 2000. Connections underlying the synthesis of cognition, memory, and emotion in primate prefrontal cortices. *Brain Research Bulletin.* 52(5):319-30.

Bartolomucci A. 2007. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol.* 28(1):28-49.

Beane M.L., Cole M.A., Spencer R.L. y Rudy J.W. 2001. Neonatal Handling Enhances Contextual Conditioning and Alters Corticosterone Stress Responses in Young Rats. *Hormones and Behavior* 41: 33–40.

Bock J., Gruss M., Becker S. y Braun K. 2005. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cerebral Cortex.* 15(6):802-8.

Bogerts B, Lieberman JA, Ashtari M, Bilder RM, Degreef G, Lerner G, Johns C, Masiar S. 1993. Hippocampus-amygdala volumes and psychopathology in chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry.* 33(4):236-246.

Borowsky B. y Kuhn C.M.1991. Monoamine mediation of cocaine induced hypothalamic –pituitary-adrenal activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 204-210.

- Brake W.G., Zhang T.Y., Diorio J., Meaney M.J. y Gratton A. 2004 Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *European J Neurosci.* 19(7):1863-74.
- Brown E.S., Varghese F.P. y McEwen B.S. 2004. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biological Psychiatry* 55: 1–9.
- Caldji C., Francis D., Sharma S., Plotsky P.M. y Meaney M.J. 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and a central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 22:219-229.
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Darlene F., Plotsky P.M. y Meaney M.J. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *PNAS.* 95 (9): 5335-5340.
- Cameron N.M. et al. 2005. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29. 843–865.
- Cameron Nicole M, Champagne, Parent, Eric W, Fish, Kumi Ozaki-Kuroda, Meaney. 2000. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Nature Neuroscience.* 3: 799-806.
- Carlson N.R. 2006. *Fisiología de la Conducta.* Pearson Educación S.A. Ed. 8°. Madrid.
- Catania, A. C. (1992). *Learning.* Englewood: Prentice Hall.
- Cerqueira JJ, Taipa R, Uylings HB, O de Almeida F, Sousa N.2007. Configuración específica de la degeneración de dendritas en neuronas piramidales de la corteza prefrontal de medial producida por los regímenes de corticosteroides diferentes. *Corteza de Cereb.* 17: 1998-2006.
- Champagne F.A and M.J. Meaney. 2006. Stress During Gestation Alters Postpartum Maternal Care and the Development of the Offspring in a Rodent Model. *Biolol Psychiatry.* 59:1227–1235.
- Champagne, Chretien, Stevenson, Zhang, Gratton, and Meaney. 2004. Variations in Nucleus Accumbens Dopamine Associated with Individual Differences in Maternal Behavior in the Rat. *J Neuroscience.* 24(17):4113– 4123.
- Chrousos G.P., Loriaux D.L. y Gold P.W. 1998. *Mechanisms of Physical and Emotional Stress.* Ed. Plenum Press, New York. pp. 3-7.
- Colorado R.A., Shumake J., Conejo N.M., Gonzalez-Pardo H. y Gonzalez-Lima F. 2006. Effects of maternal separation, early handling and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rat. *Behavioural processe.* 2006. 71:51-58.
- Courchesne E, Chisum H, Townsend J. (1994) Neural activity-dependent brain changes in development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol;* 6: 697-722
- Courchesne E, Chisum H, Townsend J.(1994) Neural activity-dependent brain changes in development: implications for psychopathology. *Dev Psychopathol;* 6: 697-722
- D .R. Weinberger, B.K. Lipska, (1995). Cortical maldevelopment, anti-psychotic drugs, and schizophrenia: a search for common ground, *Schizophr. Res.* 16, 87–110.
- Datson N.A., Van der Perk J., De Kloet E.R. y Vreugdenhil E. 2001. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur. Journal of Neuroscience.* 14: 675–689.
- Dawson G, Hessel D, Frey K.(1994) Social influences on early developing biological and behavioral systems related to risk for affective disorder. *Dev Psychopathol* 1994; 6:759-79
- De Kloet E.R, Joëls M. y Holsboer F. 2005. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 6: 463-475.
- De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S. y Joëls M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews.* 19: 269–301.

E .F. Walker, (1994). Developmentally moderated expressions of the neuro pathology underlying schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 20, 453–480.

Einsenberg L. (1995) The social construction of the human brain. *Am J Psychiatry*, 152: 1563-75

F .S. Hall, L.S. Wilkinson, T. Humby, W. Inglis, D.A. Kendall, C.A. Marsden, T.W. Robbins, (1998). Isolation rearing in rats: pre-and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 859–872.

Fernandez-Espejo, E. (2000). How does the nucleus accumbens tick?. *Rev. Neurol.* 30, 845-849.

Flores G, Alquicer G, Silva-Gomez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. 2005. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience* 133:463–470.

Freund TF, Powell JF, Smith AD. 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience.* 13: 1189-1215.

Fuster J.M. 2001. The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. *Neuron.* 30(2):319-33.

Fuster JM (1997) *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe.* Philadelphia-New York: Lipincott-Raven.

Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.

G .B. Varty, G.A. Higgins (1995). Examination of drug-induced and isolation-induced disruptions of prepulse inhibition as models to screen antipsychotic drugs, *Psychopharmacology (Berlin)* 122, 15–26.

G .H. Ihnen, D.L. Penn, P.W. Corrigan, J. Martin, (1998). Social perception and social skill in schizophrenia, *Psychiatr. Res.* 80, 275– 286.

G .H. Jones, T.D. Hernandez, D.A. Kendall, C.A. Marsden, T.W. Robbins, (1992). Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 17-35.

Gabbott P., Headlam A. y Busby S. 2002. Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain Research.* 946(2):314-22.

Ganong W.F. 1998. *Fisiología médica.* México: Manual Moderno. Ed 16.

Garoflos E., Stamatakis A., Mantelas A., Philippidis E. y Stylianopoulou H. 2005. Cellular mechanisms underlying an effect of “early on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Research* 1052: 187 – 195

Geisler S. y Zahm D.S. 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat—Anatomical substratum from integrative functions. *The Journal of Comparative Neurology.* 490: 270–294.

Gesing A. 2001. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroscience.* 21:4822–4829

Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry*; 34: 361-72

Gibb R and Kolb B (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 79(1):1-4.

Gibb R, Kolb B. 1998. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience methods* 79:1- 4.

Gibb R. y Kolb B. 2005. Neonatal Handling Alters Brain Organization but Does Not Influence Recovery From Perinatal Cortical Injury. *Behavioral Neuroscience*. 119(5): 1375–1383.

Goldman-Rakic S (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477-485.

Grace A.A. y Shao-pii O. 2000. Amphetamine Withdrawal Alters Bistable States and Cellular Coupling in Rat Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens Neurons recorded In Vivo. *Journal Neuroscience*. 20(6):2332-2345.

Grace Anthony A., Onn Shao-pii. 2000. Amphetamine Withdrawal Alters Bistable States and Cellular Coupling in Rat Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens Neurons recorded In Vivo. *J Neuroscience*. 20(6):2332-2345.

Grandy D.K., Zhang Y., Bouvier C., Zhou Q., Johnson R.A., Allen L., Buck K., Bunzow J.R., Salon J. y Civelli O. 1991. Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 9175-9179.

Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wörtwein G. 2005. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J. Neurosci. Res*. 79: 772-778.

Groenewegen HJ, Berendse HW, Meredith GE, Haber SN, Voorn P, Wolters JG and Lohman A.H.M. 1991. Functional anatomy of the ventral limbic system-innervated striatum In P. Willner and J. Scheel-Kruger (EDS.). *The mesolimbic Dopamine System: from motivation to action*, Wiley, Chichester, pp. 19-60.

Groves PM, Linder JC, Young SJ. 1994. 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum. *Neuroscience*. 58:593-604.

Guyton T, Gilson AJ. 1967. Clinical use of the vertex view in brain scanning. *J Nucl Med*. 8(5):384-5.

Helmkamp CE, Bigelow LB, Paltán-Ortiz JD, Torrey EF, Kleiman JE, Herman MM, (1999) Evaluation of superior vermal Purkinje cell placement in mental illness. *Biol Psychiatry*; 45: 1370-5

I .C. Weiss, J. Feldon, A.M. Domeney, (1999). Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidences for fragility of the response, *Behav. Pharmacol*. 10, 139–149.

J Zool Lond 1976;179:249–60.

K .M. Baum, E.F. Walker, (1995). Childhood behavioral precursors of adult symptom dimensions in schizophrenia, *Schizophr. Res*. 16, 111–120.

Kemp JM, Powell TPS. (1971). The connexions of the estriado and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc London Ser B*; 262: 441-457.

Kim JW, Kirkpatrick N. (1996) Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry*; 40: 918-22

L .J. Vanderschuren, R.J. Niesink, J.M. Van Ree, (1997). The neurobiology of social play behavior in rats, *Neurosci. Biobehav. Rev*. 21 309–326.

L .P. Baenninger, (1967). Comparison of behavioural development in socially isolated and grouped rats, *Anim. Behav*. 15 312–323.

L .S. Wilkinson, S.S. Killcross, T. Humby, F.S. Hall, M.A. Geyer, T.W. Robbins, (1994). Social isolation in the rat produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition, *Neuropsychopharmacology* 10, 61–72.

Lane RD, Reiman EM, Ahern GL, Schwartz GE, Davidson RJ. (1997). Neuroanatomical correlates of happiness, sadness, and disgust. *Am J Psychiatry*; 154: 926-33

M .A. Geyer, L.S. Wilkinson, T. Humby, T.W. Robbins, (1993). Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia, *Biol. Psychiatry* 34, 361–372.

M .J. Meaney, J. Stewart, (1979). Environmental factors influencing the re-affiliative behavior of male and female rats (*Rattus norvegicus*), *Anim. Learn. Behav.* 7 397–405.

M. D.S. Lapiz, A. Fulford, S. Muchimapura, R. Mason, T. Parker, C. A. Marsden (2003). Influence of posweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission, *Neuro. And Behav. Physic. Vol 3-1*

Martín LM.; Leal I.; Córcoles D.; Bellsolá M.; Coletas J.; Bulbena A. (2008) INTERPSIQUIS. -I; Psiquiatría, Programa EMSE , Hospital del Mar, IMAS, IAPS, Barcelona.

McKinney WT. (1995) Animal research and its relevance to psychiatry. En: Kaplan HI, Sadock BJ (editores). *Comprehensive Handbook of Psychiatry*, Vol 1, Williams & Wilkins; 397-412

Meaney MJ, Stewart J. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav* 1981;29:34–45.

Meaney MJ, Stewart J. Environmental factors influencing the affiliative behavior of male and female rats (*Rattus norvegicus*).

Meredith, G.E., Ypma, P., y Zahm, D. (1995). Effects of dopamine depletion on the morphology of medium spiny neurons in the shell and core of the rat nucleus accumbens. *J. Neurosc.* 15, 3808-3820.

Miller EK y Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Ann. Rev. Neurosci.* 24:167-202.

Pascual, Rodrigo. (2001). Deterioro cerebeloso inducido por aislamiento social temprano: estudio morfológico e inmunocitoquímico. *Rev. chil. neuro-psiquiatr.*, 39-1, p.57-68. ISSN 0717-9227.

Peijs GLAM. Development of Social Behaviour in the Rat. Unpublished Thesis, 1977:1–75.

Pellis SM, Pellis VC. Role reversal changes during the ontogeny of play fighting in male rats: attack versus defense. *Aggr Behav*

Poole TB, Fish J. An investigation of individual, age and sexual differences in the play of *Rattus norvegicus* (Mammalia: Rodentia).

Prescott JW. (1971). Early somatosensory deprivation as an ontogenetic process in the abnormal development of the brain and behavior. En: El Goldsmith, J Moor-Jankowski (editores), *Medical Primatology*, Karger, Basel; 356-75

Reiman EM, Lane RD, Ahern GL, Schwartz GE, Davidson RJ, Friston KJ, Yun LS, Chen K. (1997). Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am J Psychiatry*; 154: 918-25

Robinson TE, Kolb B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491 –8497.

S .L. Hans, J. Marcus, L. Henson, J.G. Auerbach, A.F. Mirsky, (1992). Interpersonal behavior of children at risk for schizophrenia, *Psychiatry* 55 314–335.

Scott JP, Marston M-V. Critical periods affecting the development of normal and mal-adjustive social behavior of puppies. *J Genet Psychol* 1950;77:25–60.

Scott JP. Critical periods in behavioral development. *Science* 1962;138:949–58.

Spitz RZ. (1946) Anaclitic depression: an inquiry into the genesis of psychiatric conditions of early childhood. *Psychoanal Stud Child*; 2: 313-42

Suomi SJ, Harlow HF, Novak MA. Reversal of social deficits produced by isolation rearing in monkeys. *J Human Evol*

T. Hol, C.L. Van den Berg, J.M. Van Ree, B.M. Spruijt, (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats, *Behav. Brain. Res.* 100 91–97.

Taylor GT. Fighting in juvenile rats and the ontogeny of agonistic behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1980;94(5):953–61.

Thor DH, Holloway WR. Social play in juvenile rats: a decade of methodological and experimental research. *Neurosci Biobehav Rev* 1984;8:455–64.

Vanderschuren LJMJ, Niesink RJM, Van Ree JM. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev*

Voorn, P., Vanderschuren, J., Groenewegen, H., Robbins, T. y Pennartz, C. (2005). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27, 468-474.

Y. Goto, P. O'Donnell, (2001). Synchronous activity in the hippocampus and nucleus accumbens in vivo, *J. Neurosci.* 21 (1–5) RC131.