

1994

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



Estudio del efecto del aislamiento social sobre centros cerebrales implicados en el control de la secreción adrenocortical de la rata.

**María del Mar Sánchez Sánchez
Madrid, 1994**

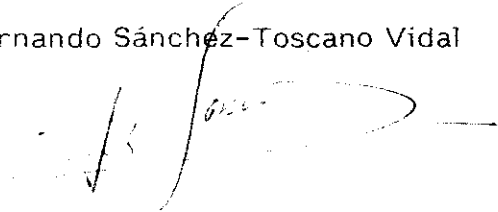
D. FERNANDO SANCHEZ-TOSCANO VIDAL y D^a CARMEN RUA RODRIGUEZ, Profesores Titulares del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, junto con D. DAVID SAPHIER, Assistant Professor (Department of Pharmacology and Therapeutics, Louisiana State University Medical Center, U.S.A.),

CERTIFICAN: que D^a M. MAR SANCHEZ SANCHEZ, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección y en ambos departamentos, el trabajo titulado: "**Estudio del efecto del aislamiento social sobre centros cerebrales implicados en el control de la secreción adrenocortical de la rata**", considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Madrid, 17 de Diciembre de 1993

V^oB^o DE LOS DIRECTORES

Fernando Sánchez-Toscano Vidal



Carmen Rúa Rodríguez

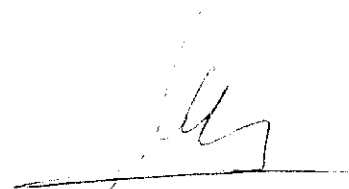


David Saphier



LA INTERESADA

M.Mar Sánchez Sánchez



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

***ESTUDIO DEL EFECTO DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE CENTROS
CEREBRALES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN
ADRENOCORTICAL DE LA RATA.***

Memoria presentada por:
María del Mar Sánchez Sánchez
para optar al grado de Doctor.

Madrid, 1994

*A mis padres, con amor y
agradecimiento.*

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN:

- 1.1.- EL AISLAMIENTO SOCIAL COMO PROBLEMA BIOLÓGICO.-
- 1.2.- PAPEL DEL EJE LIMBICO-HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO-ADRENAL EN LA RESPUESTA DEL ORGANISMO AL ESTRES.-
 - 1.2.1.- El sistema hipotálamo-hipófisis. Histofisiología y regulación.-
 - 1.2.2.- Control aferente del núcleo paraventricular (NPV): Regulación del eje HHA.-
 - 1.2.2.a.- Proyecciones amigdalinas al NPV hipotalámico.-
 - 1.2.2.b.- Núcleo de la estría terminal (NEST).-
 - 1.2.2.c.- Area preóptica (APO).-
- 1.3.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOBRE EL EJE LHHA. ANTECEDENTES, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.
 - 1.3.1.- Efectos del aislamiento sobre la actividad adrenocortical.-
 - 1.3.2.- Alteraciones del sistema hipotálamo-hipófisis en aislamiento.-
 - 1.3.3.- Efectos de la situación de aislamiento sobre la fisiología del sistema de control nervioso aferente del NPV (sistema límbico-hipotalámico).-
 - 1.3.4.- Conectividad sináptica en el eje LHHA. Alteraciones producidas por el aislamiento.-

2. MATERIAL Y METODOS:

- 2.1.- ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES
 - 2.1.1.- Modelo de aislamiento social.-
 - 2.1.2.- Estudio del peso corporal, y de la ingesta y consumo de agua.-
- 2.2.- ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL (HHA).
 - 2.2.1.- Diseño experimental.-
 - 2.2.2.- Valoración de la actividad adrenocortical.-
 - 2.2.2.a.- Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona.-
 - 2.2.2.b.- Medición de los pesos de las glándulas adrenales, timo y testículos.-
 - 2.2.2.c.- Análisis estadístico de los datos.-
 - 2.2.3.- Estudio inmunohistoquímico de la ACTH hipofisaria, y de sus secretagogos hipotalámicos: CRH, AVP y OT.-
 - 2.2.3.a. Fijación y preparación de los tejidos.-
 - 2.2.3.b. Antisueros utilizados.-
 - 2.2.3.c. Inmunodetección: método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).-
- 2.3.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD UNITARIA EXTRACELULAR EN NUCLEOS CEREBRALES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD HHA.-
 - 2.3.1.- Animales y condiciones experimentales.-
 - 2.3.2.- Metodología para el estudio electrofisiológico.-
 - 2.3.2.a.- Preparado experimental.-
 - 2.3.2.b.- Método de registro de la actividad unitaria

- 2.3.2.b.- Método de registro de la actividad unitaria y estimulación eléctrica.-
- 2.3.2.c.- Selección y análisis de los resultados.-
- 2.3.2.d.- Estudio histológico de control.-
- 2.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DEL CAMPO DENDRITICO EN NEURONAS DEL AREA PREEPTICA.-
 - 2.4.1.- Animales de experimentación.-
 - 2.4.2.- Perfusión y método histológico.-
 - 2.4.3.- Obtención de las muestras y procesamiento de los datos.-
 - 2.4.3.a.- Estudio en el área preóptica medial estrial (APM-ST).-
 - Delimitación de la población neuronal estudiada.
 - Cuantificación y comparación estadística de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del APM-ST.
 - 2.4.3.b.- Estudio en el área preóptica lateral (APL).-
 - Delimitación anatómica del tipo neuronal estudiado.
 - Estudio cuantitativo del campo dendrítico de las neuronas multipolares rostrales del APL.
 - a) Cociente: número de espinas/mm de tronco dendrítico.
 - b) Cuantificación del campo dendrítico.
 - 2.4.4.- Tratamiento estadístico de los datos.-

3.- RESULTADOS:

- 3.1.- OBSERVACIONES GENERALES.-
 - 3.1.1.- Peso corporal.-
 - 3.1.2.- Ingesta y consumo de agua.-
- 3.2.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL.-
 - 3.2.1.- Concentración de corticosterona en plasma.-
 - 3.2.2.- Peso de glándulas adrenales, timo y testículos.-
- 3.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA ACTH HIPOFISARIA, Y DE SUS SECRETAGOGOS HIPOTALAMICOS: CRH, AVP y OT.-
 - 3.3.1.- Inmunomarcaje de la ACTH.-
 - 3.3.2.- Inmunomarcaje de la CRH.-
 - 3.3.3.- Inmunomarcaje de la AVP y la OT.-
- 3.4.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE LA ACTIVIDAD UNITARIA EXTRACELULAR DE NUCLEOS CEREBRALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HHA.-
 - 3.4.1.- Núcleo de la estría terminal (NEST).-
 - 3.4.2.- Area preóptica (APO).-
 - 3.4.2.a.- Area preóptica lateral (APL).-
 - 3.4.2.b.- Area preóptica medial (APM).-
 - 3.4.3.- Núcleo paraventricular hipotalámico (NPV).-
- 3.5.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE EL CAMPO DENDRITICO DE NEURONAS DEL AREA PREEPTICA.-
 - 3.5.1.- Area preóptica medial. Densidad de espinas dendríticas de neuronas del APM-ST.-

3.5.2.- Area preóptica lateral. Cuantificación del campo dendrítico de una población homogénea de neuronas.-

3.5.2.a.- Estudio descriptivo del tipo neuronal estudiado: neuronas multipolares rostrales.-

3.5.2.b.- Efectos del aislamiento social sobre el campo dendrítico de las neuronas multipolares rostrales del APL.-

- Número de espinas dendríticas/mm de tronco dendrítico.-

- Características cuantitativas del campo dendrítico.-

a) Variables métricas.

b) Grado de ramificación dendrítica.

c) Densidad dendrítica en torno al soma neuronal.-

4.- DISCUSION.

5.- CONCLUSIONES.

5.- REFERENCIAS.

1. INTRODUCCION

1.1.- EL AISLAMIENTO SOCIAL COMO PROBLEMA BIOLÓGICO.-

El cerebro adulto desarrolla a lo largo de la vida del individuo todo un conjunto de circuitos nerviosos capaces de procesar y dar respuesta adecuada a la ingente cantidad de información que le llega tanto del medio externo como interno. En función de ella se elaboran patrones coherentes de actividad que forman la base de nuestra sensación, percepción y pensamientos, así como de nuestro comportamiento y regulación funcional. Esta circuitería precisa no está completamente desarrollada en el momento del nacimiento, sino sólo esbozada en mayor o menor medida según el correspondiente patrón genético. Este patrón básico de conexiones se concreta posteriormente, siendo modulado mediante las experiencias sensoriales tempranas, mediante complejos procesos de plasticidad neural.

Por lo tanto, en etapas críticas del desarrollo postnatal el establecimiento de los circuitos concretos de los centros nerviosos depende de interacciones específicas entre el organismo y el ambiente que determinan, a nivel celular, características específicas de sus componentes. Esta influencia del ambiente sobre el encéfalo y, por tanto, sobre el comportamiento y fisiología del individuo, cambia con la edad, de modo que las experiencias anómalas suelen tener efectos más profundos durante etapas tempranas del desarrollo postnatal que durante la fase adulta.

La idea de que ciertos aspectos del ambiente, en fases tempranas de la vida, pueden tener consecuencias importantes para las características funcionales de los individuos adultos, es básica en muchas teorías de desarrollo social y comportamental en humanos. Así, existe un buen número de investigadores básicos y clínicos que, desde diferentes puntos de vista, han buscado nexos causales entre las experiencias sociales o perceptuales tempranas y las características comportamentales, emocionales y fisiológicas del individuo adulto.

Una de las primeras evidencias de que la interacción social temprana con otras personas es esencial para el normal

desarrollo, en el hombre deriva de los estudios, en los años 40, del psicoanalista René Spitz. Spitz siguió el desarrollo de niños criados en un orfanato, en una situación de deprivación social y sensorial relativa. Al año de edad, estos niños mostraban un desarrollo motor e intelectual por debajo de lo normal y muchos de ellos desarrollaban un síndrome denominado "depresión anaclítica" (Spitz, 1945; Spitz y Wolf, 1946), caracterizado por introversión, manifestación de síntomas de tristeza, una escasa curiosidad por el ambiente y una marcada propensión a adquirir infecciones.

El gran interés de este tipo de estudios planteó, desde el principio, la necesidad de profundizar en el conocimiento de las alteraciones neurobiológicas que tienen lugar en este tipo de situaciones. Esto ha determinado el desarrollo de un gran número de estudios en modelos animales que reproducen, en mayor o menor medida, las diferentes situaciones patológicas. Así, en los años 60 Harry y Margaret Harlow, junto con Stephen Suomi, entre otros equipos de investigadores, iniciaron la utilización de modelos de aislamiento social en primates no humanos como los macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Según sus estudios, los monos mantenidos en aislamiento social, es decir, sin contacto con la madre ni con sus compañeros durante los primeros 6 meses de vida, exhibían alteraciones comportamentales en edades adultas: patrones de actividad motora alterada - caracterizados por los movimientos estereotipados-, así como inhibición social, autoagresión, comportamiento sexual inapropiado, procesamientos cognitivos atípicos y síntomas de desánimo o depresión (Harlow y col., 1965; Griffin y Harlow, 1966-63; Harlow y Harlow, 1969-319; Sackett, 1972; ; Beauchamp y Gluck, 1988-3 de papere/cisol). Estas anomalías, que aparecían incluso cuando las crías tenían un extenso contacto visual, auditivo y olfativo con otros individuos de la misma especie, iban acompañadas de cambios fisiológicos, entre los que cabe resaltar las alteraciones de tipo neuroendocrino. Así, por ejemplo, su separación materna y su aislamiento de las demás crías en el mono provoca un activación persistente del sistema hipófisis-adrenal (Coe y col., 1985-302), que parece ser debido al fuerte componente estresante de la separación materna y social en estos

animales (Wiener, Bayart, Faull, Levine, 1990; ver revisión de Wiener, Coe y Levine, 1988:en Wiener y col., 1990).

Como en tantos otros campos de las ciencias biológicas, la mayor información sobre el tema proviene de la investigación realizada en roedores. En este sentido, hay que hacer notar la importancia que tiene el hecho de que las crías, tanto de rata como de ratón, tengan un alto nivel de actividad social durante el período de lactancia y, en general, durante todo el desarrollo postnatal, existiendo una importante relación con la madre e interacción con los demás compañeros de la camada. Igualmente, es importante el incipiente estado de desarrollo sinaptológico de los cerebros de estos animales en el momento del nacimiento, lo cual determina que el empobrecimiento social y ambiental tenga profundos efectos sobre la configuración de los circuitos y sobre las respuestas comportamentales y fisiológicas del animal adulto. Así, se ha podido constatar que el aislamiento social a lo largo del proceso del desarrollo (antes del destete, o desde el momento del destete) y durante largos períodos de tiempo, provoca importantes alteraciones comportamentales y neuroendocrinas de carácter duradero e irreversible. Entre la primeras, se ha encontrado de forma consistente una excesiva reactividad y agresividad de los animales aislados ante el manejo por parte del experimentador, así como un síndrome de hiperactividad locomotora en ambiente novel (Hatch y col., 1965; Weinstock y Speiser, 1973; Thoa y col., 1977-51; Einon y Morgan, 1978; Garzón y col., 1979-21; Garzón y del Río, 1981-23; Gentsch y col., 1988-54). Por otra parte, se han constatado importantes alteraciones neuroendocrinas en los animales criados en aislamiento social, concretamente en relación con la actividad adrenocortical (Hatch y col., 1963-18; Hatch y col., 1965-17; Gentsch y col., 1981-303; Gamallo y col., 1986-13; Holson y col., 1991-2). El conjunto de anomalías que se desarrollan en la rata en esta situación experimental se denominó en un principio como "síndrome de estrés por aislamiento" (Barnes, 1959-308; Weltman y col., 1962-309; Hatch y col., 1963-18; Baer, 1971-305). Sin embargo, hay que destacar que este concepto aparentemente homogéneo, a medida que se han ido completando los estudios con una mayor diversidad de situaciones experimentales y parámetros

estudiados, ha sido revisado y matizado en muchos aspectos, llegándose a la idea de que existe una tremenda dificultad a la hora de caracterizar las alteraciones provocadas por la situación de cría en aislamiento social. En gran medida, el trabajo de esta Tesis intenta ser una aportación en este sentido.

Una de las causas de la complejidad biológica que encierra la situación de aislamiento es su carácter estresante. El término "estrés" no tiene fácil definición. Se puede considerar como una reacción que tiene lugar cuando las expectativas -tanto genéticamente programadas, como adquiridas- no son confirmadas por las percepciones actuales o anticipadas del medio interno o externo, de modo que esta discrepancia provoca patrones de respuestas compensatorias (Goldstein, 1987: "stress induced activation..." en Bailliére's Clin Endocrin...). Ateniéndonos a esta definición, el aislamiento sería una situación claramente estresante, pero el elemento "percepción del medio" encierra una gran cantidad de factores variables de carácter biológico tanto en su aspecto externo (variación en los estímulos) como interno (recepción e integración de esos estímulos). Dejando de lado la variabilidad de los posibles estímulos externos que suponen un estrés para el animal, estandarizables hasta cierto punto, en un estudio experimental bien controlado, hay que considerar la variabilidad del otro elemento (el intrínseco), que radicará en las características propias de los sistemas orgánicos del individuo que responden al agente estresante. Entre estos sistemas se encuentra el sistema nervioso, que resulta afectado en una situación de aislamiento en sus diferentes componentes y en sus diferentes niveles de complejidad. El grado de desarrollo y maduración del conjunto de estructuras del sistema nervioso va a determinar que el aislamiento social provoque un cuadro concreto de alteración -más o menos adaptativo- que se va a manifestar en forma de cambios comportamentales, por un lado, y en el estado de su medio interno, por otro.

Centrándonos en este segundo aspecto, vamos a recordar primeramente el concepto clásico de "medio interno" de Claude Bernard (1859-320) que lo considera como una atmósfera fisiológica que actúa como agente intermediario entre el

elemento vivo y el exterior de cada ser. Bernard estudió este medio interno destacando la importancia de su estabilidad en la supervivencia del organismo, y la existencia de dos sistemas reguladores principales: sistema nervioso y endocrino. En relación con esta idea de constancia del medio interno como elemento esencial para la supervivencia del individuo, Walter Cannon (1932-362) acuñó posteriormente el término conocido como "homeostasis". Los mecanismos homeostáticos consisten en la interacción entre el sistema de percepción e integración de la respuesta (sistema nervioso) y el otro sistema de comunicación e integración de las funciones orgánicas a través de hormonas (que constituye el sistema endocrino), lo cual dá lugar a un sistema regulador global neuroendocrino.

En términos neuroendocrinos los agentes estresantes (desafíos reales o percibidos como tales) serían aquéllos que provocan respuestas hormonales dirigidas a minimizar las variaciones de la homeostasis (Selye, 1952). Según esta interpretación del estrés, queda precisada en buena medida la definición de Goldstein (1987), con el inconveniente que tiene su simplicación, pero con la ventaja de que concreta este concepto en un terreno más relacionado con el presente estudio.

Entre los sistemas neuroendocrinos activados por los agentes estresantes, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenocortical (HHA) es de extrema importancia, hasta tal punto que los investigadores han utilizado su activación, tanto en animales como en humanos, como elemento indicador del grado de estrés que está experimentando el organismo. A través de él se canalizan importantes mecanismos fisiológicos de respuesta, frente a situaciones de estrés agudo o crónico.

Además de las estructuras del sistema HHA, hay que considerar la importancia de todos aquéllos centros y circuitos nerviosos que llevan a cabo el control superior de su actividad. Entre estos centros extrahipotalámicos, es fundamental el papel regulador del sistema límbico (Sawchenko y Swanson, 1983-153; ver Holsboer, 1988-66) y concretamente de la amígdala, la cual, sobre la base de sus abundantes conexiones con el hipotálamo, a través de la estría terminal

y la vía amigdalofugal ventral, participa de forma importante en la respuesta a ciertos tipos de estrés (Beaulieu y col., 1991-204; Van de Kar y col., 1991-205).

Puede hablarse, por tanto, de un eje límbico-hipotalámico-hipofisario-adrenal (LHHA) que constituye uno de los sustratos morfofuncionales de la respuesta frente a situaciones estresantes. Debido a la compleja regulación multifactorial de este sistema, no se producen pautas fijas de respuesta frente a los distintos agentes estresantes, como es, por ejemplo, la situación de aislamiento. No hay, por tanto, un único "síndrome de estrés por aislamiento" siendo, por lo tanto, las repercusiones de la situación de aislamiento muy diferentes en los diferentes modelos animales utilizados, como se verá a lo largo de esta tesis.

La importancia de las condiciones de vida durante las primeras etapas del desarrollo del sistema HHA, ha sido puesta de manifiesto en numerosas ocasiones. Así, en la rata parece estar sujeto a regulación por factores de origen materno, y es también dependiente de las interacciones sociales de los individuos con los compañeros de camada (Hofer, 1987-321; Stanton y Levine, 1988-26; Rosenfeld y col., 1992-37). Por tanto, el aislamiento social durante etapas "críticas" del desarrollo postnatal del animal y, en concreto, del propio eje HHA, puede provocar cambios profundos a largo plazo en sus características morfofuncionales que afecten a los mecanismos reguladores de su actividad.

Dada la importancia experimental de la cría en aislamiento social desde el punto de vista neurobiológico, ya que puede ilustrar mecanismos básicos de desarrollo y plasticidad en el establecimiento de circuitos neuronales implicados en la respuesta al estrés, hemos abordado el trabajo de la presente Tesis con el objetivo global de caracterizar mediante un abordaje multidisciplinario las posibles alteraciones en el funcionamiento del sistema LHHA de la rata adulta, como consecuencia de su cría en aislamiento social tras un destete prematuro (que implica también un periodo de deprivación materna).

1.2.- PAPEL DEL EJE LIMBICO-HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO-ADRENAL EN LA RESPUESTA DEL ORGANISMO AL ESTRES.-

Los estímulos estresantes provocan, entre otras respuestas del organismo, dos tipos de reacciones de carácter general: a) la activación del sistema simpático adrenomedular, que determina un incremento en la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal y b) la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, que supone una cadena de procesos complejos neuroendocrinos que determinan, en último término, un incremento de la secreción de glucocorticoides desde la corteza adrenal. En su conjunto estos dos mecanismos generales frente a una situación de emergencia suponen lo que Selye (1952) denominó "respuesta inespecífica al estrés" que podría considerarse como la condición básica que capacita al individuo para superar la situación efectiva o potencial de peligro.

Además de estos mecanismos comunes, los distintos agentes estresantes pueden activar mecanismos neuroendocrinos, autónomos y comportamentales específicos que contrarrestan el desequilibrio particular con el cual se enfrenta el organismo en ese momento existiendo también, por tanto, "respuestas específicas" ante un agente estresante en particular.

Centrándonos en el estudio del eje LHHA vamos, en primer lugar, a esbozar un cuadro esquemático de sus principales componentes y sus mecanismos de regulación ante una situación de estrés (figura 1.1). Los estímulos estresantes inducen una activación del sistema -condicionada por la intervención de centros superiores de carácter integrador, principalmente corticales- que provoca la secreción de factores de liberación hipotalámicos en la eminencia media, de donde pasan al sistema porta hipotálamo-hipofisario. Entre estos factores se encuentran la hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como la vasopresina (AVP) y la oxitocina (OT), neurohormonas que provocan un incremento de liberación de la adrenocorticotropina (ACTH) hipofisaria a la circulación general (Rivier y Plotsky, 1985; Antoni, 1986-311; Gibbs, 1986-128).

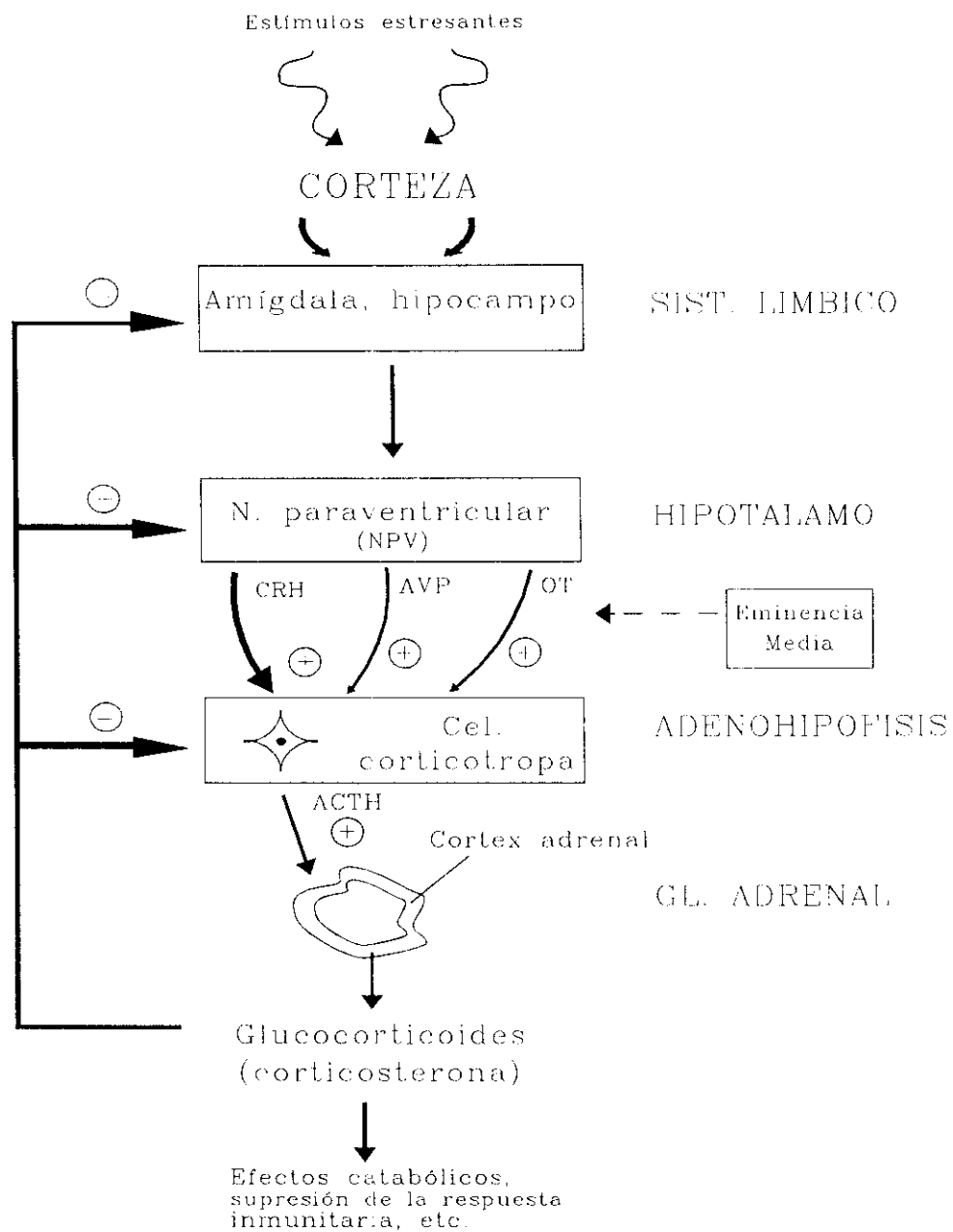


Fig. 1.1 Representación esquemática de la respuesta del eje LHA ante estímulos estresantes

Los niveles plasmáticos elevados de ACTH estimulan la liberación de glucocorticoides adrenales, sustancias altamente catabólicas que producen lipólisis y catabolismo proteico -incrementando con ello la disponibilidad de ácidos grasos libres y aminoácidos en plasma como sustratos para la gluconeogénesis hepática- así como glucogenólisis, provocando con ello un incremento de los niveles de glucosa en sangre (Munck y col., 1984; Baxter y Tyrrell, 1987: los dos en Meaney y col., 1991-62). Estos mecanismos en conjunto incrementan la disponibilidad de sustratos energéticos en un momento en el que órganos como el corazón y el cerebro están sometidos a una intensa actividad. Los glucocorticoides también están implicados en otras acciones como, por ejemplo en la supresión de la respuesta inmunitaria (Munck et al., 1984), protegiendo contra la inflamación en un momento en que la movilidad puede ser importante para el animal.

Sin embargo, la exposición continuada a niveles elevados de glucocorticoides puede representar un riesgo para el organismo. Además de la supresión general de procesos anabólicos, la exposición prolongada a glucocorticoides puede ocasionar múltiples efectos: atrofia muscular, disminución de la sensibilidad a insulina y riesgo de diabetes inducida por esteroides, hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, amenorrea, impotencia, y alteración del crecimiento y reparación de tejidos, así como inmunosupresión (Baxter and Tyrrell, 1987). Por tanto, una vez que el agente estresante termina, se debe "apagar" la respuesta del eje HHA al estrés, en beneficio del individuo. La eficacia de este proceso está determinada por la capacidad de los corticosteroides de inhibir la subsiguiente liberación de ACTH, mediante el efecto de retroalimentación negativa que ejercen estas hormonas adrenales sobre distintos niveles del eje LHHA, a través de receptores específicos de estas hormonas (ver Keller-Wood y Dallman, 1984-51 y Sapolsky y col., 1986-45).

Existen dos tipos de receptores de corticosteroides en el eje LHHA:

- el receptor mineralocorticoide (MR) o tipo I, principalmente localizado en el sistema límbico, y
- el receptor glucocorticoide (GR) o tipo II, en su

mayoría localizado en el hipotálamo (sobre todo, en el NPV) y en el sistema límbico, aunque también se ha descrito su presencia en otras regiones como la hipófisis.

Se ha propuesto que los receptores MR están principalmente implicados en el mantenimiento de la actividad basal del eje LHHA (Dallman y col., 1987 en revisión de Harbuz y Lightman, 1992-24). Sin embargo, parece que tanto los MR como los GR están implicados en la regulación de la sensibilidad y la duración de la activación del eje HHA inducido por estrés: la acción de la corticosterona corticosterona (B) mediada por MR controla el umbral del sistema de respuesta al estrés, mientras que la acción de la B mediada por GR suprime la activación inducida por estrés (Reul y De Kloet, 1985, en revisión de Harbuz y Lightman, 1992-24).

Sobre el cuadro panorámico general de la respuesta del eje LHHA al estrés (fig. 1.1) vamos a detallar, a continuación, cada uno de los procesos estudiados en el presente trabajo. Para ello seguiremos un orden centrípeto, desde los sistemas periféricos -efectores de la respuesta- hasta los centros nerviosos reguladores del eje, a niveles superiores.

1.2.1.- El sistema hipotálamo-hipófisis. Histofisiología y regulación.-

La hipófisis es una glándula endocrina dividida clásicamente en dos partes con distinto origen (Halmi y Moriarty, 1982-75; Page, 1988-77, 1986-76):

a) La neurohipófisis, de origen nervioso, formada a partir de una evaginación ventral del diencéfalo caudalmente al quiasma óptico. Está constituida mayoritariamente por terminales axónicos del tracto hipotálamo-hipofisario que contienen OT y AVP procedentes de las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV) hipotalámicos, células gliales denominadas "pituitarias" y abundantes capilares fenestrados

(lo cual indica que en esta región no existe barrera hematoencefálica). Los terminales nerviosos existentes en la neurohipófisis liberan su contenido al espacio perivascular de estos capilares fenestrados, pasando de este modo a la circulación sistémica (fenómeno denominado "neurosecreción" y esquematizado en la figura 1.2).

b) La adenohipófisis, que posee una estructura típica de glándula endocrina de origen epitelial, formada por células que sintetizan hormonas proteicas (tanto tróficas como de acción directa) y las secretan a los abundantes capilares fenestrados que existen en la zona. Entre las hormonas sintetizadas en la adenohipófisis se encuentra la adrenocorticotropina (ACTH: hormona corticotropa o corticotropina), polipéptido de 39 aminoácidos (ACTH₁₋₃₉) que estimula la secreción de glucocorticoides en la corteza de las glándulas adrenales.

La ACTH procede de la escisión proteolítica de su molécula precursora, la proopiomelanocortina (POMC), de la que también derivan otros péptidos como la β -endorfina, la α -MSH (ACTH₁₋₁₃), la β -MSH, la β -lipotropina (β -LPH) y el péptido intermedio equivalente a la corticotropina (CLIP, ACTH₁₈₋₃₉) entre otros (ver Eipper y Mains, 1980-312). Las células corticotropas de la *pars distalis* adenohipofisaria (lóbulo anterior de la hipófisis), procesan este precursor principalmente a ACTH, β -LPH, y β -endorfina, mientras que las células melanotropas de la *pars intermedia* adenohipofisaria (lóbulo intermedio de la hipófisis) continúan procesando la ACTH para la obtención de α -MSH, CLIP y α -LPH, así como la β -LPH para dar β -endorfina y alfa-LPH (que, a su vez, puede ser procesada a β -MSH).

El control hipotalámico de la secreción de la ACTH sintetizada por las células corticotropas de la *pars distalis* adenohipofisaria se realiza a través de secretagogos hipotalámicos (principalmente CRH, AVP y OT), que son secretados en la zona externa de la eminencia media y conducidos hasta los corticotropos adenohipofisarios a través del sistema porta hipotálamo-hipófisis (fig. 1.2). En dicho esquema también se representa la existencia de una ruta de drenaje venoso desde el lóbulo neural al lóbulo anterior hipofisario, siendo esta "vía corta portal" abundante en en

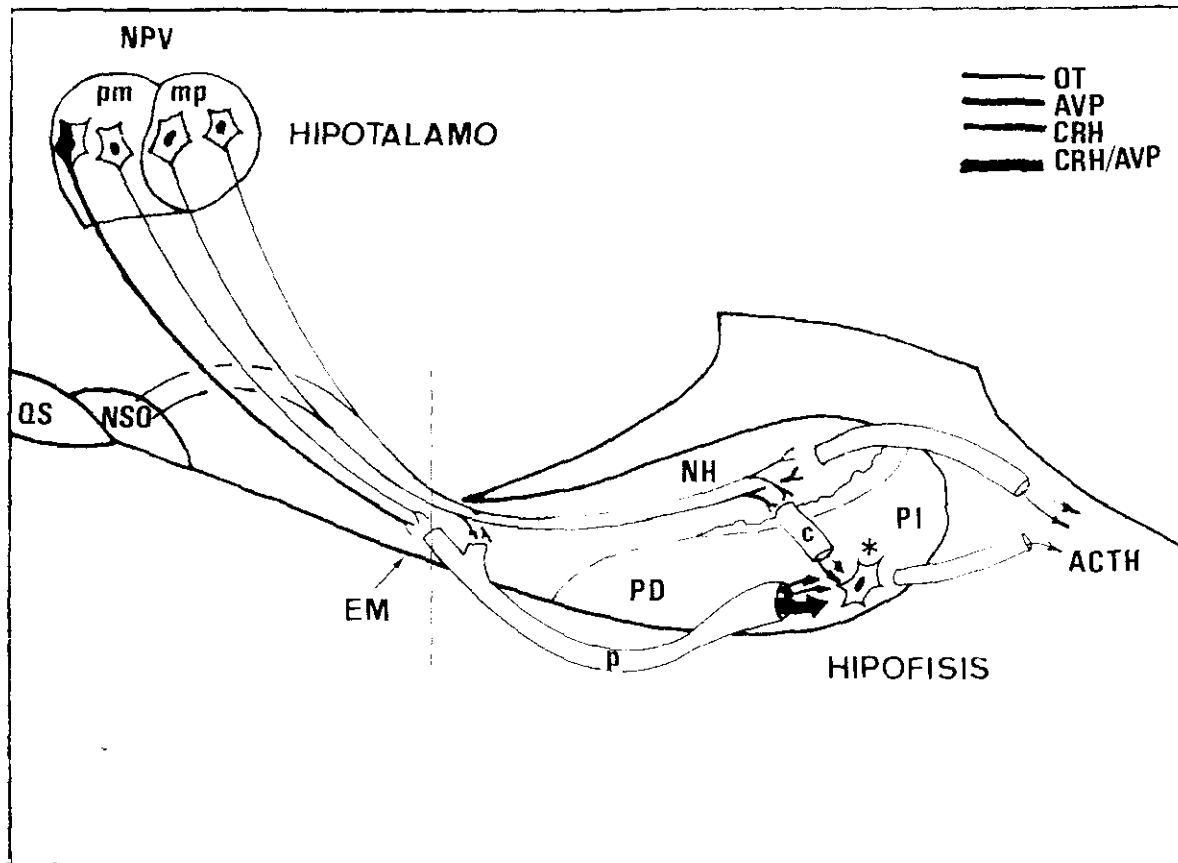


Figura 1.2.- Esquema representativo de un corte sagital del complejo hipotálamo-hipófisis en el que se muestran los componentes implicados en el control de la actividad HHA.

Abreviaturas: c, vía corta portal; EM, eminencia media; NH, neurohipófisis; NPV, núcleo paraventricular (pm, división parvocelular medial; mp, división magnocelular posterior); NSO, núcleo supraóptico; p, sistema porta hipotálamo-hipofisario; PD, pars distalis de la adenohipófisis; PI, pars intermedia adenohipofisaria; QO, quiasma óptico.

* célula corticotropa, --- corte transversal a nivel de la eminencia media (Fig. 1.3).

algunas especies (p.e., rata, ratón y conejo) (Page y col., 1976-323, 1978-322).

Como parte del complejo hipotálamo-hipófisis, la eminencia media (EM) juega un importante papel en los mecanismos reguladores neuroendocrinos suministrando una conexión anatómica entre el hipotálamo y la hipófisis. La EM se compone de distintas zonas (Page, 1986-76, 1988-77; Merchenthaler, 1991-140), como se refleja en la figura 1.3. La capa ependimaria de la eminencia media delimita el receso infundibular del tercer ventrículo; debajo de ella se localiza la zona interna de la eminencia media (ZIEM), cuya capa de fibras está formada en su mayoría por los axones del tracto hipotálamo-hipofisario que contienen OT y AVP, y que no presentan terminales axónicos en esta zona, sino que se dirigen hacia el lóbulo posterior de la hipófisis. La zona externa de la eminencia media (ZEEM) se sitúa ventralmente a la ZIEM y contiene principalmente terminales nerviosos procedentes de neuronas hipofisiotrópicas, entre las cuales se encuentran los terminales que contienen CRH y provienen mayoritariamente del NPV parvicelular (Palkovits, 1982), así como algunos terminales nerviosos que contienen AVP y OT (Antunes y col., 1977; Vandesande y col., 1977-85). Estos terminales nerviosos se localizan próximos al espacio perivascular de los capilares portales existentes en la ZEEM (que presentan un endotelio fenestrado), donde secretan su contenido. En la rata estos terminales se encuentran de forma mayoritaria en la capa empalizada de la ZEEM (Bugnon y col., 1982; Merchenthaler y col., 1982).

De un modo general puede decirse que el hipotálamo juega un papel importante para asegurar la supervivencia tanto del individuo como de la especie, siendo responsable de integrar las respuestas endocrinas, autónomas y comportamentales que garantizan la regulación del metabolismo, el suministro adecuado de nutrientes y agua desde el ambiente, la defensa del animal frente a los predadores y otras amenazas, así como de permitir la generación y el cuidado de la descendencia. Dentro del hipotálamo, el núcleo paraventricular (NPV) juega un papel crucial en el control de funciones neuroendocrinas y autónomas, incluyendo el control de la actividad hipofisaria-adrenocortical y su respuesta a los estímulos

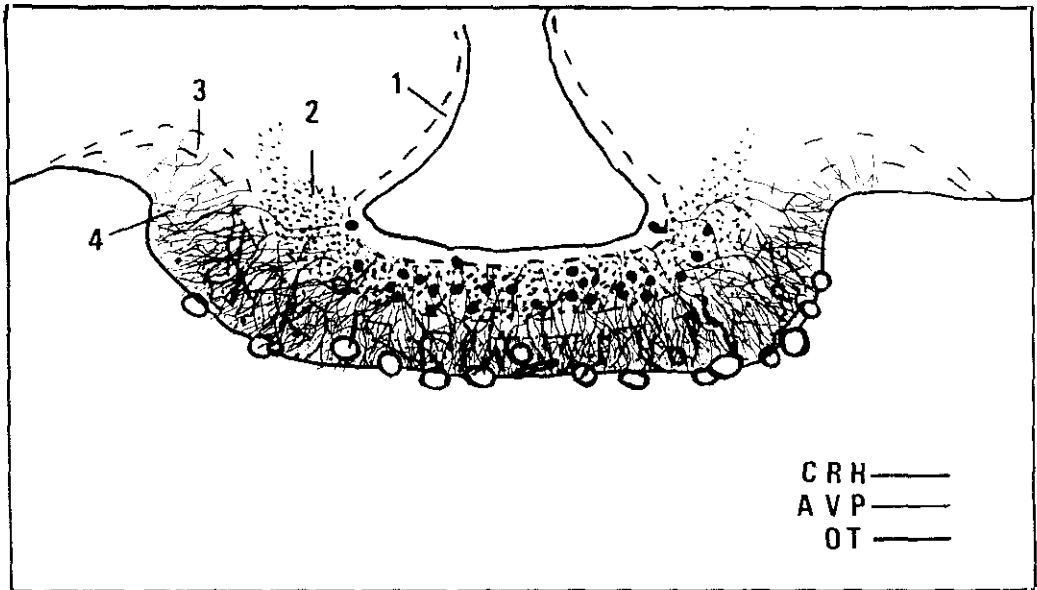


Figura 1.3.-

estresantes. El núcleo puede ser subdividido en función de sus características citológicas y neuroquímicas, densidad de empaquetamiento celular y existencia de zonas con patrones particulares de conexiones aferentes y eferentes. Sin embargo, esta compartimentalización del NPV no es rígida ni tiene carácter excluyente, ya que existe la posibilidad de solapamiento entre sus distintas subdivisiones (Swanson y col., 1986-338).

El NPV contiene una llamativa diversidad de células, en las que se han localizado más de 20 neurotransmisores y neuropéptidos diferentes. Además de esta diversidad, se ha demostrado que las neuronas del NPV presentan la capacidad de expresar distintos neuromediadores simultáneamente, siendo posible que una neurona individual bajo diferentes condiciones fisiológicas presente diferentes combinaciones de ellos (Kiss, 1988-135). Todo esto hace que el NPV sea considerado más apropiadamente como un mosaico dinámico de subgrupos de neuronas especificadas químicamente, cuya composición está sometida a una gran plasticidad funcional.

El NPV hipotalámico presenta dos tipos neuronales de tamaño y morfología característicos, agrupados en las divisiones magnocelular (formada por neuronas de somas grandes, entre 20-35 μm de diámetro) y parvocelular (que contiene neuronas de menor tamaño, con somas de unas 15 μm de diámetro). Estas divisiones difieren entre sí, además, por su composición neuroquímica y sus conexiones aferentes y eferentes. De acuerdo con el criterio citoarquitectónico de Swanson y Kuypers (1980-334) y Sawchenko y Swanson (1983-153), esquematizado en la figura 1.4, la división magnocelular del NPV se divide a su vez en los subnúcleos: magnocelular anterior (ma), magnocelular medial (mm) y magnocelular posterior (mp). Las neurohormonas vasopresina (AVP) y oxitocina (OT), así como sus neurofisinas asociadas, se sintetizan en su mayoría en neuronas separadas de esta última subdivisión que puede dividirse, por tanto, en otros dos componentes -según Sawchenko y Swanson (1983-153): magnocelular posterior medial (mpm), que contiene neuronas oxitocinérgicas, y magnocelular posterior lateral (mpl), que contiene neuronas vasopresinérgicas.

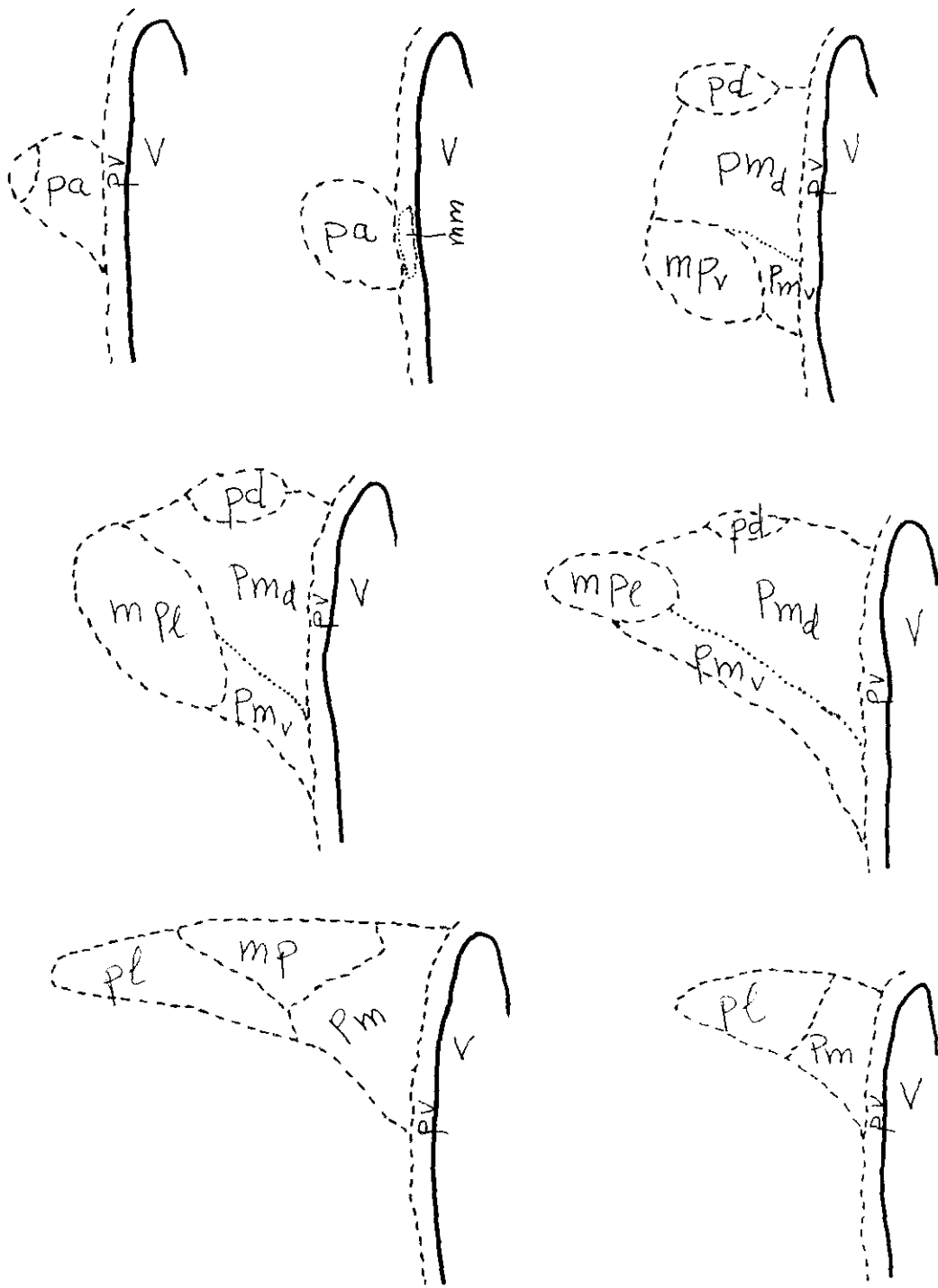


Figura 1.4.-

La mayoría de las neuronas magnocelulares del NPV proyectan al lóbulo neural de la hipófisis, donde los nonapéptidos AVP y OT son liberados a la circulación sistémica (Vandesande y Dierickx, 1975-335; Van Leeuwen y Swaab, 1977-336; ver Dierickx, 1980-124), constituyendo parte del "sistema magnocelular neurosecretor" clásico del hipotálamo, junto con el NSO (fig. 1.2). Los axones de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas que proyectan a neurohipófisis abandonan el NPV en su vértice y cursan lateral y luego ventralmente alrededor del fornix, para unirse con las proyecciones del NSO y formar el tracto hipotálamo-hipofisario. Este fascículo de axones magnocelulares se aproxima a la eminencia media a través del área retroquiasmática lateral y pasa de lateral a medial al desplazarse caudalmente para entrar en la eminencia media desde su extremo anterior, cursando por la ZIEM hasta alcanzar el lóbulo neural de la hipófisis (figura 1.5).

Según los criterios citoarquitectónicos que estamos siguiendo (Swanson y Kuypers, 1980-334; Sawchenko y Swanson, 1983-153), la división parvocelular del NPV se subdivide también en los componentes: parvocelular anterior (pa), parvocelular medial (pm), parvocelular lateral (pl), parvocelular dorsal (dp) y periventricular (pv), esquematizadas en la figura 1.4. La división parvocelular medial del NPV fué subdividida, a su vez, en los componentes parvocelular medial dorsal (pmd) y ventral (pmv) por Sawchenko y Swanson (1983-153). Las subdivisiones parvocelulares anterior, periventricular y medial dorsal constituyen una gran población de células neurosecretoras parvocelulares que forman parte del sistema hipotalámico hipofisiotrófico que controla la liberación de las hormonas adenohipofisarias, a través de sus proyecciones mayoritarias a la zona externa de la eminencia media (Antunes y col., 1977; Vandesande y col., 1977: ¡¡BUSCAR EN CALZÁ Y Col.1990, EN CASA!!!). Entre los neuropéptidos que se sintetizan en estos componentes de la división parvocelular del NPV se encuentran el CRH, la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la colecistoquinina (CCK), la sustancia P (SP), el factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF), la angiotensina II (AII), la somatostatina (SRIF), la encefalina (ENK), la dinorfina, y la neurotensina (NT) (ver Swanson y

Sawchenko, 1983-337).

Los axones de estas neuronas parvocelulares que proyectan a la eminencia media abandonan el NPV también en su vértice lateral, para seguir el curso de los axones magnocelulares del tracto hipotálamo-hipofisario. El fascículo de axones con origen parvocelular entra anterolateralmente en la eminencia media a través del área retroquiasmática lateral, de modo que sus terminales axónicas se localizan en el espacio perivascular de los capilares portales de la ZEEM (figuras 1.2 y 1.5).

Por su parte, la mayoría de células en las divisiones parvocelulares dorsal, lateral y medial ventral proyectan a médula espinal y núcleos del tronco cerebral relacionados con funciones autónomas, como el núcleo del tracto solitario y el núcleo motor dorsal del vago (Swanson, 1977; Sofroniew, 1980; Swanson y Kuypers, 1980-334; Sawchenko y Swanson, 1981a; Swanson y Sawchenko, 1983-153: ¡¡las referencias que no tienen código están en CALZA Y Col., 1990!!).

El CRH, sintetizado mayoritariamente en las neuronas de la división parvocelular medial dorsal del NPV (ver Swanson y Sawchenko, 1983-337) constituye el factor principal responsable de la síntesis y liberación de la ACTH de la hipófisis anterior (Vale y col., 1981-340; Rivier y col., 1982-101). Los axones de estas neuronas que contienen CRH presentan terminales nerviosos en la ZEEM (Bugnon y col., 1982-341; Merchenthaler y col., 1982-342), donde su producto neurosecretor es transportado vía circulación portal a la hipófisis anterior (Silverman y Pickard, 1983-130) para inducir la transcripción del mRNA para POMC y provocar la liberación de ACTH.

Además del CRH, existen otros neuropéptidos, como la AVP y la OT que funcionan como secretagogos del ACTH, al ser liberados en la ZEEM a la sangre portal en respuesta a ciertos tipos de estrés, haciendo posible la existencia de un control multifactorial y complejo de la actividad HHA.

En el caso de la AVP, se ha comprobado que se trata de un potente agente que controla la liberación de ACTH,

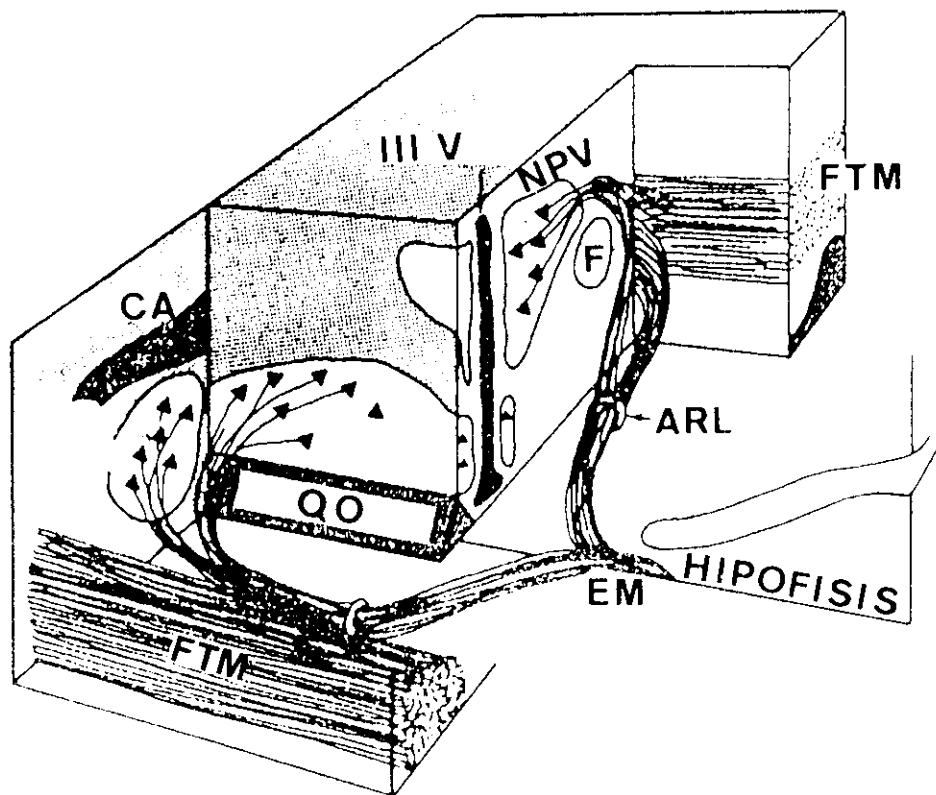


Figura 1.5.-

potenciando de forma sinérgica el efecto liberador que tiene el CRH sobre la ACTH adenohipofisaria (Rivier y Vale, 1983-129; Tilders y col., 1985-310; ver Antoni, 1986-311; Gibbs, 1986-128). Esta AVP tiene un origen diferente del clásicamente establecido para las neuronas vasopresinérgicas magnocelulares del NPV, ya que es sintetizada en una subpoblación de neuronas de la subdivisión parvocelular medial, en coexistencia con el CRH (Roth y col., 1982 y Tramu y col., 1983; ¡¡las dos en Calzá y col., 1990!!; Whitnall, 1988-130; ver Harbuz y Lightman, 1992-24). Estas neuronas CRH/AVP proyectan a la ZEEM (figura 1.2), donde se aprecian terminales axónicos que liberan AVP a los capilares portales hipofisarios (Zimmerman y col., 1973-343; Silverman y Pickard, 1983-78; Buma y Nieuwenhuys, 1988-152).

Sin embargo, existen también evidencias de la presencia de algunas proyecciones desde las neuronas magnocelulares a la ZEEM, que participan en la regulación de la función ACTH adenohipofisaria (Silverman y Zimmerman, 1975-344; Vandesande y col., 1977-85).

Además de la AVP, se ha descrito la existencia de fibras inmunopositivas para OT próximas a los capilares de la ZEEM (Vandesande y col., 1977-85; Vandesande y Dierickx, 1980-124; ver Sofroniew, 1985-79; Richard y col., 1991-123). Estas fibras oxitocinérgicas también liberan su contenido a la circulación portal hipofisaria (Buma y Nieuwenhuys, 1988-152) permitiendo a la OT actuar como co-secretagogo de la ACTH (ver Antoni, 1986-311; Gibbs, 1986-128). La OT ejerce, por una parte, un efecto sinérgico sobre la acción liberadora del CRH sobre la ACTH y, por otra, tiene un efecto aditivo sobre la acción de la AVP (Link y col., 1992-115).

Por último, y debido a la existencia del sistema de drenaje de la "vía corta portal" (esquematisado en la figura 1.2), tanto la AVP como la OT neurohipofisarias pueden alcanzar también los corticotropos de la *pars distalis*, suministrando otra vía de control sobre la liberación de la ACTH adenohipofisaria (Richard y col., 1991-123).

1.2.2.- Control aferente del núcleo paraventricular (NPV): regulación del eje HHA.

La zona de la división parvocelular medial del NPV rica en CRH, presenta una gran diversidad de aferencias, lo cual parece coherente si se tiene en cuenta la gran variedad de modalidades sensoriales y diferentes estímulos estresantes capaces de provocar la activación del eje HHA. Según Swanson (1987-133) y Sawchenko (1991-213), estas aferencias se pueden agrupar en cinco categorías: viscerales, somatosensoriales, circunventriculares, hipotalámicas y límbicas, que constituyen vías nerviosas que controlan la liberación de CRH a la circulación portal (figura 1.6):

1.- Las vías de transmisión de la información visceral o interoceptiva se encuentran entre las aferencias mejor caracterizadas de las neuronas-CRH del NPV. Este circuito nervioso se centra en el núcleo del tracto solitario (NTS), principal receptor de las aferencias glosofaríngeas y vagales. Dentro del NTS existen tres territorios de diferente naturaleza (adrenérgica, noradrenérgica y peptidérgica) que proyectan a la región parvocelular del NPV. También proyectan a esta región otras dos zonas del tronco cerebral que reciben aferencias del NTS: el grupo celular C₁ adrenérgico (localizado en la médula oblonga o bulbo raquídeo) y el núcleo parabraqial lateral (Levin y col., 1987-346; Cunningham y Sawchenko, 1988-345). Cuando se realizan lesiones en componentes de esta vía, se puede alterar la respuesta hipofisaria-adrenal frente a distintos agentes estresantes de carácter sistémico como, por ejemplo, la exposición a vapores de éter, hemorragia, etc. (Szafarczyk y col., 1985-348; Carlsson y Gann, 1987-347).

2.- Por el contrario, no están tan claras las rutas nerviosas a través de las cuales la información sensorial somática y especial (nocicepción, información visual y auditiva, etc.) alcanza el NPV hipotalámico para provocar la activación de la secreción adrenocortical. Existen algunos estudios recientes en los cuales se implica la participación en estas vías de ciertas proyecciones mesencefálicas y

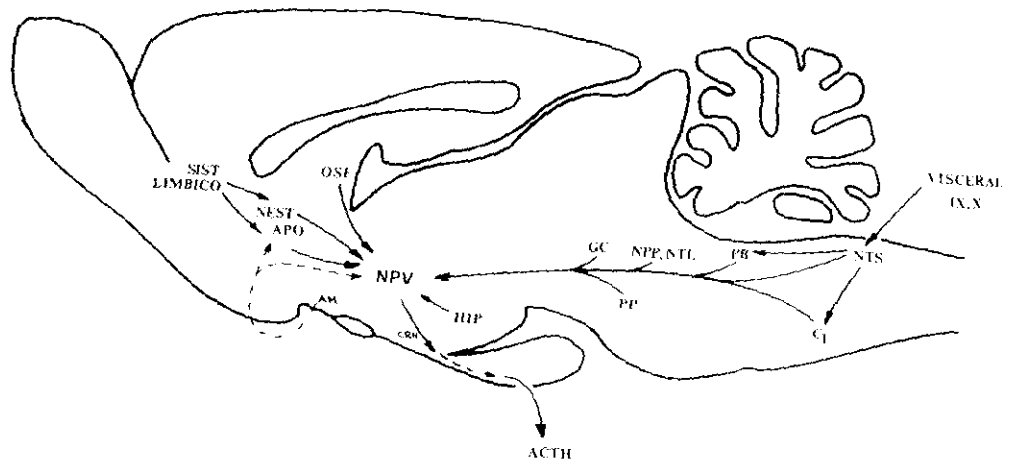


Figura 1.6.

pontinas a la división parvocelular del NPV (Levin y col., 1987-346), como se refleja en la figura 1.6.

3.- Las proyecciones desde órganos circunvetriculares a las células que contienen CRH en el NPV, como es el caso del órgano subfornical (OSF), pueden estar implicados en la liberación coordinada de CRH, AVP y OT en situaciones como hipovolemia (Sawchenko y Swanson, 1983-153).

4.- Se conoce también la existencia de proyecciones desde distintos núcleos hipotalámicos a la región parvocelular del NPV que contiene CRH como, por ejemplo, desde el área preóptica, núcleo ventromedial, áreas hipotalámicas anterior y lateral, y núcleo supraquiasmático (ver Swanson y Sawchenko, 1983-337). Parece probable que estas proyecciones transmitan información que viaja en el fascículo telencefálico medial (FTM) y en el sistema periventricular procedente del sistema límbico, formación reticular y sustancia gris central mesencefálica, etc.

Este tipo de conexión tiene, por lo tanto, relación en algunos casos con las conexiones del apartado siguiente.

5.- Por último y de forma relevante, las proyecciones desde ciertas estructuras límbicas ejercen un importante efecto regulador sobre la actividad HHA, constituyendo lo que se ha denominado como eje LHHA. Además de que la manipulación de ciertas estructuras del sistema límbico (como la formación hipocampal y los núcleos amigdalinos y septales) altera de forma clara la actividad HHA, éstos son sitios sobre los cuales los corticosteroides ejercen su efectos de retroalimentación sobre el eje, provocando que estas regiones ejerzan, a continuación, una inhibición transináptica de la secreción de CRH y AVP desde el NPV (Dallman y col., 1989-110; Sapolsky y col., 1990-108).

El sistema límbico es importante en el procesamiento de la respuesta al estrés, especialmente al de tipo psicogénico (p.e. el estrés por inmovilización), que implica

procesamiento nervioso en el cortex cerebral, es decir, actividad cognitiva. Debido a que el neocortex no proyecta directamente al hipotálamo, la información que provoca la liberación de CRH al sistema portal se transmite al NPV hipotalámico a través de estructuras del sistema límbico.

En la figura 1.7 se representan esquemáticamente las principales vías límbicas implicadas en el control de la actividad HHA (Feldman y col., 1982-218; Feldman y Saphier, 1989-315):

1.- Por una parte, se ha comprobado que la estimulación eléctrica del hipocampo dorsal y ventral provoca incrementos en la secreción de B a través del fornix dorsal y la fimbria del hipocampo, respectivamente (Feldman y col., 1987-349). Las fibras procedentes de ambas regiones proyectan a componentes del septum lateral que envían fibras al hipotálamo, concretamente a la división parvocelular del NPV (Meibach y Siegel, 1977-350).

2.- Por otra parte, la estimulación de ciertas regiones amigdalinas (p.e. la amígdala medial) provoca un incremento de las concentraciones plasmáticas de B que se atenúa tras la lesión de la estria terminal, del núcleo de la estria terminal (NEST) o del área preóptica (APO) (Feldman y Saphier, 1989-315). Estos resultados indican que la amígdala juega un papel importante en el control de la actividad HHA a través de proyecciones sobre el NPV que cursan vía estria terminal o a través de la vía amígdalofugal ventral (De Olmos y col., 1985-316). Dichas proyecciones amigdalinas pueden ser directas sobre el NPV o indirectas a través del NEST y del APO.

Conviene señalar, por último, la importancia funcional que tiene el (FTM) -importante sistema ascendente y descendente de fibras que conecta telencéfalo y mesencéfalo atravesando el área preóptica e hipotalámica lateral (Nienwenhuys y col., 1982-352)-. Este sistema de fibras interviene en la conducción de estímulos nerviosos procedentes no sólo de estructuras límbicas, sino también de estructuras mesencefálicas, etc., que activan el sistema HHA (Feldman y col., 1982-218; Feldman y Conforti, 1985-297) tal

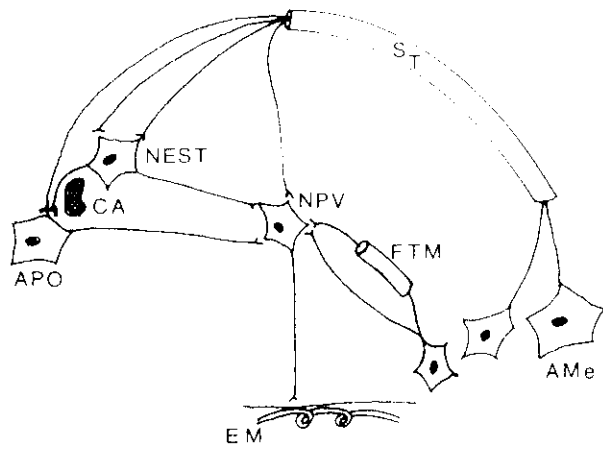
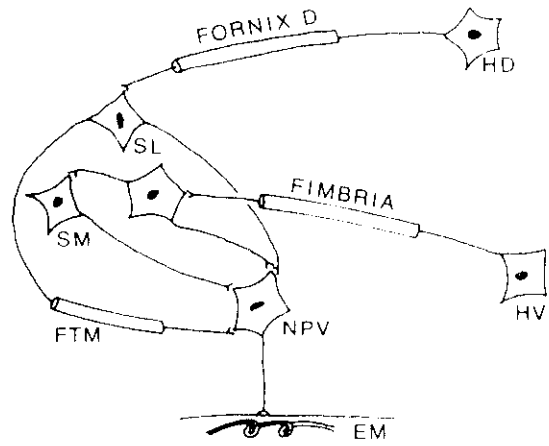


Figura 1.7.-

y como se comentará más adelante y en el capítulo de Discusión.

De todo el conjunto de circuitos límbicos implicados en la regulación del eje HHA hemos centrado nuestra atención en aquellos que implican a la amígdala ya que, por una parte están bien estudiados desde el punto de vista fisiológico y, por otra, pueden jugar un papel importante en ciertas situaciones estresantes, como es el caso particular del aislamiento social.

1.2.2.a.- Proyecciones amigdalinas al NPV hipotalámico.-

Como hemos dicho, la amígdala está implicada en el control de múltiples funciones endocrinas, así como en mecanismos autónomos y comportamentales que permiten la supervivencia del organismo. Nosotros vamos a centrar nuestra atención, a manera de introducción, en los trabajos básicos relacionados con la amígdala y sus proyecciones hipotalámicas implicadas en la respuesta neuroendocrina al estrés.

La amígdala está localizada en los lóbulos temporales del cerebro, sirviendo como centro de relación entre el neocortex y ciertas regiones hipotalámicas, del tronco cerebral y médula espinal implicadas, respectivamente, en el control de la respuesta neuroendocrina y autónoma a estímulos amenazadores para el organismo.

La amígdala de mamíferos presenta una gran complejidad estructural y funcional. Clásicamente se ha dividido en un grupo de núcleos corticomediales, localizado superficialmente y un grupo basolateral situado más profundamente (Johnston, 1923-353). Posteriormente se han considerado diversas subdivisiones (fig. 1.8):

- La amígdala corticomediales está formada por el núcleo cortical (localizado medialmente al cortex piriforme), núcleo medial (medialmente adyacente al núcleo cortical), el núcleo central (localizado entre el núcleo medial y caudadoputamen) y el núcleo del tracto olfatorio lateral

(localizado anteromedial al núcleo cortical) (Krettek y Price, 1978-354; Price y col., 1987-317). Estos autores dividen el núcleo cortical en núcleo cortical anterior, posterior y cortex periamigdalino. El área amigdalina anterior (una región difusa cerca del polo rostral de la amígdala, que se mezcla con el núcleo central) y el área amigdalohipocampal (caudal al núcleo medial) también están incluidos como parte de la amígdala corticomedial.

- La amígdala basolateral está formada por el núcleo accesorio basal -más profundo que el cortex periamigdalino, denominado núcleo basomedial por Krettek y Price (1978-354)-, por los núcleos basales magnocelular y parvocelular -localizados más profundamente que el núcleo basal accesorio y denominados, respectivamente, subdivisiones anterior y posterior del núcleo basolateral por Krettek y Price (1978-354)- y por el núcleo lateral (situado más lateral y dorsal).

La complejidad de funcionamiento de la amígdala se basa en la existencia de conexiones características entre cada núcleo amigdalino y numerosas áreas extrínsecas, a la vez que se establecen complejas conexiones intrínsecas entre los distintos núcleos amigdalinos. Estos circuitos intra-amigdalinos permiten que tenga lugar en este centro límbico la integración y la asociación de la información procedente de algunos centros cerebrales superiores, para que posteriormente las proyecciones amigdalinas eferentes puedan modular las actividades endocrinas, viscerales y comportamentales correspondientes.

De acuerdo con estas conexiones intrínsecas (Nitecka y col., 1981-355; De Olmos y col., 1985-316) los núcleos amigdalinos se han dividido en:

- tipo cortical (semejante a corteza): núcleo basal, lateral, basal accesorio y cortical, cortex periamigdalino, área amigdalohipocampal y núcleo del tracto olfatorio lateral. Presentan dos tipos neuronales característicos: neuronas piramidales de proyección e interneuronas que establecen una complicada microcircuitaría.

- tipo no-cortical: núcleos central y medial, así como el área amigdalina anterior. Sus neuronas eferentes no son de

tipo piramidal, existiendo, no obstante, un complejo sistema de circuitos internos.

Como se ilustra en la figura 1.9, estos dos grupos de formaciones amigdalinas juegan diferentes papeles en la circuitería intrínseca de la amígdala: los núcleos tipo cortical presentan abundantes conexiones entre sí y también proyectan a los núcleos de tipo no-cortical, mientras que éstos últimos presentan escasas proyecciones hacia los primeros. Por tanto, la compleja información que reciben los núcleos amigdalinos tipo cortical de la corteza de asociación sensorial (visual, auditiva, somestésica y multimodal) es transmitida -vía conexiones intra-amigdalinas- hacia el núcleo central (por los núcleos tipo cortical más profundos, situados hacia la izquierda de la figura 1.9) y el núcleo medial (hacia el que proyectan mayoritariamente los núcleos tipo cortical más superficiales) (McDonald, 1992-314). Estos dos núcleos, central (ACe) y medial de la amígdala (AMe) influyen, a su vez, sobre distintas estructuras nerviosas a través de proyecciones eferentes diferentes, constituyéndose como estaciones últimas determinantes de la elaboración de la respuesta amigdalina.

Por otra parte, el AMe y el ACe presentan conexiones recíprocas con partes análogas en el NEST, habiéndose propuesto que amígdala y NEST constituirían una entidad anatómica que podría ser dividida en dos unidades, basándose en criterios citoarquitectónicos, histoquímicos y de conectividad: la unidad AMe-NEST medial y la unidad ACe-NEST lateral (De Olmos y col., 1985-316; Price y col., 1987-317; Moga y col., 1989-192):

- El ACe y el NEST lateral forman un continuo que se caracteriza por sus conexiones recíprocas con áreas del tronco cerebral como el área parabraquial o el bulbo raquídeo (concretamente, con el NTS y con el núcleo motor dorsal del vago), implicadas en la regulación autónoma central (De Olmos y col., 1985-316). Además de estas conexiones mayoritarias, es interesante destacar que el ACe (al igual que el NEST lateral) también proyecta al APO, más concretamente, al área preóptica lateral (APO) y a estructuras hipotalámicas como el

NPV (Berk y Finkelstein, 1981-245; De Olmos y col., 1985-316), principalmente a través de la vía amigdalofugal ventral, aunque existen algunas fibras que cursan vía estría terminal (Price y col., 1987-317).

- El AME y el NEST medial forman un continuo que se caracteriza por sus proyecciones mayoritarias al hipotálamo medial, área preóptica medial (APM), hipotálamo anterior, hipotálamo ventromedial, etc. (De Olmos y col., 1985-316; Price y col., 1987-317). Entre estas conexiones interesa destacar, por su importancia con el control de la actividad del eje HHA, las proyecciones del AMe hacia la división parvocelular del NPV hipotalámico, que cursan en su mayoría a través de la estría terminal, bien mediante proyecciones directas (Silverman y col., 1981-356; Tribollet y Dreifuss, 1981) o bien mediante proyecciones indirectas, principalmente a través del NEST y del APO (Krettek y Price, 1987-328; Weller y Smith, 1982-208; De Olmos y col., 1985-316), como se aprecia en la figura 1.10. Otras fibras de origen amigalino, en cambio, parecen entrar en el hipotálamo a través de la vía amigdalofugal ventral (Price y col., 1987-317). Tanto el NEST como el APO presentan conexiones nerviosas directas con la división parvocelular del NPV que contiene CRH (Saphier y Feldman, 1986-357; Sawchenko y Swanson, 1983-153; Silverman y col., 1981-356).

1.2.2.b.- Núcleo de la estría terminal (NEST).-

El NEST es un componente telencefálico muy estrechamente relacionado con la amígdala -tal y como se ha explicado-, la cual supone su principal fuente de aferencias a través, sobre todo, de la estría terminal (Weller y Smith, 1982-208; De Olmos y col., 1985-316). Presenta interconexiones complejas, además, con otros centros telencefálicos, hipotalámicos y del tronco cerebral tales como la sustancia innominada, el área preóptica, el hipotálamo ventromedial, la región tegmental ventral, la sustancia gris central mesencefálica y el núcleo parabraqiual, entre otras (Swanson y Cowan, 1979; Sofraniew, 1979; Sawchenko y Swanson, 1983-153), a través de los cuales es capaz de regular la funcionalidad de los sistemas

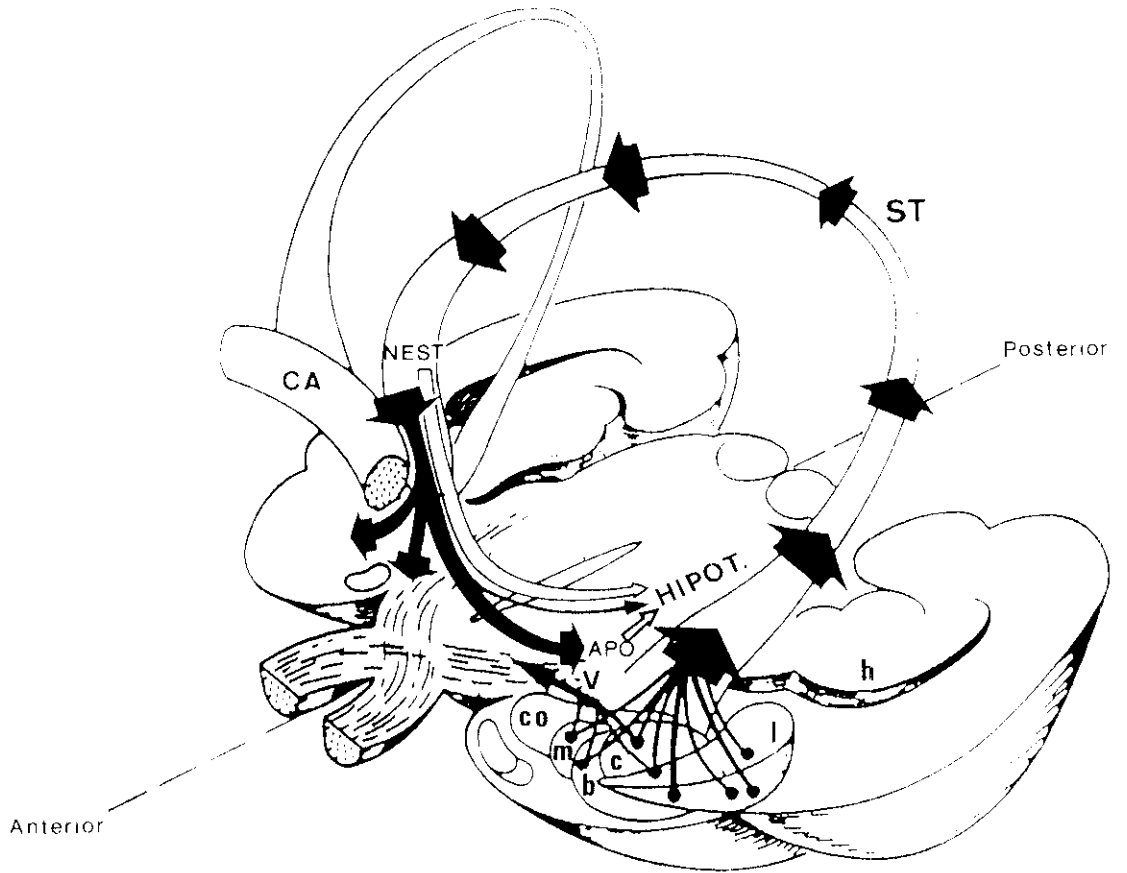


Figura 1.10.-

adrenocortical autónomo, reproductor, así como ciertos tipos de comportamientos como el agonístico y sexual (Allen y col., 1981; Beltramino y Taleinsnik, 1980; Dunn, 1987; Eremy y Sachs, 1976; Faiers y col., 1976; Kawakami y Terasawa, 1974; Shaikh y col., 1986a ¿¿Todos en Phelix y Paull, 1990??).

El NEST, como parte del sistema LHHA, es uno de los principales núcleos telencefálicos implicados en la regulación central de la respuesta al estrés, tanto de tipo ambiental como psicosocial. Concretamente, ciertos estudios que utilizan lesiones han demostrado que la integridad del NEST es necesaria para la transmisión al hipotálamo de la información que activa la secreción adrenocortical tras la estimulación de la amígdala medial (Feldman y col., 1990-327).

La localización del NEST aparece reflejada esquemáticamente en la figura 1.11. Este núcleo ha sido dividido tradicionalmente en una subdivisión medial y en una subdivisión lateral (Krettek y Price, 1978-354). Sin embargo, más recientemente se ha comprobado que el NEST presenta una suborganización bastante más compleja, de acuerdo con sus características citoarquitectónicas, inmunocitoquímicas y de conectividad (De Olmos y col., 1985-316; Moga y col., 1987; (en) Moga y col., 1989-192; Del Abril, 1988-194). No vamos, sin embargo, a desarrollar este aspecto ya que no aporta información de interés en relación con los objetivos del presente trabajo.

1.2.2.c.- Area preóptica (APO).-

El APO es un derivado diencefálico que ha sido relacionado con el control de múltiples funciones, como son la regulación de la temperatura corporal, el mantenimiento del equilibrio hídrico, la regulación de la función cardiovascular, así como de la secreción de gonadotropinas y del comportamiento sexual (Page, 1988-77). Igualmente, y de un modo especialmente interesante, lleva a cabo la integración de la respuesta adrenocortical con las respuestas autónomas ante estímulos estresantes. Concretamente en relación con el eje LHHA objeto de nuestro estudio, se ha

comprobado que la estimulación eléctrica del APO provoca un incremento de la secreción adrenocortical (Redgate y Fahringer, 1973-358; Saphier y Feldman, 1986-357), lo que sugiere una importante implicación de este área en el control de la actividad LHHA. Además, y como ya hemos comentado anteriormente, esta participación en la regulación de la actividad adrenocortical parece estar mediada en gran parte por las aferencias amigdalinas que recibe, bien a través de la estría terminal o a través de la vía amigdalofugal ventral y, a continuación, mediante sus conexiones eferentes con la división parvocelular del NPV. Esto explicaría el hecho de que la lesión del APO disminuya la respuesta adrenocortical que se produce tras la estimulación eléctrica de la amígdala (Feldman y col., 1990-327).

Anatómicamente, el límite anterior del APO viene definido por la lámina terminal y la banda diagonal de Broca, ventralmente por el quiasma óptico y el núcleo supraquiasmático y dorsalmente por la comisura anterior (Page, 1988-77; Bleier y col., 1979-233). Lateralmente, el APO está limitada por la sustancia innominada y el globus pallidus. Caudalmente, el límite entre el APO y el resto del hipotálamo es difícil de definir, ya que la transición se produce de forma casi indistinguible entre el APM y el área hipotalámica anterior (AHA), así como entre el APL y el área hipotalámica lateral (AHL). El APO limita dorsomedialmente también con el NEST, que en realidad entra en el APO en su extensión más anterior (para representación esquemática del APO, ver figura 1.11).

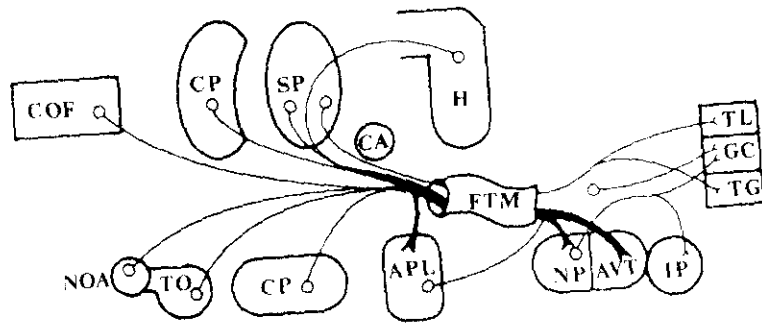
Según los criterios de Gurdjian (1927), Ban (1966-238), Bleier y col. (1979-233), Bleier y Byne (1985-234), el APO puede dividirse citoarquitectónicamente en 3 grupos celulares: un área preóptica medial (APM), un área preóptica lateral (APL) y un estrato preóptico periventricular. En general, no hay fronteras claras entre áreas, sino que estas regiones se denominan de acuerdo con la posición topográfica que ocupan dentro del APO.

El APM se distingue del APL por ser una región más densa en células, dentro de la cual se pueden distinguir varias condensaciones celulares o núcleos (Simerly y col.,

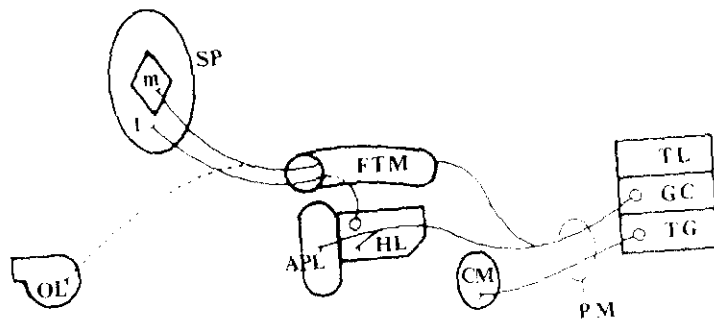
1984-228), entre los que se encuentran el núcleo sexualmente dimórfico del APM (SDN-APM) y también la parte dorsal estriada del APM (APM-ST) descrita por Raisman y Field (1973-241). Este último núcleo presenta unas neuronas características, cuyas dendritas tienen una apariencia arrosariada y se disponen medio-lateralmente, de forma que sinaptan con los axones de la estria terminal, perpendiculares a ellas. Además de este tipo especial de neuronas, el APM en general recibe un importante contingente de aferencias amigdalinas, concretamente de los núcleos cortical y medial de la amígdala, principalmente a través de la estria terminal (De Olmos, 1972-239; Krettek y Price, 1978-328; Berk y Finkelstein, 1981-245).

El APL es una región con menos densidad celular, a través de la cual atraviesa el hipotálamo el importante sistema de fibras ascendentes y descendentes denominado fascículo telencefálico medial (FTM), que interconecta una gran variedad de estructuras telencefálicas con el hipotálamo y el tegmento mesencefálico (Valverde, 1965-249). El FTM constituye un sistema efector común de fibras de regiones telencefálicas como el cortex piriforme, amígdala, tubérculo olfatorio, cortex frontal, septum, etc., que en su paso hacia el mesencéfalo emiten colaterales sobre el área preóptica y otras regiones hipotalámicas (Valverde, 1965-249; Ban, 1966-238). A su vez, el FTM está formado por un sistema ascendente de fibras con origen mesencefálico, que se dirige hacia centros del telencéfalo (Cowan, Guillery y Powell, 1964; Ban, 1966-238) y cierra el circuito denominado "sistema límbico-mesencefálico" por Nauta (1958). Como se puede ver en la figura 1.12, las neuronas localizadas en la zona de paso del FTM rostral reciben más aferencias de la amígdala, cortex piriforme y tubérculo olfatorio que las neuronas localizadas caudalmente en el APO, que reciben más aferencias de la formación reticular mesencefálica.

El APL, por tanto, constituye una región a lo largo de la cual existe una interacción continua entre sistemas olfatorios, límbicos, corticales, talámicos, hipotalámicos y mesencefálicos, de la cual emerge un programa coordinado de respuestas neuroendocrinas, autónomas y comportamentales que conforman el estado emocional particular del animal.



Descendente



Ascendente

Figura 1.12.- (A)

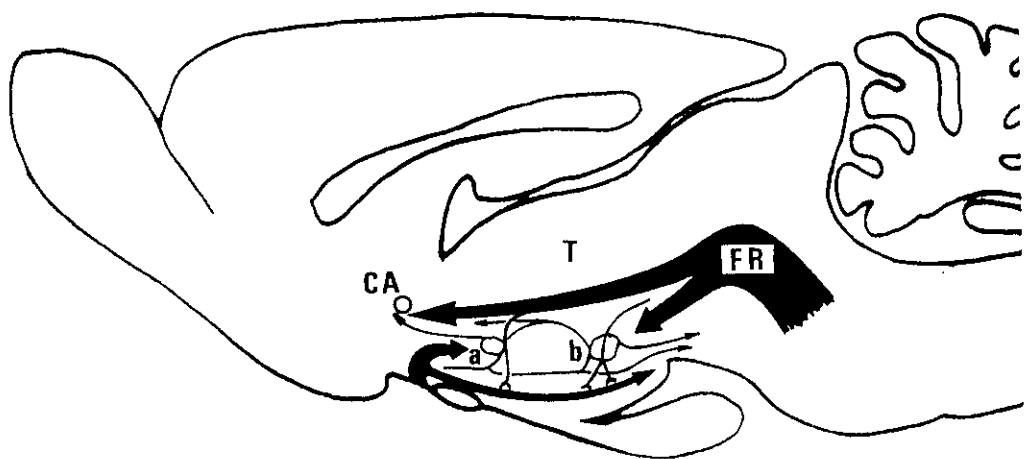


Figura 1.12.- (B)

Entre la gran diversidad de aferencias del APL, esta zona -al igual que el APM- recibe proyecciones de la amígdala, principalmente a través de la vía amigdalofugal ventral (De Olmos, 1972-239), parte de cuyas fibras cursan caudalmente y se incorporan al FTM. Debido a que existen fibras del FTM que proyectan al NPV (12 de 297-tesis), parece lógico suponer que esta vía está implicada en el control de la actividad adrenocortical. Efectivamente, se ha comprobado que la integridad del FTM es necesaria para que produzca una respuesta adrenocortical normal ante ciertos tipos de estrés, como por ejemplo, la estimulación acústica y fótica (Feldman y col. 1971-298) o ante la estimulación de estructuras límbicas como la amígdala (Feldman y Conforti, 1985, 1987; Feldman y col., 1983-318).

Las neuronas que existen en el APO, y más concretamente las del APL son neuronas multipolares con escasas dendritas, que suelen ser largas, de trayecto rectilíneo y escasamente ramificadas; estas características de su arborización dendrítica, junto con el tipo de aferencias que reciben, hacen que cada neurona tenga capacidad de captación de impulsos de distinta procedencia, que se someten a un procesamiento de integración relativamente sencillo. La mayoría de las neuronas del APO cumplen estas características, considerándose pertenecientes al tipo neuronal denominado reticular (Leontovich y Zhukova, 1963-363) o isodendrítico (Ramón-Moliner, 1975). Según Valverde (1965-249), la morfología y disposición de las células del APO indica un posible papel como interneuronas en circuitos tanto intrínsecos como extrínsecos. Este área, por lo tanto, parece a nuestro juicio importante desde un punto de vista funcional por la diversidad de información que recibe, integra -con mayor o menor complejidad- y posteriormente transmite.

Aunque no se puedan establecer circuitos claros de conexiones en el APO, debido a que éstos son muy difusos y las aferencias que reciben sus neuronas tienen gran diversidad de origen, es claro que se trata de una zona rica en circuitos intrínsecos -microcircuitos- particularmente entre las diferentes áreas que la componen, así como con otros núcleos del hipotálamo anterior (Bleier y Ebyne, 1985-

234).

Podría, por lo tanto interpretarse como un gran área de integración difusa de informaciones de procedencia muy diversa de la cual puede emerger información importante en relación con el equilibrio del medio interno. Entre este abanico de funciones, la regulación neuroendocrina frente a situaciones de estrés es, como hemos dicho anteriormente, uno de sus aspectos mejor establecidos.

1.3.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOBRE EL EJE LHHA. ANTECEDENTES, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.-

Como comentamos al principio de la Introducción, la cría en aislamiento social de un animal como la rata, de carácter fuertemente gregario, produce un síndrome comportamental de hiperactividad locomotora que va acompañado de otra serie de alteraciones, entre las cuales es importante destacar las de índole neuroendocrinológica. El animal, sometido a esa situación estresante, va a manifestar toda una serie de alteraciones hormonales determinadas por un complejo sistema de respuesta frente al mismo, del cual el último responsable es el sistema nervioso central.

Centrándonos concretamente en las alteraciones neuroendocrinas que se producen en el eje LHHA, la primera consideración a hacer es que existe bastante bibliografía en lo referente a los aspectos puramente endocrinos, aunque los resultados son muchas veces discrepantes y, a veces, incluso contrapuestos. Esta heterogeneidad de resultados se debe a la gran complejidad de los elementos determinantes de los parámetros estudiados, es decir, al complejo conjunto de circuitos nerviosos que regulan las diferentes respuestas al estrés. Como se comentará más profundamente en la Discusión, estos elementos son extraordinariamente sensibles a las condiciones experimentales utilizadas. Por ejemplo, la edad a la que se aíslan los animales y, por tanto, el grado de desarrollo de las distintas estructuras y sistemas que se estudian parece ser determinante en la inducción de un cuadro

concreto de alteraciones. Por todo ello resulta difícil caracterizar el aislamiento de un modo claro, y más concretamente en relación con las alteraciones hormonales que suscita.

Más complicado todavía resulta el hecho de relacionar dichos cambios hormonales con alteraciones en los niveles centrales del eje LHHA de los animales aislados. En este sentido, la escasez de estudios es notable y los trabajos que existen tratan sólo aspectos parciales del tema, como los que se centran en el estudio del efecto de la cría en aislamiento social sobre los niveles hipofisarios de ciertos péptidos derivados de la POMC en la rata (Holson y col., 1988-53), o sobre el contenido de CRH en el NPV de mono (Ginsberg y col., 1993-273).

Sin pretender, ilusoriamente, dar respuesta a todas las cuestiones y problemas que estamos planteando, hemos pretendido en este trabajo -y ése será nuestro ***objetivo global-*** ***desarrollar un estudio multidisciplinario integrado que permita caracterizar las posibles alteraciones morfo-funcionales que tienen lugar en el eje límbico-hipotalámico-hipófisis-adrenal en la rata, provocadas por la cría en condiciones de aislamiento social desde una fase temprana (predestete) y prolongado hasta la edad adulta.***

Con este planteamiento haremos un énfasis especial en la importancia que puede tener la carencia de estímulos de origen materno durante esa fase temprana del desarrollo previa al destete, así como la eliminación de la interacción social con los compañeros de la camada. Ambos factores, tal y como se ha puesto de manifiesto (Hofer, 1987-321; Stanton y Levine, 1988-26; Rosenfeld y col., 1992-37), son de gran importancia en la compleja regulación del desarrollo del sistema LHHA. Su conocimiento, de un modo integrado, puede ayudar a profundizar en algunos de los aspectos referentes a la organización de la respuesta del organismo a las situaciones estresantes en general.

A continuación, vamos a ir analizando, lo más concretamente posible, los conocimientos existentes sobre los principales aspectos incluidos en el problema estudiado, precisando, en

relación con cada uno de ellos, el/los objetivo/s a conseguir en nuestro trabajo.

1.3.1.- Efectos del aislamiento sobre la actividad adrenocortical.-

La respuesta del organismo frente a un agente estresante lleva consigo la activación del eje HHA, determinando un incremento de la secreción adrenal. La medición de las concentraciones plasmáticas de corticosterona (B) se ha considerado clásicamente como un indicador muy sensible de la activación adrenocortical y, por tanto, de la intensidad del estrés experimentado por el animal, ya que esta hormona es el producto final de la activación del sistema HHA en la rata. Además de la corticosterona, se han utilizado también como indicadores de la actividad adrenocortical los pesos de ciertas glándulas endocrinas como el timo y las propias glándulas adrenales (Hennessy y Levine, 1978-324; Levin y col., 1987-96; Klein y col., 1992-52; Aguilera y col., 1993-1). El papel de estas glándulas como marcadores de estrés se explica si tenemos en cuenta que la exposición al estrés provoca un incremento de los niveles plasmáticos de B que, en caso de ser prolongado, origina una hiperfuncionalidad de las glándulas adrenales -que incrementan su peso-, así como la involución tímica y la supresión de la función reproductora (ver Brain, 1972-325; Levin y col., 1987; Scribner, 1991-34; Klein y col., 1992; ANADIR CHARPENET Y Col., 1981, SAEZ Y Col., 1977, MANN Y Col., 1982). La alteración de la función reproductora incluye la posibilidad de que los glucocorticoides secretados durante el estrés provoquen efectos supresores directos sobre la función gonadal (ver Brain, 1972-325; ANADIR CHARPENET Y Col., 1981, SAEZ Y Col., 1977, MANN Y Col., 1982???)

Algunos trabajos iniciales que estudiaban los efectos de la cría en aislamiento social, como los de Hatch y col. (1963,1965), detectaron la existencia de una actividad adrenocortical incrementada en los animales aislados. Estos resultados, unidos a las alteraciones comportamentales que presentaban estos animales, dió lugar a que se acuñara el término "síndrome de estrés por aislamiento". Sin embargo, ya

indicamos al comienzo de la Introducción que este concepto de "estrés" se ha revisado posteriormente al existir resultados contradictorios en las investigaciones que se han venido realizando sobre el tema. Así, mientras en unos casos se ha corroborado la existencia de una actividad adrenocortical incrementada (Gamallo y col., 1986-13; Holson y col., 1991-2), otros autores no han encontrado alteraciones en dicha función (Benton y col., 1978-306; Morinan y Leonard, 1980-3; Holson y col., 1991-2), e incluso se han obtenido evidencias de que dicha actividad está disminuida, sobre todo, cuando se estudia la respuesta de los animales aislados al estrés (Brain y Nowell, 1971-326; Genstsch y col., 1981-303; Viveros y col., 1988-36). Estos datos se refieren principalmente a las concentraciones plasmáticas de B; en los trabajos en los que se observa una variación de los niveles basales de esta hormona, se produce paralelamente una variación inversa del peso del timo. Sin embargo, la mayoría de los trabajos a los que nos estamos refiriendo no detectan cambios evidentes en los pesos de las glándulas adrenales o de los testículos.

Tomando como referencia la controversia existente en relación con las alteraciones que produce la cría en aislamiento social sobre la actividad adrenocortical de los animales, nos planteamos como **primer objetivo** de nuestro trabajo: ***analizar los efectos del aislamiento social prematuro y prolongado sobre la actividad adrenocortical de la rata. Para ello se procedió a estudiar las concentraciones plasmáticas de corticosterona, y los pesos de las glándulas adrenales y timo en los animales aislados. Con el objeto de comprobar también si la función gonadal había sido afectada por la situación de aislamiento, se procedió a estudiar el peso de los testículos de los animales.***

Se ha comprobado que los cambios comportamentales y fisiológicos provocados a largo plazo por las alteraciones sociales tempranas se hacen más patentes bajo condiciones que implican algún grado de desafío para el animal -situaciones estresantes- (Moore, 1968; Plaut y Grotta, 1971-19). En ausencia de agentes estresantes, en cambio, dichas alteraciones comportamentales y fisiológicas pueden permanecer enmascaradas. Por este motivo, en nuestro trabajo realizamos, además del estudio de la actividad basal del eje

LHHA en los animales aislados, su respuesta al estrés agudo, utilizando para ello la exposición del animal a 15 minutos de inmovilización. Por tanto, *el estudio del efecto del aislamiento social sobre las concentraciones plasmáticas de B se realizó tanto en situación basal como tras los 15 min. de la inmovilización.*

La inmovilización supone un estrés agudo de tipo moderado, con carácter tanto físico como psicogénico (Romero y col., 1993-272), interesante para nuestro trabajo porque requiere la integridad del sistema límbico y, más concretamente, de la amígdala, para que se produzca una respuesta normal del sistema HHA (12 de Van de Kar, 1991-7; Van de Kar y col., 1991-205).

1.3.2.- Alteraciones del sistema hipotálamo-hipófisis en aislamiento.-

Como se ha indicado anteriormente, el eje LHHA es un sistema neuroendocrino integrado por múltiples estructuras y sometido a una regulación multifactorial compleja. El estudio de la actividad adrenocortical -a través de los niveles de B y pesos de los órganos- aporta información sobre la resultante de la actividad del sistema en su conjunto y, por lo tanto, indica de un modo muy general el tipo de alteración que se produce como consecuencia del aislamiento social.

Dado que nuestro propósito consistía en realizar un estudio integrado de las alteraciones que produce la situación experimental de aislamiento sobre diferentes niveles del eje LHHA, a continuación centramos nuestra atención sobre la funcionalidad de los centros de mayor significación como componentes del sistema hipotálamo-hipofisario, esto es, el núcleo paraventricular hipotalámico, la eminencia media y la propia hipófisis. Como ya se ha comentado, se han estudiado tanto en condiciones de actividad basal como en respuesta a estímulos estresantes, y se han intentado relacionar los resultados obtenidos con los del capítulo anterior, ya que las alteraciones en este complejo pueden ser responsables de los cambios endocrinos

periféricos.

Los datos en relación con los efectos del aislamiento sobre el sistema hipotálamo-hipófisis existentes en la bibliografía son escasos. Además, en general, en los trabajos que hemos utilizado no se realizan estudios completos de estos centros teniendo, por lo tanto, un carácter parcial. En relación con la actividad del complejo hipotálamo-hipófisis tras aislamiento, existen datos dispersos y puntuales como, por ejemplo, los reflejados en el trabajo de Holson y col. (1988-53), quienes encuentran que el contenido basal de ciertos péptidos derivados de la POMC está disminuido en la hipófisis de animales aislados desde el destete, sin que se estudien los efectos del aislamiento sobre su respuesta al estrés. También los estudios de Ginsberg y col. (1993-273), puntualizan que la cría en aislamiento social no provoca cambios de contenido de CRH en el NPV.

Sin embargo, sí existen datos interesantes obtenidos en otros modelos de estrés repetido o crónico, en los que se producen alteraciones de secreción adrenocortical. Estas se deben a la existencia de alteraciones en el contenido de ACTH en hipófisis y/o a alteraciones de síntesis y/o liberación de sus secretagogos hipotalámicos, tratándose todas ellas de cambios específicos del tipo de estrés crónico aplicado. Como ejemplos, podemos citar el estrés crónico por restricción, frío o etanol, tras los cuales se produce un incremento del contenido de ACTH en hipófisis anterior (ver Harbuz y Lightman, 1992-24), así como los cambios que se producen en el contenido de CRH y AVP en el NPV y en ZEEM tras ciertos tipos de estrés crónico como la inmovilización (De Goeij y col., 1991-118; De Goeij y col., 1992-127; Bartanusz y col., 1993-276).

Según Holsboer (1988-66), existen otras situaciones que cursan también con alteraciones de la secreción adrenocortical, como el hipercortisolismo que se produce en la depresión, y que, en parte, reflejan una anomalía del sistema hipotálamo-hipofisario o bien de centros superiores que regulan este sistema, de modo que, como resultado, el CRH y otros factores hipotalámicos secretagogos del ACTH podrían ser liberados en exceso al plasma portal.

Basándonos en la información comentada, el **segundo objetivo** concreto del presente trabajo consistió en ***estudiar las alteraciones neuroquímicas producidas por la cría en aislamiento social en el complejo hipotálamo-hipófisis que controla la actividad adrenocortical. Para ello, se realizó un estudio inmunocitoquímico de los péptidos de dicho sistema implicados en el control de la secreción de corticosterona:***

- *por un lado de la hormona corticotropa (ACTH) en la adenohipófisis,*
- *y por otro, de los principales neuropéptidos hipotalámicos secretagogos de la ACTH: CRH, AVP y OT, tanto a nivel de los somas que los sintetizan en el NPV (para detectar posibles cambios de contenido), como a nivel de las fibras que los contienen en la eminencia media (que pueden reflejar cambios de liberación.*

Con el objeto de caracterizar mejor las alteraciones de la actividad hipotálamo-hipofisaria, y al igual que en relación con las alteraciones en la secreción adrenocortical, no sólo estudiamos los efectos del aislamiento social sobre la actividad basal del sistema, sino que completamos los estudios analizando su patrón de respuesta a un estrés agudo por exposición de los animales a 15 min. de inmovilización.

El estudio mediante las técnicas inmunocitoquímicas nos ha permitido analizar tanto cambios de distribución como de contenido de los péptidos estudiados, siendo, a nuestro juicio, la metodología más adecuada de acuerdo con el objetivo planteado en este trabajo.

1.3.3.- Efectos de la situación de aislamiento sobre la fisiología del sistema de control nervioso aferente del NPV (sistema límbico-hipotalámico).-

El siguiente aspecto de nuestro trabajo radicaba en comprobar si el aislamiento social alteraba el control nervioso aferente del NPV hipotalámico, y por tanto de la actividad del sistema HHA. Como ya hemos comentado anteriormente en esta Introducción, existen abundantes

evidencias de que centros extrahipotalámicos participan en el control de la secreción adrenocortical, tanto en situación basal como en respuesta a agentes estresantes. Entre ellos, ya hemos indicado la forma en la que el sistema límbico, y más concretamente la amígdala, juega un papel importante en la regulación central de la actividad del sistema HHA (Zolovick, 1972-359; Feldman y Conforti, 1981-360; Feldman y col., 1990-327; Feldman y col., 1982-218). En este sentido, queremos destacar que no se han encontrado antecedentes en la bibliografía que estudien los efectos del aislamiento social sobre la funcionalidad de dicho sistema límbico-hipotalámico.

La amígdala, y de forma especial el AMe -a través de sus conexiones masivas con el hipotálamo medial-, participa tanto en el control de la secreción basal de glucocorticoides (Matheson y col., 1971 en 204-tesis; Redgate y Fahringer, 1973-358), como en la respuesta adrenocortical a ciertos tipos de estrés agudo, incluyendo el estrés por inmovilización (Beaulieu y col., 1987-204; 12 de Van de Kar y col., 1991-7; Van de Kar y col., 1991-205). En relación con esto último, se ha comprobado que la estimulación eléctrica de la amígdala corticomedia produce un incremento de la secreción de B (Matheson y col., 1971; Redgate y Fahringer, 1973-358), lo cual permite utilizarla experimentalmente como simulación de una situación estresante.

Las proyecciones amigdalinas que intervienen en la respuesta adrenocortical a los estímulos estresantes cursan a través de la estría terminal y la vía amigdalofugal ventral, directamente hasta la división parvocelular del NPV (Silverman y col., 1981-356; Tribollet y Dreifuss, 1981; Gray, 1989-206) o bien mediante proyecciones indirectas, principalmente a través del NEST y el APO (Krettek y Price, 1978-328; Weller y Smith, 1982-208; De Olmos y col., 1985-316; Gray y col., 1989-206; Feldman y col., 1990-327). Tanto el NEST como el APO, a su vez, presentan conexiones nerviosas directas con la región del NPV rica en CRH (Saphier y Feldman, 1986-357; Sawchenko y Swanson, 1983-153; Silverman y col., 1981-356).

La secreción de CRH, AVP, y OT, al igual que sucede con otras neurohormonas, es dependiente de la actividad eléctrica

de sus células neurosecretoras, de modo que resulta posible obtener una medición indirecta de la actividad secretora mediante la observación de su actividad eléctrica. Por tanto, un estudio completo de la funcionalidad del sistema LHHA implica el desarrollo paralelo de estudios neuroendocrinos y electrofisiológicos.

Además del evidente interés de los estudios electrofisiológicos de actividad espontánea celular, se ha demostrado que las neuronas hipofisiotróficas del NPV responden a los estímulos estresantes provocando una actividad adrenocortical semejante a la que tiene lugar tras la estimulación eléctrica de las mismas estructuras nerviosas que transmiten los estímulos, como es el caso de la amígdala (Feldman y col., 1987; Saphier y Feldman, 1987a--los dos en proyecto David receptores GC), lo cual también da validez al uso de aproximaciones electrofisiológicas para examinar la regulación nerviosa de la actividad del eje HHA.

Basándonos en la hipótesis de que una disfunción hipotalámica provocada por el aislamiento social de animales desde una edad temprana podría tener su origen en la alteración de la actividad límbica, especialmente de la amígdala y de sus vías al hipotálamo, (Reite y Capitano, 1985-227), nos planteamos, al respecto, un **tercer objetivo** en nuestro trabajo, que sería ***estudiar electrofisiológicamente el efecto del aislamiento social sobre la actividad espontánea de células del NEST, APO y NPV, así como sobre sus respuestas provocadas por estimulación eléctrica del núcleo medial de la amígdala. Para ello, se realizaron registros extracelulares de la actividad unitaria en dichos núcleos antes y después de la estimulación amigdalina.***

El interés de este estudio se centraba en la información que podría aportarse sobre la actividad basal de estos núcleos así como sobre su respuesta a estímulos estresantes mediados por la amígdala medial; es decir, información relativa a la funcionalidad basal y en respuesta a estímulos estresantes del circuito límbico-hipotalámico que estamos estudiando en los animales aislados y que está implicado en el control de la secreción adrenocortical.

Además de constituir datos pioneros en este aspecto, debido a la ausencia de trabajos de este tipo en modelos de aislamiento social, pensamos que nuestros resultados pueden ser de interés, además, en lo referente al conocimiento del control que ejerce la amígdala sobre el sistema hipotálamo-hipofisario en situaciones de estrés crónico.

1.3.4.- Conectividad sináptica en el eje LHHA. Alteraciones producidas por el aislamiento.-

Los cambios fisiológicos que un determinado centro o sistema de centros nerviosos experimentan en una determinada situación se basan en alteraciones de sus circuitos nerviosos constituyentes, tanto en la cantidad de sinapsis como en la manera en que se establecen. Las poblaciones neuronales se reorganizan, normalmente, de modo que sus contactos sinápticos responden frente al ambiente, sobre todo, en función de las aferencias concretas que reciben.

Las técnicas de estudio que permiten investigar la sinaptología cerebral son múltiples y su utilidad depende, en gran medida, del problema concreto planteado. Dentro de ellas, el estudio cuantitativo del campo dendrítico neuronal, iniciado por Sholl (1953-361), ha sido bastante fructífero en el estudio de los efectos de determinadas situaciones experimentales sobre tipos neuronales bien caracterizados dentro de las estructuras cerebrales. En este sentido, se ha demostrado que los cambios en el campo receptivo neuronal están relacionados con los cambios de la actividad funcional de los centros nerviosos y que, por otra parte, son buenos indicadores de la cantidad y estado funcional de las vías aferentes a los mismos. Por estos motivos, este tipo de estudio puede proporcionar información sobre la circuitería en la cual puede estar implicado un tipo neuronal concreto. Incluimos en el concepto de campo receptivo, además del soma, que no vamos a considerar, tanto la arborización dendrítica como las espinas dendríticas (que juntos constituyen el campo dendrítico). Las espinas dendríticas, descubiertas por Ramón y Cajal (1891), son estructuras especializadas en la recepción e integración postsináptica (Rall, 1970-330; Pongracz, 1985; ver Coss y Perkel, 1985-329) y su número y

tamaño están influidos, en mayor o en menor grado, por la presencia y estado funcional de las aferencias axonales (Globus y Scheibel, 1966-331; Valverde, 1967; Hamori, 1973-332).

Los trabajos de cuantificación del campo dendrítico se han centrado principalmente en estudios de la corteza cerebral de mamíferos tras alteraciones experimentales de las aferencias sensoriales. En este sentido, son especialmente resaltables los trabajos pioneros de Rosenzweig, Bennett, Krech, Diamond y col. (el denominado "grupo de Berkeley"), quienes demostraron que un aumento de estímulos ambientales (ambiente enriquecido) durante el desarrollo del animal determina un aumento del campo dendrítico en las neuronas piramidales corticales. Este incremento está relacionado con un incremento de sinaptología en las neuronas de áreas corticales estudiadas, así como de una circuitería más compleja (Rosenzweig y col., 1962; Krech y col., 1963; Diamond y col., 1964, 1967; etc.). En el mismo sentido, cabe citar trabajos posteriores como los de Greenough y col. (1973), Uylings y col. (1978), Connor y col. (1981), que amplían el estudio a edades diferentes, incluyendo animales adultos, así como las posibilidades de reversibilidad de las alteraciones.

Por el contrario, la cría en ambientes pobres en estímulos, o en situaciones de deprivación sensorial, provoca una disminución del campo dendrítico y del número de sinapsis en las neuronas piramidales corticales (Globus y Scheibel, 1967; Valverde y Ruiz Marcos, 1969; Valverde, 1971; Cragg, 1975b; etc.).

El establecimiento más preciso de la relación entre el campo receptivo neuronal y sus aferencias concretas fué establecida casi paralelamente a los trabajos anteriores, utilizando principalmente como situación experimental la enucleación postnatal temprana. En esta línea se encuentran los trabajos de Globus y Scheibel (1966-331), Valverde (1968), Ruiz Marcos y Valverde (1970), Sánchez-Toscano (1980), Heumann y Rabinobicz (1982), Yinon y col. (1984), entre otros.

Por otra parte, cabe mencionar, en el mismo sentido, los trabajos realizados en las neuronas de Purkinje del cerebelo en cepas mutantes de ratón, donde se establecen relaciones interesantes entre el campo dendrítico y las aferencias concretas que recibe (Sotelo, 1976; Bradley y Berry, 1978).

En relación concretamente, con el aislamiento social, cabría incluir, como precedentes, todos los trabajos pioneros mencionados que estudiaban los efectos de un ambiente enriquecido (o empobrecido) sobre la corteza cerebral. No obstante, en ellos el interés se centraba en la importancia que una mayor o menor cantidad de estímulos podría tener en la sinaptología cortical y su repercusión sobre el comportamiento, en el sentido de determinar una mayor o menor "inteligencia" en los animales.

En la misma línea, pero profundizando en el estudio comparativo de las áreas de integración y sensoriales primarias, Struble y Riesen (1978-258) constataron, en monos aislados socialmente desde el nacimiento, una reducción de la ramificación dendrítica en neuronas piramidales de las áreas somatosensorial y motora, pero no de otras (corteza visual y prefrontal). El carácter específico de estos efectos del aislamiento social en monos ha sido también comprobado en el cerebelo, donde las células de Purkinje presentaban somas más pequeños y una menor ramificación dendrítica, mientras que otras células cerebelosas como, por ejemplo, las células grano no variaban (Floeter y Greenough, 1979-260). Estos autores proponen que el aislamiento social produce fenómenos específicos de plasticidad en ciertas áreas cerebrales, argumentando en contra de algún tipo de efecto generalizado sobre el crecimiento cerebral.

En todos estos casos la interpretación de los resultados es acorde con las ideas establecidas en los demás trabajos que hemos comentado: la extensión y complejidad del campo dendrítico de un tipo neuronal se correlaciona, de un modo directo, con la cantidad y complejidad de su información aferente y es indicativa, a grandes rasgos, de la funcionalidad del centro al cual pertenece. No ocurre lo mismo, al menos aparentemente, en el trabajo de Juraska y col. (1985-

262), los cuales encontraron que el aislamiento social de ratas de 23 días de edad durante un mes inducía un incremento en la densidad dendrítica alrededor del soma en células granulares del giro dentado hipocampal. Los autores no hacen referencia a posibles variaciones en la densidad de espinas dendríticas, pero sus resultados indican que la relación directa entre ambiente y campo dendrítico no es tan fácilmente interpretable. Lógicamente, cuanto mayor conocimiento se tenga del circuito estudiado y de sus aferencias, mayor información puede obtenerse al respecto.

Quizás, por esta razón, los estudios de esta naturaleza desarrollados en estructuras nerviosas directamente implicadas en la regulación del medio interno sean más escasos. Entre ellos cabe citar los estudios planteados en relación con el dimorfismo sexual y la acción de los esteroides gonadales por Raisman y Field (1973-241) en la parte dorsal estriada del APO, Miyakawa y Arai (1987) en el septum, y Frankfurt y col. (1990) en el núcleo ventromedial hipotalámico. Del mismo modo, pero con una orientación diferente Sánchez-Toscano y col. (1989-223) estudiaron las neuronas del NSO durante la hibernación en el erizo de tierra, constatando un incremento generalizado de su campo dendrítico. Los resultados obtenidos en estos núcleos son coherentes, en líneas generales, con los supuestos extraídos de la bibliografía tradicional sobre plasticidad sináptica aunque, como ya hemos hecho notar y se verá extensamente en la Discusión, cabe pensar en la existencia de mecanismos de plasticidad alternativos.

De acuerdo con el objetivo global enunciado al principio de esta Introducción, en el sentido de desarrollar un estudio integrado de las alteraciones del eje LHHA que tienen lugar en el aislamiento, nos planteamos llevar a cabo un estudio preliminar sobre la conectividad de algún centro que pudiera ser especialmente relevante en la regulación del efecto. A la vista de los resultados obtenidos en los diferentes apartados del estudio y, sobre todo, en los electrofisiológicos, consideramos que el APO podría constituir, en su conjunto, un centro significativo a la hora de estudiar posibles alteraciones en la conectividad sináptica del eje. Los motivos de esta elección, que se explicarán con detalle a lo

largo de la tesis, serían, principalmente:

- El APO constituye una zona interpuesta entre el sistema límbico -en concreto, la amígdala- y el sistema HHA, en la que han de llevarse a cabo importantes funciones de integración de aferencias y elaboración de respuestas.

- Algunas de sus aferencias están relativamente bien delimitadas, por ejemplo, la estría terminal, y existen neuronas preópticas directamente implicadas en su recepción -especialmente las neuronas del APM-ST (Raisman y Field, 1973-241)-.

- Está suficientemente bien establecida la conectividad entre APO y NPV, elemento esencial del eje, como se ha visto anteriormente.

- Por último, y a través de estudios detallados de su citoarquitectura, encontramos tipos neuronales suficientemente homogéneos y bien definidos para realizar un estudio cuantitativo de este tipo (ver Material y Métodos).

Por todo ello, el **cuarto objetivo** de nuestro trabajo fué ***estudiar, desde el punto de vista cuantitativo, las posibles alteraciones de conectividad sináptica del APO tanto en su división medial como lateral, mediante la valoración de determinados parámetros significativos del campo dendrítico en poblaciones neuronales homogéneas.***

Para ello, el estudio se dividió en dos vertientes:

1) Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del área preóptica medial estriar (APM-ST), que reciben aferencias amigdalinas bien caracterizadas anatómicamente sobre sus dendritas orientadas a través de la estría terminal. Con ello pretendíamos comprobar el papel de esta vía en la regulación de la actividad del eje HHA en los animales aislados.

2) Cuantificación de una serie de parámetros del campo dendrítico de neuronas del APL, pertenecientes a un tipo homogéneo previamente definido por nosotros, con dos fines concretos:

- comprobar si se producen cambios que responden a un patrón general de alteración dentro del APO.
- comprobar si la conectividad del APL - principalmente relacionada con el FTM-, diferente de la existente en el APM-ST, puede llevar a cabo efectos moduladores diferentes sobre la sinaptología de las neuronas.

RESUMEN DE OBJETIVOS:

Con el presente trabajo se pretendía desarrollar un estudio multidisciplinario integrado que permitiera caracterizar las posibles alteraciones morfo-funcionales que tienen lugar en el eje límbico-hipotalámico-hipófisis-adrenal en la rata, provocadas por la cría en condiciones de aislamiento social desde una fase temprana (predestete) y prolongado hasta la edad adulta. En este sentido, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

* Analizar los efectos del aislamiento social prematuro y prolongado sobre la actividad adrenocortical de la rata. Para ello se procedió a realizar el estudio de los efectos de dicha situación sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona -en situación basal y en respuesta a estrés agudo por inmovilización-, así como los pesos de las glándulas adrenales y timo. Con el objeto de comprobar también si la función gonadal había sido afectada por la situación de aislamiento, se procedió a estudiar el peso de los testículos de los animales.

* Estudiar las alteraciones neuroquímicas producidas por la cría en aislamiento social en el complejo hipotálamo-hipófisis que controla la actividad adrenocortical. Para ello, se realizó un estudio inmunocitoquímico de los péptidos de dicho sistema implicados en el control de la secreción de corticosterona:

- por un lado de la hormona corticotropa (ACTH) en la adenohipófisis,
- y por otro, de los principales neuropéptidos hipotalámicos secretagogos de la ACTH: CRH, AVP y OT, tanto a nivel de los somas que los sintetizan en el NPV, como a nivel de las fibras que los contienen en la eminencia media.

* Examinar electrofisiológicamente el efecto del aislamiento social sobre la actividad espontánea de células del NEST, APO y NPV, así como sobre sus respuestas provocadas por estimulación eléctrica del núcleo medial de la amígdala.

Para ello, se realizaron registros extracelulares de la actividad unitaria en dichos núcleos antes y después de la estimulación amigdalina.

* Estudiar, desde el punto de vista cuantitativo, las posibles alteraciones de conectividad sináptica en poblaciones neuronales homogéneas del APM-ST y del APL. Para ello, se procedió a la cuantificación de:

- la densidad de espinas dendríticas en neuronas del área preóptica medial estriada (APM-ST), que reciben aferencias amigdalinas bien caracterizadas anatómicamente sobre sus dendritas orientadas a través de la estria terminal.
- una serie de parámetros del campo dendrítico de neuronas del APL, pertenecientes a un tipo homogéneo previamente definido por nosotros.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES: MODELO DE AISLAMIENTO SOCIAL.-

2.1.1.- Modelo de aislamiento social.-

Para la realización de este trabajo se han utilizado un total de 72 ratas macho albinas: 48 individuos de la cepa Wistar -procedentes de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid-, y 24 animales de la cepa Sprague-Dawley -procedentes de la Escuela de Medicina de la Universidad Estatal de Louisiana (U.S.A)-, utilizándose estos últimos en los experimentos de electrofisiología.

Las camadas se igualaron a 10 crías (5 machos y 5 hembras) en el día del nacimiento, manteniéndose los animales en condiciones controladas de temperatura (22°C), humedad (50%) y luz (19:00-7:00hr). Se utilizó un fotoperíodo invertido con el fin de realizar los experimentos en la fase de mayor actividad de la rata (animal de actividad nocturna), debido a la existencia de ritmos circadianos en algunas de las variables consideradas para estudio.

De acuerdo con nuestros objetivos, se utilizó un modelo experimental de aislamiento social -modificación del modelo de depresión experimental de Garzón y col. (1979)- en el cual se destetaron prematuramente las crías de rata, manteniéndolas aisladas socialmente hasta la época adulta. Por tanto, los grupos experimentales consistieron en:

a) un grupo de animales destetados prematuramente a los 15 días de edad (momento en el que se produce la calcificación de los incisivos) y mantenidos en aislamiento social durante 2 meses (hasta los 75 días de edad) en jaulas opacas individuales de 25x25x15cm (A2M);

b) un grupo control formado por ratas macho destetadas a los 21 días de edad y mantenidas hasta la edad de 75 días en grupos de 4 animales por jaula, siendo las dimensiones de ésta: 50x25x15cm (C2M).

Este modelo de aislamiento social implicaba, por lo tanto, una situación en la cual los animales tenían experiencias auditivas y olfativas relativamente normales, pero no podían ver, o tener contacto táctil con ningún otro animal de la colonia. De este modo, las condiciones de vida,

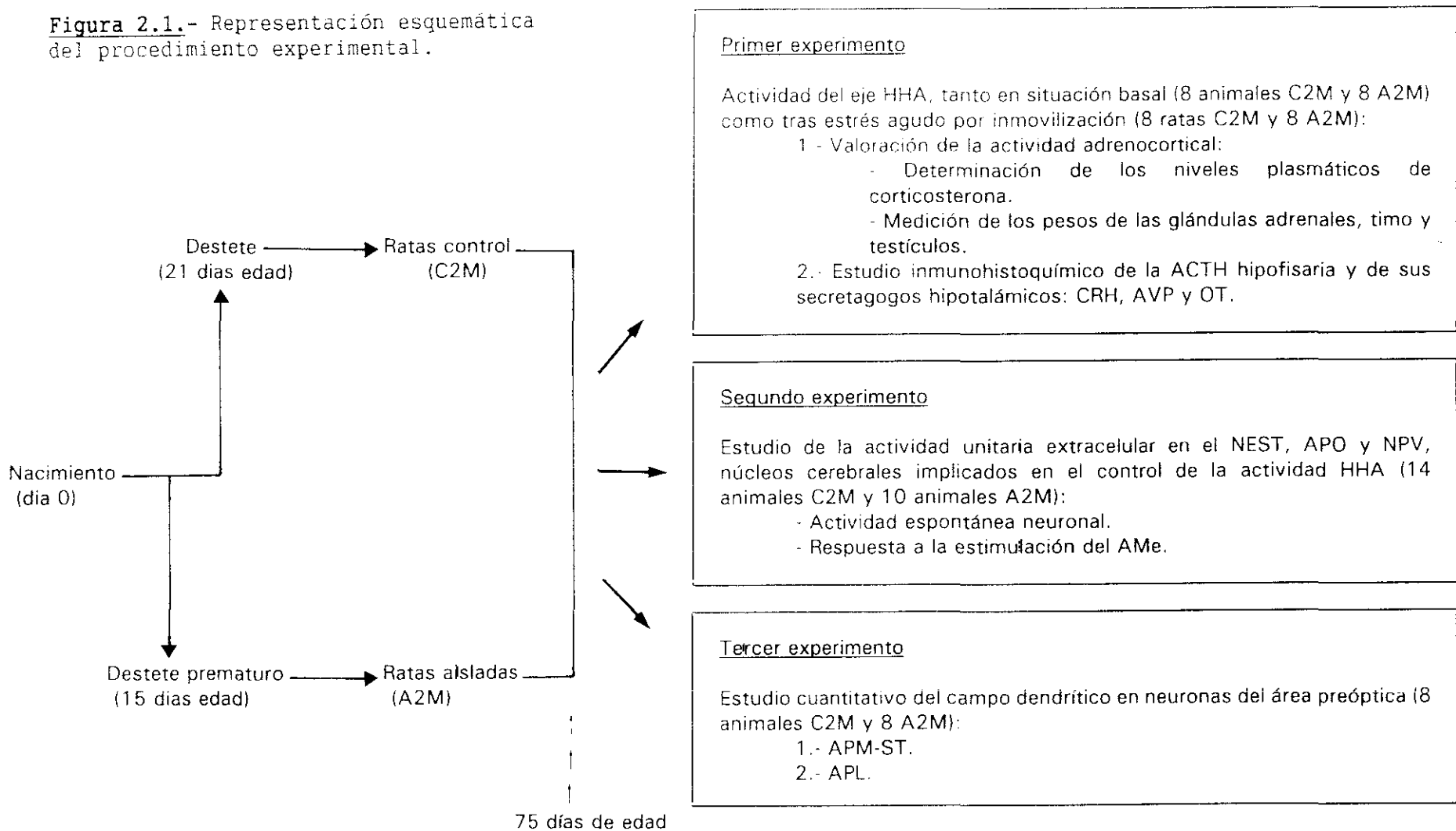
en cuanto a las relaciones sociales y estímulos sensoriales derivados de ellas, fueron diferentes entre los dos grupos experimentales.

La manipulación de los animales por parte del experimentador se redujo al mínimo, consistiendo en la limpieza de las jaulas 1 vez por semana y en el pesaje de los animales 2 días antes de la realización de los experimentos.

Los animales aislados fueron alimentados con pienso compuesto enriquecido (al igual que las hembras lactantes) y leche los primeros 6 días de aislamiento, para evitar problemas de malnutrición en estas crías. A partir de los 21 días de edad tanto los animales control como los animales aislados socialmente fueron alimentados con pienso compuesto estándar y agua *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio.

El procedimiento experimental, así como los estudios a los que se destinaron los grupos experimentales, se expresan esquemáticamente en la Figura 2.1:

Figura 2.1.- Representación esquemática del procedimiento experimental.



2.1.2.- Estudio del peso corporal y de la ingesta y consumo de agua.-

A lo largo de la vida de los animales se realizaron observaciones periódicas sobre su estado general. Igualmente, se realizó la comparación del peso corporal, ingesta y consumo de agua entre los animales control y aislados. El peso corporal de los animales se midió 2 días antes de la realización de los experimentos, y el control de la ingesta y del consumo de agua se realizó suministrando a los animales cantidades de pienso compuesto y agua pesados previamente, midiéndose el consumo realizado cada 24 horas, durante 10 días consecutivos previos al día de sacrificio. Las medidas se expresaron en gramos de agua o pienso compuesto consumidos por animal y día.

El tratamiento estadístico de estos datos se realizó mediante un test t de Student, comprobándose previamente la normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

2.2.- ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-ADRENAL (HHA).-

2.2.1.- Diseño experimental.-

En este primer experimento se utilizaron un total de 32 ratas macho Wistar, de las cuales 16 fueron destetadas a los 15 días de edad y aisladas a continuación durante 2 meses (A2M), de acuerdo con las condiciones experimentales expuestas en el apartado anterior. Los 16 animales restantes constituyeron el grupo control (C2M).

Para el estudio de las distintas variables indicativas de la actividad del eje HHA en situación basal, se sacrificaron por decapitación 8 animales C2M y 8 A2M inmediatamente después de extraerlos de sus respectivas jaulas, procediendo rápidamente a la toma de muestras: sangre del tronco, encéfalo, hipófisis, glándulas adrenales, timo y

testículos. Con el objeto de eliminar la influencia de las variaciones hormonales circadianas todos los animales fueron sacrificados entre las 9:00h y las 11:00h de la mañana, alternándose el sacrificio entre animales de los diferentes grupos. El tiempo de extracción de los distintos tejidos y órganos no excedió de 3 minutos por rata.

Se realizaron dos tipos de estudios a partir de los animales constituyentes de este bloque experimental:

a) valoración de la actividad adrenocortical, para lo cual se tomaron como indicadores la concentración de corticosterona en plasma, así como los pesos de las glándulas adrenales y timo. Se midió también el peso de los testículos con el fin de comprobar si el aislamiento había afectado la función gonadal.

b) Estudio inmunohistoquímico de la ACTH hipofisaria, y de sus secretagogos hipotalámicos: CRH, AVP y OT.

Con el objeto de caracterizar el patrón de las alteraciones causadas en la actividad HHA por la deprivación social, no sólo estudiamos los efectos sobre la actividad basal del eje, sino que completamos los estudios analizando su patrón de respuesta a un estrés agudo, que constituye una situación fisiológica diferente del eje. Para ello se utilizaron las restantes 8 ratas control (C2M) y 8 ratas aisladas (A2M) de este experimento, que fueron expuestas a 15 minutos de inmovilización mediante su introducción en conos de plástico que restringían totalmente el movimiento de los animales (Orr y col., 1990). Tras los 15 min. de estrés por inmovilización, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación y posterior obtención de muestras, como en la situación basal.

2.2.2.- Valoración de la actividad adrenocortical.-

2.2.2.a.- Determinación de los niveles circulantes de corticosterona.

Tras la decapitación de cada animal, se recogió la sangre del tronco en tubos con EDTA (20µl de EDTA/ml de

sangre, concentración: 30 mg de EDTA/ml de agua destilada) mantenidos en hielo. Después de 15 minutos de centrifugación a 3000 r.p.m., se extrajo el plasma y se almacenó a -70°C hasta la realización del radioinmunoensayo de corticosterona (B) de acuerdo con el método de Gwosdow-Cohen y col. (1982), reflejado esquemáticamente a continuación:

- Extracción de los esteroides tanto del plasma como de los estándares mediante cloruro de metileno, dejando evaporar durante la noche.

- Resuspensión de la B extraída en 100 μl de tampón fosfato salino-gelatina (PBS-G) a los que se añadieron 200 μl de antisuero anti-B (dilución 1:2000), generosamente cedido por el Dr. G. Niswender (Colorado State University, CO, U.S.A.). Se dejó incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 μl de [^3H]B (actividad específica: 72 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.) a todos los tubos (15000 CPM), dejando incubar a 4°C durante toda la noche.

- Adición de 200 μl de dextranocarbono, dejando incubar la mezcla durante 10 min. en hielo. A continuación se centrifugaron los tubos a 2000 rpm durante 5 min., se tomaron 300 μl de sobrenadante y se realizó el contaje de radiactividad en un contador de centelleo.

La reactividad cruzada con otros esteroides fué menor del 1%, excepto para la deoxicorticosterona y la 11-beta-hidroxi progesterona (7%). Los coeficientes de variación intraensayo fueron menores del 5%.

2.2.2.b.- Medición de los pesos de las glándulas adrenales, timo y testículos.-

Para controlar los efectos del aislamiento social sobre el peso de las glándulas adrenales, timo y testículos, se procedió a la disección rápida de estos órganos así como a la eliminación del tejido conectivo y adiposo que los rodeaba. Inmediatamente después, se midieron sus respectivos pesos frescos.

2.2.2.c.- Análisis estadístico de los datos.-

Para la comparación de peso medio de órganos entre los grupos C2M y A2M, se utilizó el test t de Student, comprobándose previamente la distribución normal de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (como ya se ha comentado con anterioridad).

En el estudio de la concentración plasmática de corticosterona se utilizó un análisis de varianza de doble vía, previa comprobación de la normalidad de las distribuciones y de la homogeneidad de varianzas mediante el test de Cochran. Cuando el ANOVA reveló efectos significativos, se aplicó el test de Scheffé como prueba para la comparación de las medias *a posteriori*.

2.2.3.- **Estudio inmunohistoquímico de la ACTH hipofisaria, y de sus secretagogos hipotalámicos: CRH, AVP y OT.**

2.2.3.a.- Fijación y preparación de los tejidos.

Para el estudio inmunohistoquímico de los péptidos implicados en el control de la secreción adrenocortical a nivel hipotalámico e hipofisario, se utilizaron 4 animales por cada grupo experimental especificado anteriormente, los cuales fueron sacrificados por decapitación rápidamente para evitar las alteraciones que se producen en el eje HHA durante el proceso de anestesia y perfusión.

Tras una rápida extracción de la hipófisis y el encéfalo de la cavidad craneana, se obtuvo del último una pieza que contenía el hipotálamo, tomando como límite rostral para la disección el quiasma óptico y como límite caudal los cuerpos mamilares. Todo el proceso se realizó rápidamente (en menos de 3 min. desde el sacrificio del animal) y manteniendo los tejidos en hielo para evitar la degradación de los péptidos a estudiar.

Con el objeto de preservar la estructura de los tejidos así como la de los diferentes antígenos que contienen, las

hipófisis y los bloques de cerebro que contenían el hipotálamo fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M a pH 7.4 durante 24 y 72 horas, respectivamente, a 4°C. Tras la fijación de los tejidos, los bloques se crioprotegieron mediante su inmersión en sacarosa al 30% en PB 0.1 M a 4°C durante 48 horas.

A continuación se realizaron secciones coronales del tejido de 40 µm de espesor mediante la utilización de un microtomo de congelación.

2.2.3.b.- Antisueros utilizados.-

Para el estudio de los distintos péptidos estudiados en la presente tesis se utilizaron los antisueros que se describen a continuación:

TABLA I

Antisuero	desarrollado en	dilución de uso	Procedencia	referencia
α -ACTH _[1-24]	conejo	1:8000	Chemicon International Inc. (Temecula, CA, U.S.A.)	AB902
α -AVP	conejo	1:3000	Chemicon Int.	AB937
α -OT	conejo	1:3000	Chemicon Int.	AB911
α -CRH	conejo	1:3000	Dr.W.Vale, Salk Inst. (La Jolla, CA, U.S.A.)	rc70 (Swanson y col., 1983)

2.2.3.c.- Inmunodetección: método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP; Sternberger, 1979).

Tras el período de fijación y crioprotección, las secciones histológicas permanecieron durante 1 hora en H₂O₂ al 0.3% en tampón fosfato salino (PBS) para eliminar la actividad peroxidasa endógena. Después de este tratamiento las secciones se lavaron intensamente con PBS y se preincubaron en suero normal de cabra diluido al 3% durante 30 minutos para bloquear los posibles lugares de unión inespecífica de los anticuerpos.

Todos los antisueros fueron diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0.2% para permeabilizar las membranas celulares. Los lavados entre incubaciones se realizaron siempre con PBS.

Las incubaciones con los antisueros primarios (α -CRH, α -AVP, α -OT y α -ACTH₍₁₋₂₄₎) se realizaron durante toda una noche a 4°C en libre flotación y agitación continua, a las diluciones indicadas en la Tabla I. A continuación, se lavaron las secciones con PBS y se incubaron con un antisuero de cabra frente a IgG de conejo (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) diluido 1:50, durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavados los cortes, se incubaron con un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) desarrollado en conejo (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) diluido 1:1.000, durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Tras varios lavados se procedió al revelado de la reacción de la actividad peroxidasa, mediante la incubación de las secciones de los tejidos en una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) al 0.06%, a la que posteriormente (después de 10 min.) se añadió H₂O₂ al 0.003%. Una vez parada la reacción mediante el lavado abundante con PBS, se montaron las secciones sobre portaobjetos gelatinizados al 0.5%, para ser después deshidratadas y montadas con Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, U.S.A.) para su observación al microscopio.

Como controles de las inmunotinciones realizados, se llevaron a cabo dos clases de controles negativos.

a) Sustitución del antisuero primario por tampón fosfato salino (PBS).

b) Sustitución del antisuero primario por suero pre-inmune, es decir, obtenido del animal antes de ser inmunizado. En nuestro caso, se ha empleado suero normal de conejo a la dilución de uso del antisuero primario.

El análisis de los resultados inmunohistoquímicos se realizó utilizando códigos que impedían la identificación del grupo experimental al que pertenecían las preparaciones que se estaban estudiando. Además, los estudios se verificaron varias veces por distintos experimentadores, considerando que existían diferencias entre grupos experimentales sólo cuando se repitieron de forma consistente en todos los animales del mismo grupo.

2.3.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD UNITARIA EXTRACELULAR EN NUCLEOS CEREBRALES IMPLICADOS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD HHA.-

Con objeto de comprobar si el aislamiento social provocaba cambios en la actividad espontánea y/o en la excitabilidad de las neuronas de algunos centros nerviosos implicados en el control de la actividad HHA, se realizó el registro extracelular de la actividad espontánea de células del núcleo de la estría terminal (NEST), el área preóptica (APO) y el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), así como el estudio de sus respuestas provocadas por estimulación del núcleo medial de la amígdala (AMe).

2.3.1.- Animales y condiciones experimentales.-

En la realización de estos experimentos se utilizaron 24 ratas macho albinas de la cepa Sprague-Dawley, de 220-250 g de peso y 75 días de edad. Diez de ellas procedían de un grupo en el que los animales fueron destetados prematuramente a los 15 días de edad y aislados socialmente durante 2 meses (A2M). Las 14 ratas control fueron destetadas a los 21 días de edad y criados en grupos de 4 animales por jaula hasta el momento del estudio

electrofisiológico (C2M).

Todos los animales fueron mantenidos bajo las condiciones descritas de iluminación, temperatura y humedad, y alimentados con pienso compuesto y agua suministrados *ad libitum*, tal y como se ha comentado anteriormente.

2.3.2.- Metodología para el estudio electrofisiológico.-

2.3.2.a.- Preparado experimental.-

Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con uretano (1.4 g de carbamato de etilo/Kg de peso corporal, en solución acuosa al 25%) y se fijaron en un aparato estereotáxico (mod. 1204, David Kopf Instruments; Tujunga, CA, U.S.A.).

Se realizaron inyecciones periódicas del anestésico local lidocaína (al 1%) en los puntos de presión estereotáxica y en las incisiones practicadas para asegurar la analgesia. Durante el experimento se monitorizó el electrocardiograma y se mantuvo la temperatura corporal del animal a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ mediante una placa de temperatura regulable.

Los experimentos se desarrollaron en una habitación mantenida en oscuridad parcial y con un nivel de ruidos mínimo.

Tras practicar una incisión en la piel sobre la línea media del cráneo, desde unos milímetros por delante de bregma hasta algunos posterior al lambda, se desinsertaron las aponeurosis y los músculos temporales en su región más dorsal y se dejó el cráneo libre de periostio.

Los electrodos de estimulación y registro se insertaron siguiendo las coordenadas (en mm) del atlas estereotáxico de Pellegrino y col. (1979), utilizándose bregma como referencia espacial para el cálculo de las coordenadas anteroposteriores, la línea media para el cálculo de las laterales y la superficie cortical para el de las verticales.

2.3.2.b.- Método de registro de la actividad unitaria y estimulación eléctrica.-

Una vez obtenidas las coordenadas anteroposterior y lateral, se realizó una trepanación en la calota de unos 3x4mm que permitió descender los electrodos de registro para el estudio de la actividad neuronal unitaria. La duramadre se cortó y reclinó cuidadosamente hacia los lados para permitir introducir fácilmente el microelectrodo, evitando su rotura. Se utilizó la superficie cortical como referencia para el cálculo de las coordenadas verticales.

Los electrodos se situaron estereotáxicamente en el NEST (AP: 1.2-1.6, L: 1.2-1.4, V: 5.7-7.5), APO -para permitir acceder al APL y al APM- (AP: 1.4-1.8, L: 1.0-1.4, V: 7.5-9.0) o en el NPV (AP: 0.4, L: 0.3, V: 7.5-8.0), en todos los casos ipsilateralmente al lugar de estimulación (AME). Las pulsaciones cerebrales se redujeron para facilitar la obtención de registros estables mediante el recubrimiento de la zona con una película de agar.

Como electrodos de registro se utilizaron micropipetas de vidrio de 1.2 mm de diámetro interno construidas mediante un estirador de pipetas (mod. PE 2; Narishige Scientific Instruments Lab, Japón) y que, debido a su pequeño diámetro, permiten la realización de trayectos con un mínimo daño tisular. Las micropipetas se llenaron por capilaridad con el colorante Chicago sky blue al 2% en una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2M para realizar el registro y posteriormente marcar dicho sitio de registro. La resistencia de las micropipetas utilizadas fue de 20-30 MΩ.

En el interior de la micropipeta se introdujo un alambre de plata clorurada conectado con el aparataje de amplificación de la señal registrada. Como electrodo indiferente se utilizó otro alambre de plata clorurada insertado en la piel del animal.

La micropipeta se fué desplazando verticalmente en pasos de 1µm a través de los núcleos de interés mediante un micromanipulador hidráulico (mod. 640, David Kopf) hasta obtenerse un registro unitario estable.

Una vez filtrada la señal entre 1kHz-30kHz y amplificada mediante un amplificador para registro en corriente alterna (mod. P16, Grass Medical Instruments; Quincy Mass, U.S.A.), fué observada en un osciloscopio de rayos catódicos (mod. 5113, Tektronix; OR, U.S.A.) y, a la vez, conectada a un audiomonitor (mod. AM8, Grass). Los registros se almacenaron en cinta magnética mediante un grabador PCM VCR (mod. 20D; A.R. Vetter Co., Rebersburg, PA, USA) para su posterior análisis *off-line*, que además permitió tomar fotografías de la actividad neuronal de las unidades registradas y visualizadas en el osciloscopio analógico mediante una cámara Polaroid para osciloscopio (mod. C-5C, Tektronix).

Se realizó otra trepanación con una broca de 1 mm de diámetro para permitir la implantación del electrodo de estimulación en el AMe del hemisferio derecho, modificando las coordenadas del atlas para su disposición oblicua (20° respecto a la superficie de la calota) en el plano parasagital correspondiente (A: -3.8, L: 3.2, V: 9.4). La estimulación eléctrica se realizó a través de un electrodo bipolar concéntrico de acero inoxidable (mod. SNEX 100, Rhodes Medical Instruments; Woodland Hills, CA, USA), de 0.1 mm de diámetro interno y 0.25 de diámetro externo, sobresaliendo el interno 0.75 mm. Los dos componentes estaban aislados totalmente excepto 0.25mm en su extremo final.

La estimulación eléctrica del AMe se realizó mediante un estimulador Grass S88 a través de una unidad fotoeléctrica de aislamiento del estímulo (mod. PSIU6, Grass) que generó pulsos de corriente de intensidad proporcional a los voltajes seleccionados en el estimulador. La estimulación eléctrica se realizó suministrando pares de pulsos rectangulares bipolares de corriente de 0.5 ms de duración con un máximo de intensidad de corriente de 1 mA pico a pico, a una frecuencia de 0.2 y 0.5 Hz.

2.3.2.c.- Selección y análisis de los resultados.-

Para el aislamiento de las unidades nos basamos en criterios estándar de registro extracelular como son la estabilidad y la amplitud de la señal (que debe ser,

como mínimo, el doble del ruido de base). Una vez aislada una unidad en el NEST, APO o NPV, se monitorizó su actividad espontánea durante varios minutos y a continuación se estudió su respuesta a la estimulación eléctrica de la AMe mediante el registro de la actividad eléctrica en el osciloscopio.

Las células registradas se clasificaron de acuerdo con su tipo de respuesta a la estimulación del AMe:

a) Respuesta ortodrómica:

a.1.- Activación ortodrómica (OD+): la estimulación del AMe provocaba un incremento de descarga de potenciales de acción.

a.2.- Inhibición ortodrómica (OD-): la frecuencia de descarga de la célula fué anulada o reducida tras la estimulación del AMe.

b) Respuesta antidrómica.

c) No hubo respuesta (NR).

El análisis de los resultados fué realizado a partir de los registros de la actividad unitaria almacenados en cinta magnética, directamente o con la ayuda de un osciloscopio digital programable (mod. VC-6023, Hitachi Denshi, Ltd; Londres, U.K.), para realizar las distintas medidas: frecuencia de descarga espontánea de la unidad aislada, respuesta a la estimulación de la AMe, así como la latencia y duración de dicha respuesta.

El análisis estadístico de las frecuencias de descarga espontánea, latencia y duración de la respuesta, así como de la profundidad a la que se localizaban las unidades aisladas en cada núcleo estudiado, se realizó mediante el test t de Student. Cuando los requerimientos de normalidad no fueron satisfechos, se llevó cabo dicho análisis mediante el test U de Mann-Whitney.

Por otra parte, se utilizó la prueba χ^2 para el análisis estadístico de las frecuencias de cada tipo de respuesta provocada en los núcleos estudiados por la estimulación del AMe.

2.3.2.d.- Estudio histológico de control.-

A través de la micropipeta de registro se pasó una corriente continua negativa de 10 μ A de intensidad durante 5 minutos mediante un estimulador Grass S4K para marcar con el colorante Chicago sky blue el lugar final de registro, modificación del método de Thomas y Wilson (1965).

A continuación, los animales fueron perfundidos transcardialmente con una solución de NaCl al 0.9%, seguida de una solución fijadora (formaldehído al 10%, en tampón fosfato 0,1M de pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se postfijaron en formaldehído al 10% a 4°C durante 4 horas, tras lo cual se crioprotejieron manteniéndolos en sacarosa al 30% a 4°C durante 24 horas. A continuación, fueron congelados y se realizaron secciones transversales de los mismos a 40 μ m mediante el uso de un criostato (Reichert HistStat).

La localización de los electrodos de registro y de estimulación se verificó mediante microscopía óptica, tras el montaje de los cortes de tejido de manera seriada sobre portaobjetos previamente cubiertos de gelatina, y su tinción siguiendo el método de Nissl modificado por Fletcher (1947).

2.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DEL CAMPO DENDRÍTICO EN NEURONAS DEL AREA PREEPTICA.-

2.4.1.- Animales de experimentación.-

En este estudio se utilizaron un total de 16 ratas macho Wistar: 8 animales criados en aislamiento social (A2M) y los otros 8 animales pertenecientes al grupo control (C2M), según la representación esquemática expuesta previamente en la Figura 2.1.

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente trabajo, escogimos el APO para este estudio cuantitativo del campo dendrítico basándonos en los resultados obtenidos en el experimento de electrofisiología, y teniendo en cuenta que se

trata de una zona de integración de información implicada en la regulación de la actividad HHA, que presenta conexiones definidas con la amígdala y el NPV (ver Introducción).

2.4.2.- Perfusion y método histológico.-

Los animales fueron anestesiados mediante vapores de éter etílico especial para anestesia (Panreac, Barcelona), bajo los efectos de la cual se procedió a la perfusión transcardial con una solución salina isotónica (NaCl al 0.9%), seguida de una solución fijadora (formaldehído al 10% neutralizado a pH 7.2 con tampón fosfato). Una vez perfundidos los animales, se extrajo el encéfalo de la cavidad craneana y se obtuvo del mismo una pieza que contenía el APO, para lo cual se realizó la disección rostralmente al quiasma óptico y se tomó como límite caudal la parte anterior de los cuerpos mamilares. A continuación, estas piezas se postfijaron por inmersión durante 48 horas en formaldehído al 10% tamponado a pH 7.2.

La tinción de los tejidos se realizó de acuerdo con el método rápido de Golgi, basándonos en el proceder descrito por Cajal y Castro (1972). Esquemáticamente, implica los siguientes pasos:

- Tras la postfijación de la pieza se llevó a cabo su inmersión en una disolución de osmio-dicromato potásico (1 gr. de tetróxido de osmio y 12 gr. de dicromato potásico en 500 cc de agua destilada) durante 3 días.

- Inmersión en una solución acuosa de nitrato de plata al 0.75% durante 24 horas, tras un breve lavado de la pieza en dicha solución.

- Deshidratación del bloque de tejido en alcohol absoluto durante 15 minutos.

- Encastrado de la pieza en una mezcla de parafina (de 56°C de punto de fusión)-vaselina (2:1) para realizar cortes transversales mediante un microtomo de deslizamiento. Con el fin de visualizar los campos dendríticos neuronales lo más

completos posible, las secciones del tejido se realizaron a 200 μm de grosor.

- Inmersión de los cortes durante 15 min. en baños de alcohol absoluto, terpineol y xilol, sucesivamente.

- Montaje en Permount, sin hacer uso de cubreobjetos.

2.4.3. Obtención de las muestras y procesamiento de los datos.-

El estudio se centró en las dos zonas del área preóptica cuyo interés ha sido ya previamente comentado. Dentro de ellas, se plantearon dos tipos de estudio:

- Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas en dendritas orientadas de neuronas del área preóptica medial estrial (APM-ST).

- Estudio cuantitativo del campo dendrítico en neuronas bien establecidas y caracterizadas del área preóptica lateral (APL).

2.4.3.a.- Estudio en el área preóptica medial estrial (APM-ST).-

- Delimitación de la población neuronal estudiada.-

La parte del área preóptica atravesada por la estría terminal, designada como "parte estrial dorsal del área preóptica" (APM-ST) por Raisman y Field (1973), engloba un área triangular pobre en neuronas, justo debajo de la comisura anterior (CA), de 0.5-1.0 mm de distancia de la parte más rostral del tercer ventrículo, como se muestra esquemáticamente a continuación:

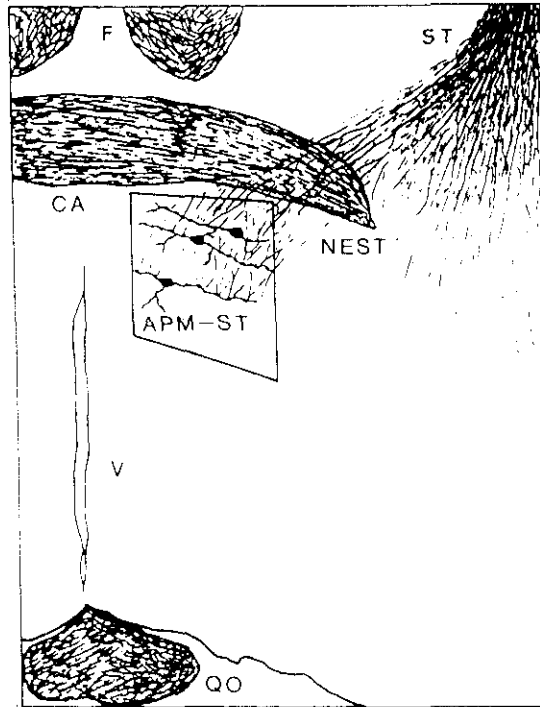


Figura 2.2.- Localización anatómica del área preóptica medial estriada (APM-ST). Abreviaturas: CA, comisura anterior; F, fornix; NEST, núcleo de la estria terminal; QO, quiasma óptico; ST, estria terminal; V, tercer ventrículo.

Las preparaciones utilizadas para el presente estudio correspondían a la zona rostral del APM-ST, incluyendo sólo hasta el nivel de cruce de las fibras de la comisura anterior, y caudalmente hasta el nivel en que las fibras de la estria terminal ya no establecían contacto con la comisura anterior (aproximadamente 400 μm de longitud en sentido rostro-caudal).

Las células del APM-ST, de tamaño pequeño o mediano, tienen dendritas varicosas con pocas espinas, orientadas en el plano horizontal en dirección lateral y medial de modo que intersectan en ángulo recto dichos axones estriales.

Estas dendritas, fácilmente identificables, constituyeron nuestra población de estudio.

- Cuantificación y comparación estadística de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del APM-ST.-

Dentro del APM-ST se estudiaron, por grupo experimental, 34 dendritas orientadas perpendicularmente a los axones de la stria terminalis, pertenecientes al tipo neuronal mayoritario de la población celular de este área. En ellas se cuantificó la densidad de espinas dendríticas, mediante contaje directo en un microscopio óptico Zeiss Standard 14, dotado de un micrómetro de ocular. Posteriormente se obtuvo el cociente: número de espinas/mm de dendrita, una vez medida la longitud de ésta. Hay que hacer notar que debido al curso rectilíneo de estas dendritas orientadas, normalmente no hacía falta variar el enfoque para su estudio, pudiendo obtenerse su longitud mediante su medida directa. No obstante, fueron dibujadas mediante cámara clara para ser posteriormente medidas con un curvómetro Ushikata X-PLAN 360d.

No se pudieron estudiar otros parámetros representativos del campo dendrítico de estas neuronas debido a las características de las mismas, con muy escasa ramificación dendrítica.

La comparación estadística de las medias de los datos obtenidos se realizó mediante el test t de Student.

2.4.3.b.- Estudio en el área preóptica lateral (APL).-

- Delimitación anatómica del tipo neuronal estudiado.-

Una vez localizada el área a estudiar, de acuerdo con los criterios anatómicos previamente descritos en la Introducción (Gurdjian, 1927; Ban, 1966; Bleier y col., 1979; Bleier y Byne, 1985), llevamos a cabo un estudio preliminar sobre neuronas completas del APL en las preparaciones de Golgi para delimitar descriptivamente los tipos neuronales existentes, con objeto de encontrar un tipo neuronal que reuniera las condiciones necesarias para un estudio

estadístico.

De este modo, se localizó una población neuronal homogénea y fácilmente diferenciable de las demás que se situaba rostralmente en el APL y cuyas variables numéricas presentaban poca variabilidad, siendo adecuada, por lo tanto, para el análisis cuantitativo. Además, estas neuronas (que hemos denominado "multipolares rostrales") no presentaban variaciones apreciables de campo dendrítico dependiendo de su localización dorso-ventral o medio-lateral. La zona que ocupan, por otra parte, está bastante definida y situada próxima a la estría terminal.

La descripción detallada de dicho tipo neuronal es objeto de un apartado de los Resultados, por el interés que presenta desde el punto de vista descriptivo.

- Estudio cuantitativo del campo dendrítico de las neuronas multipolares rostrales del APL.

a) Cociente: número de espinas/mm de tronco dendrítico.

Se estudió el número de espinas dendríticas por milímetro a lo largo de los troncos dendríticos de las neuronas multipolares rostrales constituyentes de las muestras (aproximadamente 30 por grupo). El conteo de espinas se realizó de acuerdo con el mismo método explicado en las neuronas del APM-ST y la longitud de los troncos dendríticos, fué obtenida haciendo uso del sistema computerizado que se explicará a continuación y que hemos utilizado a lo largo de este estudio.

b) Cuantificación del campo dendrítico.-

La cuantificación de parámetros dendríticos en el tipo neuronal estudiado, se ha llevado a cabo utilizando un sistema computerizado de análisis métrico y topológico denominado sistema TEAD (Tratamiento de Estructuras en Arbol Dicotómico) (Abella y col., 1985). Este sistema fué

desarrollado por nuestro equipo de trabajo en colaboración con el Depto. de Investigación y Desarrollo de la Compañía Telefónica y se basa en el tratamiento de la neurona como un grafo en árbol dicotómico tridimensional. Los datos que se suministraban al ordenador tienen su origen en los dibujos de cada una de las neuronas estudiadas, realizados mediante una cámara clara acoplada a un microscopio óptico Zeiss Standard 14, trabajando a 480 aumentos. La información suministrada, que permitía al sistema representar gráficamente cada neurona, consistió en la medición de las coordenadas x,y,z de los puntos más representativos de la arborización dendrítica, tales como el centro del soma neuronal, los puntos de bifurcación, puntos terminales y puntos de inflexión, tomando el soma como origen de coordenadas (Figura 2.3.a). Las coordenadas x e y se midieron mediante una tableta gráfica acoplada al ordenador, sobre la que se superponía el dibujo bidimensional de la neurona.

La coordenada z fué contabilizada con ayuda de un comparador digital de profundidades Carl Mahr (mod. Millitast 1070) acoplado a la platina del microscopio. Estas coordenadas se suministraron al ordenador como fuente primaria de datos. El criterio utilizado por el sistema TEAD para la captación y procesamiento de los árboles dendríticos fué el centrífugo, es decir, los puntos representativos y las ramas que los unen se construyen en orden creciente a partir del centro del cuerpo neuronal, considerado como origen de coordenadas (0,0,0).

Por otra parte, el orden de rama consistía en un número que se asignaba a cada segmento dendrítico comprendido entre dos bifurcaciones, en orden numérico creciente desde el soma hasta los puntos terminales de la arborización (Figura 2.3.a). Este criterio ha sido considerado como el más adecuado cuando se pretende estudiar secuencias de ramificación en el desarrollo así como para cuantificar la complejidad de una estructura en arborización compleja (Berry y col., 1975; Uylings y col., 1975).

Del total de células dibujadas, se seleccionaron para su estudio cuantitativo aquéllas con el campo dendrítico bien delimitado y que no fué dañado por el corte, resultando una muestra de 30 neuronas por grupo experimental.

En base a estos datos, el sistema calcula y analiza toda una serie de parámetros definitorios del campo dendrítico neuronal, entre las que se encuentran las utilizadas en este estudio:

a) variables métricas:

- longitud de arborización dendrítica total
- longitud por tronco dendrítico
- longitud terminal-soma

b) frecuencia de los distintos órdenes de rama.

c) densidad dendrítica en torno al soma, basado en la técnica de análisis de Sholl (1953). Consiste en la cuantificación de los puntos de intersección de las dendritas de una neurona con esferas imaginarias generadas por el sistema y trazadas concéntricamente a partir del soma neuronal a determinadas distancias radiales del mismo (en nuestro estudio, cada 20 μm) hasta el extremo terminal de la arborización dendrítica (Figura 2.3.b). En nuestro caso se estudió el número de intersecciones por neurona, en un campo dendrítico de 180 μm alrededor del soma, distancia ésta en la cual todas las neuronas estudiadas eran bien visualizables.

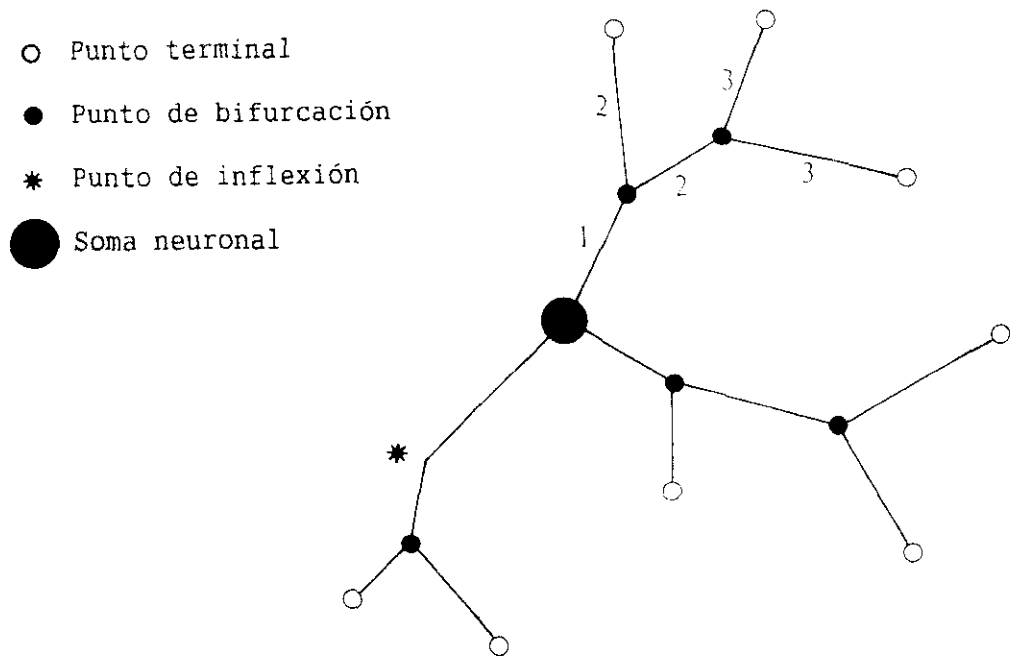


Figura 2.3.a.- Representación esquemática de una neurona que muestra el criterio de ordenación centrífuga utilizado por el sistema de análisis computerizado. Los números indican los distintos órdenes de rama.

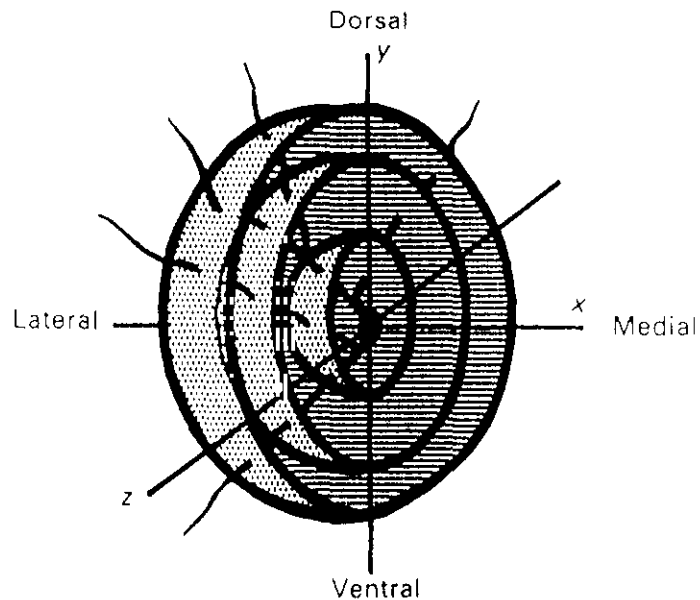


Figura 2.3.b.- Representación esquemática del método utilizado para calcular la densidad dendrítica alrededor del soma. Esta se obtiene a partir de las intersecciones entre las ramas dendríticas y esferas imaginarias creadas por el ordenador. El centro de las esferas es el soma neuronal. El radio se incrementaba mediante un valor constante (20 μm).

2.4.4. Tratamiento estadístico de los datos.-

El análisis estadístico de los datos se ha realizado mediante distintos tests, según las variables que se querían comparar entre el grupo C2M y A2M:

- para la comparación estadística de medias, como es el caso de longitudes y número de espinas dendríticas/mm de tronco dendrítico, se utilizó el test t de Student.

- las comparaciones de las distribuciones de frecuencias de los distintos órdenes de rama se realizaron mediante la prueba χ^2 .

- en el estudio de la densidad dendrítica en torno al soma neuronal se utilizó un análisis de varianza de doble vía, previa comprobación de la normalidad de los datos y homogeneidad de las varianzas. La comparación de las medias *a posteriori* se realizó por medio del test de Scheffé.

3. RESULTADOS

3.1.- OBSERVACIONES GENERALES.-

En lo referente a rasgos comportamentales, los animales aislados presentaban, en general, síntomas evidentes de nerviosismo y mayor tendencia a morder cuando eran manipulados por el experimentador. Igualmente, y de un modo cualitativo, mostraron menos latencia de exploración y más actividad que los controles cuando se las sometió a la novedad del ambiente que supone la jaula de pesaje.

Por otra parte, aunque el estado aparente de los animales aislados era, en la mayor parte de los casos, similar al de los animales control, durante el período de tiempo cercano a los dos meses de aislamiento algunos animales presentaban ulceraciones en los ojos, morro y parte posterior de las orejas, el pelo hirsuto (con calvas y manchas en algunas ocasiones), e incluso se observaron algunos síntomas de parasitosis externas, acompañados de una apariencia enfermiza de los animales.

A continuación vamos a exponer los resultados relativos a las variables estudiadas en relación con el desarrollo somático de los animales, como son el peso corporal, la ingesta y el consumo de agua.

3.1.1.- **Peso corporal.-**

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que el peso corporal de los animales control y aislados socialmente -medido a los 73 días de edad- no era estadísticamente diferente ($t_{(30)}=0.46$, n.s.; Tabla II).

TABLA II

Peso corporal de los animales control (C2M) y aislados socialmente (A2M).

GRUPOS	PESO CORPORAL (gr)
C2M (n=16)	314.44±11.64
A2M (n=16)	321.31±9.52
$t_{(30)}=0.46, n.s.$	

Los datos representan la media ± error estándar de la media (E.E.M.).

n: número de animales.

Análisis estadístico de los datos mediante el test t de Student.

3.1.2.- Ingesta y consumo diario de agua.-

Como se indica en la Tabla III, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el mantenido en aislamiento en lo referente a la ingesta de alimento ($t_{(18)}=2.24, n.s.$), y al consumo de agua ($t_{(18)}=1.16, n.s.$) de los animales durante el período de 10 días previo al sacrificio de los animales. La variable utilizada en este caso es el consumo medio diario por animal, tal y como se especificaba en el correspondiente apartado de Material y Métodos.

TABLA III

Consumo diario de comida y de agua (gr) por animal, en los grupos control (C2M) y aislado socialmente (A2M).

	INGESTA	CONSUMO AGUA
C2M (n=4)	20.04±0.13	35.51±3.75
A2M (n=16)	19.12±0.39	40.72±3.20
	$t_{(18)}=2.24, n.s.$	$t_{(18)}=1.16, n.s.$

Media±E.E.M.

n: número de datos utilizados.

Test t de Student.

De acuerdo con el planteamiento y los objetivos expresados en la Introducción y siguiendo la metodología expuesta en el apartado correspondiente, pasamos a exponer a continuación los resultados de los bloques experimentales previamente esquematizados en la Figura 2.1 de Material y Métodos:

3.2.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE LA ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL.-

3.2.1.- Concentración de corticosterona en plasma.-

Se pretendía estudiar si el aislamiento social prematuro y prolongado afectaba de alguna manera la actividad adreno-cortical basal así como la respuesta al estrés agudo por exposición de los animales a 15 min. de inmovilización.

Para ello, se procedió a la determinación de los niveles

plasmáticos de corticosterona (B) en las dos situaciones fisiológicas, de acuerdo con lo explicado en el apartado de Material y Métodos.

En la Figura 3.1 y Tabla IV aparecen representadas las concentraciones plasmáticas medias del glucocorticoide en los grupos experimentales estudiados. Tras el análisis de varianza de doble vía se comprobó la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales ($F_{(2,28)}=92.70$, $p<0.0001$), tanto respecto al factor agrupamiento (control-aislamiento: $F_{(1,28)}=59.918$, $p<0.0001$) como respecto al factor situación fisiológica (basal-estrés: $F_{(1,28)}=125.479$, $p<0.0001$).

Una vez realizada la comparación de las medias *a posteriori* mediante el test de Scheffé, encontramos que tras exponer a los animales a 15 min. de inmovilización se produjo un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de B tanto en el grupo control ($S=7.50$, $p<0.001$), como en el grupo criado en aislamiento ($S=8.34$, $p<0.001$) respecto a sus respectivos grupos basales.

En relación con los efectos que produjo el aislamiento social sobre los niveles plasmáticos de B, la comparación *post hoc* de las medias de los grupos indicó que los animales aislados presentaban unas concentraciones plasmáticas de la hormona significativamente menores que las de los animales criados socialmente, tanto en situación basal ($S=5.89$, $p<0.001$) como en respuesta al estrés por inmovilización ($S=5.05$, $p<0.001$).

CORTICOSTERONA EN P. ASMA

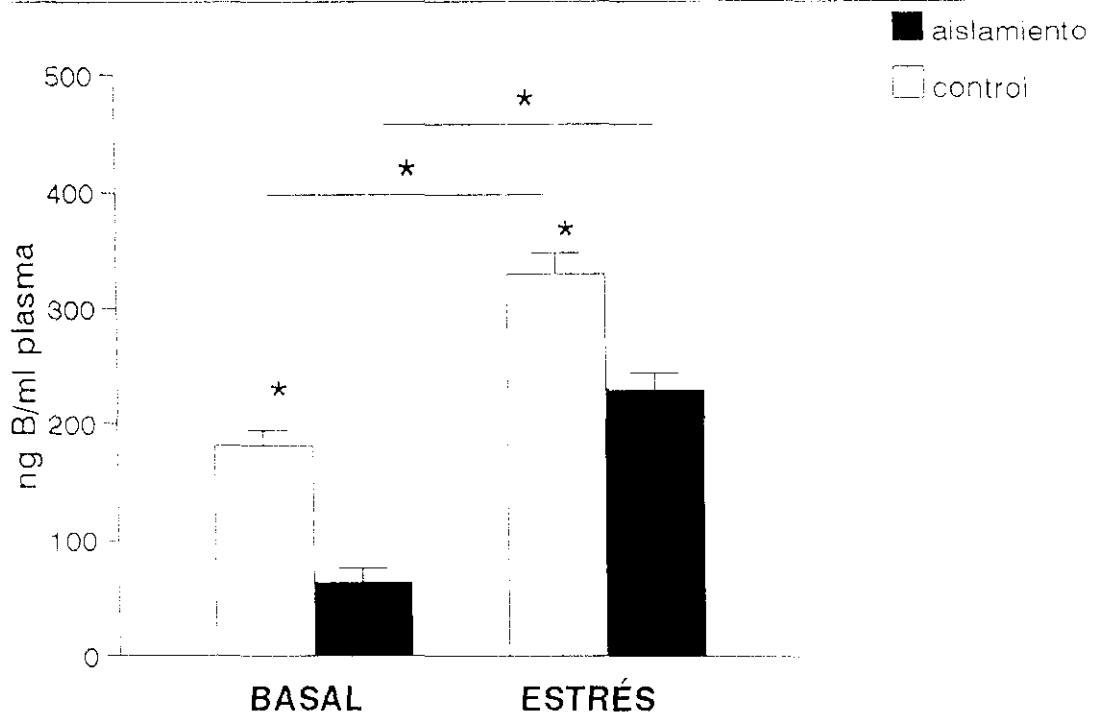


TABLA III
ng B/ml plasma (Media±E.E.M.)

	BASAL	15' ESTRÉS INMOV.
C2M	180.82±13.11	329.25±18.32
A2M	64.21±12.32	229.25±15.26

Figura 3.1.-Concentración plasmática de B (media±E.E.M.) en animales control (C2M) y aislados (A2M), tanto en situación basal como en respuesta a 15' de estrés agudo por inmovilización.

Análisis estadístico de los datos mediante ANOVA de doble vía y el test de Scheffé como prueba post-hoc (* $p < 0.001$). Valores de F y S en el texto. n=8 animales por grupo experimental.

3.2.2.- Peso de glándulas adrenales, timo y testículos.-

Además del estudio de los efectos del modelo de aislamiento utilizado sobre los niveles circulantes de corticosterona, hemos analizado los pesos relativos de órganos que se utilizan también como indicadores de la actividad adrenocortical: timo y glándulas adrenales, junto con el peso relativo de los testículos como índice de posibles alteraciones en la función gonadal.

Como se aprecia en la Tabla V, el aislamiento produjo un incremento estadísticamente significativo en el peso relativo del timo, en comparación con el grupo control ($t_{(13)}=2.43$, $p<0.05$), mientras que no produjo alteraciones significativas en el peso de los demás órganos estudiados. Los pesos de los órganos se muestran en mg/100 gr de peso corporal con el fin de evitar las variaciones que pueden presentarse entre animales de peso corporal diferente.

TABLA IV

Peso relativo de timo, glándulas adrenales y testículos (mg/100 gr. de peso corporal) en ratas macho controles y aisladas socialmente.

	TIMO	ADRENALES	TESTÍCULOS
C2M	190.00±12.37	10.69±0.98	452.80±32.84
A2M	247.94±20.92#	9.86±0.59	472.54±23.40
	$t_{(13)}=2.43$ $p<0.05$	$t_{(14)}=0,78$ n.s.	$t_{(14)}=0,52$ n.s.

(Media±E.E.M.).

Análisis de los datos mediante el test t de Student.

n.s.: diferencias estadísticamente no significativas.

n=8 animales por grupo, excepto en # (n=7).

3.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA ACTH HIPOFISARIA Y DE SUS SECRETAGOGOS HIPOTALÁMICOS: CRH, AVP Y OT.-

Siguiendo el planteamiento experimental resumido en la Figura 2.1 del apartado de Material y Métodos, a continuación centramos nuestra atención en el estudio de las alteraciones provocadas por el aislamiento social en la funcionalidad del complejo hipotálamo-hipofisario que controla la actividad adrenocortical. Para ello realizamos el estudio inmunohistoquímico de la hormona corticotropa (ACTH) a nivel hipofisario y de sus secretagogos hipotalámicos: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la vasopresina (AVP) y la oxitocina (OT), a nivel del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y de la eminencia media (EM), todos ellos péptidos implicados en el control de la secreción adrenocortical. El estudio inmunohistoquímico se realizó tanto en situación basal, como en respuesta a 15 minutos de estrés por inmovilización.

3.3.1.- Inmunomarcaje de la ACTH.-

Tras el revelado de la inmunoreacción para la hormona corticotropa se apreciaron células inmunorreactivas en la *pars distalis*, pero no en la *pars intermedia* de la adenohipófisis. Las células inmunopositivas para ACTH presentaban cierta heterogeneidad tanto en tamaño y morfología como en la distribución citoplasmática del producto de reacción, dependiendo fundamentalmente del estado fisiológico en el que se encontraban los corticotropos hipofisarios:

* En situación BASAL, la mayoría de células inmunorreactivas para la ACTH presentaban una morfología estrellada, con gránulos inmunopositivos localizados en la periferia del citoplasma (detalle de las Figs. 3.2A y C), aunque también se encontraron algunas células de morfología poliédrica. Las células ACTH-positivas se distribuían formando grupos dispersos en varias áreas glandulares, aunque también podían aparecer solitarias.

No se apreciaron diferencias entre las adenohipófisis de ratas control y de ratas deprivadas socialmente (Figs 3.2A y C).

* Tras 15 min. de ESTRÉS por inmovilización se observó un incremento de células inmunorreactivas para la corticotropina en el lóbulo anterior de la hipófisis tanto de ratas control como de ratas aisladas (Figs 3.2B y D). En ambos grupos experimentales se produjo un incremento de la intensidad y extensión del área celular inmunorreactiva de los corticotropos hipofisarios (detalle de las Figs 3.2B y D). Sin embargo, el aumento de células inmunopositivas que se produjo tras el estrés resultó ser menor en el caso de los animales aislados socialmente, como se aprecia al comparar la Figura 3.2D con la 3.2B.

3.3.2.- Inmunomarcaje de la CRH.-

a) Núcleo paraventricular hipotalámico:

Como se aprecia en la Figura 3.3, se localizaron pequeños somas neuronales débilmente inmunorreactivos para la CRH, agrupados mayoritariamente en la división parvocelular medial dorsal del NPV, según el criterio citoarquitectónico de Sawchenko y Swanson (1983), aunque aparecía alguna célula dispersa en la región magnocelular del núcleo.

Las células presentaban un pericarion pequeño de aproximadamente 15 μm de diámetro, de forma oval o piriforme. El producto de la reacción inmunohistoquímica se localizaba en el citoplasma, rodeando al núcleo de la célula, aunque en algunos casos se apreciaba también en las prolongaciones neuronales (detalle de la Fig. 3.3).

Como se observa en dicha figura, no se apreciaron diferencias en relación con el patrón de inmunotinción para la CRH en el NPV entre las distintas situaciones experimentales estudiadas.

b) Eminencia media:

Observamos abundantes fibras inmunorreactivas para la CRH en la zona externa de la eminencia media (ZEEM), en su mayoría orientadas de forma perpendicular a la superficie de la eminencia media (Fig. 3.4).

En esta región, el aislamiento social (Figs 3.4C y D) provocó un marcado aumento de la expresión de inmunorreactividad para la CRH en las fibras nerviosas localizadas en EM, en comparación con las ratas control (Figs 3.4A y B), tanto en situación basal como tras estrés por inmovilización. Las fibras inmunopositivas para la CRH presentaban una mayor extensión en la eminencia media y una mayor intensidad de marcaje en las regiones laterales de la misma en los animales aislados respecto a los controles.

Tras la situación estresante pudo observarse una ligera disminución en la intensidad de marcaje para la CRH en los animales control (Fig. 3.4B), aunque no se consideró significativa al no apreciarse en todos los animales estudiados.

3.3.3.- Inmunomarcaje de la AVP y la OT.-

a) Núcleo paraventricular hipotalámico.-

Los cuerpos inmunorreactivos para la AVP y la OT correspondían a neuronas de somas grandes (20-35 μm de diámetro), de forma oval o piriforme, localizadas en las regiones magnocelulares del NPV (Fig. 3.5 y 3.6). Alguna célula de menor tamaño (aproximadamente 15 μm de diámetro) aparece marcada para la AVP o la OT en regiones parvocelulares mediales del mismo núcleo.

En la Figura 3.5 se observa cómo las neuronas vasopresinérgicas tienden a agruparse dorsolateralmente en el NPV, constituyendo su división magnocelular posterior lateral. En cambio, las células oxitocinérgicas se disponen ventrolateralmente y alrededor de las anteriores (Fig. 3.6), correspondiendo a la división magnocelular posterior ventral del NPV según el criterio citoarquitectónico que venimos utilizando (Sawchenko y Swanson, 1983).

En las células vasopresinérgicas y oxitocinérgicas el producto de la inmunorreacción se localizaba en el citoplasma, rodeando al núcleo de la célula y dándole a ésta un aspecto granuloso (Fig. 3.9A y C, respectivamente). Igualmente, se apreciaba inmunorreactividad en las prolongaciones neuronales, algunas de las cuales presentaban un aspecto

varicoso (Fig. 3.9 A y C).

Ni el aislamiento ni el estrés por inmovilización afectaron de forma evidente la distribución e intensidad de la inmunorreacción para la AVP y la OT en las neuronas del NPV, como puede apreciarse en las Figuras 3.5 y 3.6.

b) Eminencia media.-

Las fibras vasopresinérgicas y oxitocinérgicas se localizaban mayoritariamente en la capa fibrilar de la zona interna de la EM (ZIEM, Figs 3.7 y 3.8, respectivamente). Sin embargo, se observaron algunas fibras varicosas inmunorreactivas para AVP y OT, con grandes dilataciones, próximas a capilares portales en las capas reticular y empalizada de la ZEEM (Fig. 3.9B y D, respectivamente).

No se observaron diferencias apreciables entre los distintos grupos experimentales en cuanto al contenido de fibras inmunorreactivas para AVP y OT en la eminencia media, ni a nivel de la zona interna, ni a nivel de la zona externa (Figs 3.7 y 3.8). Tampoco se apreciaron diferencias entre los grupos estudiados en relación con el inmunomarcaje para la AVP y la OT a nivel de la neurohipófisis (datos no mostrados).

Figura 3.2.- Microfotografías a nivel de la adenohipófisis en las que se observan células inmunorreactivas para la corticotropina (ACTH) siguiendo la técnica de la PAP. (A) animal control C2M, situación basal; (B) animal C2M sometido a estrés por inmovilización durante 15 minutos; (C) animal aislado (A2M), situación basal; (D) animal A2M sometido a estrés por inmovilización durante 15 minutos.

En cada figura se muestran detalles de células corticotropas a mayor aumento. Obsérvese cómo el producto de la inmunoreacción se depositó periféricamente en el citoplasma en situación basal (detalle de Figs 3.2A y C), mientras que tras 15 min. de estrés se incrementó el área del citoplasma inmunorreactivo así como la intensidad de la inmunoreacción (detalle de Figs 3.2B y D). La inmovilización provocó, además, un aumento de células inmunorreactivas para la ACTH, siendo este incremento menor en el grupo A2M (Fig. 3.2D) que en el C2M (Fig. 3.2B).

Barras de calibrado: panorámica 100 μ m, detalle 10 μ m.

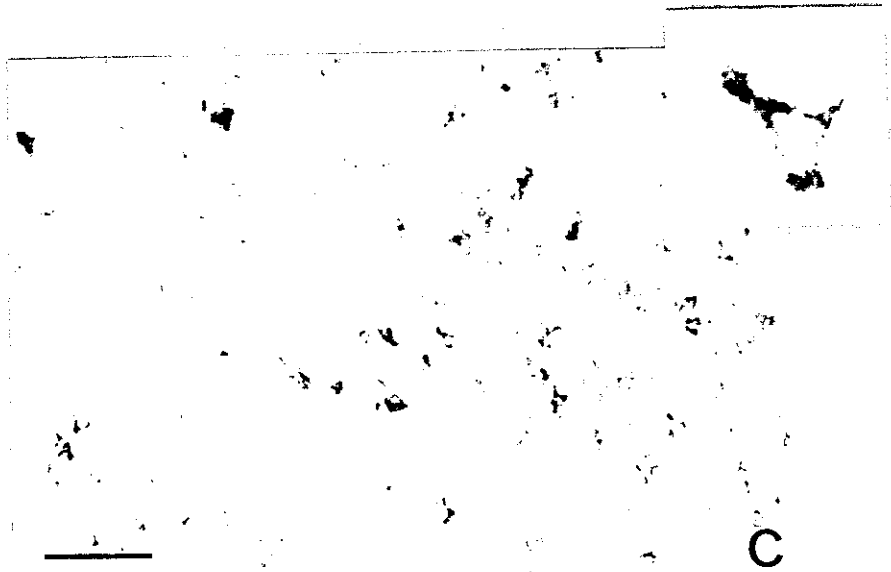
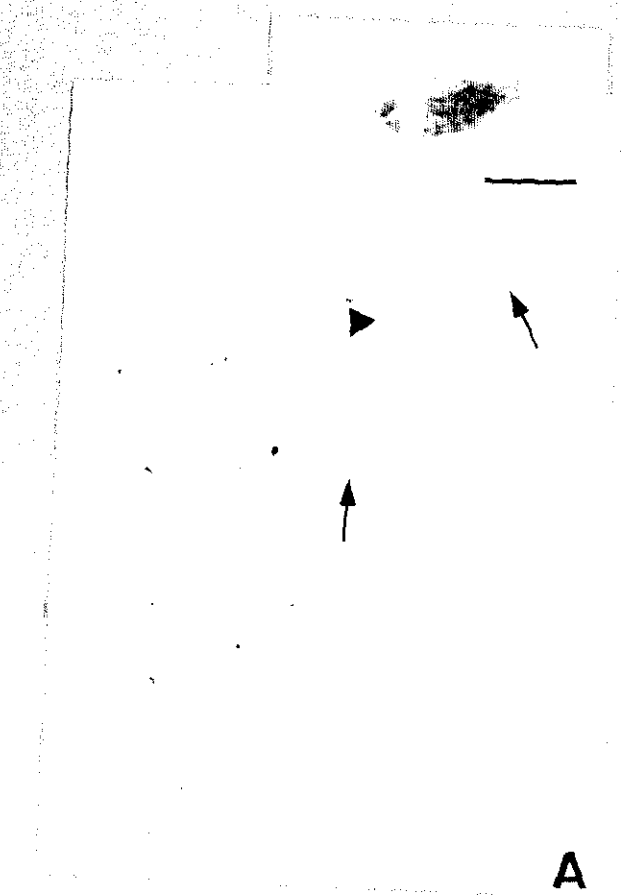


Figura 3.3.- Cortes coronales a nivel del NPV, donde se aprecian neuronas inmunorreactivas para la hormona liberadora de ACTH (CRH, flechas), siguiendo la técnica de la PAP. (A) animal control (C2M), situación basal; (B) animal C2M sometido a estrés por inmovilización durante 15 minutos; (C) animal aislado (A2M), situación basal. (D) animal A2M sometido a estrés por inmovilización.

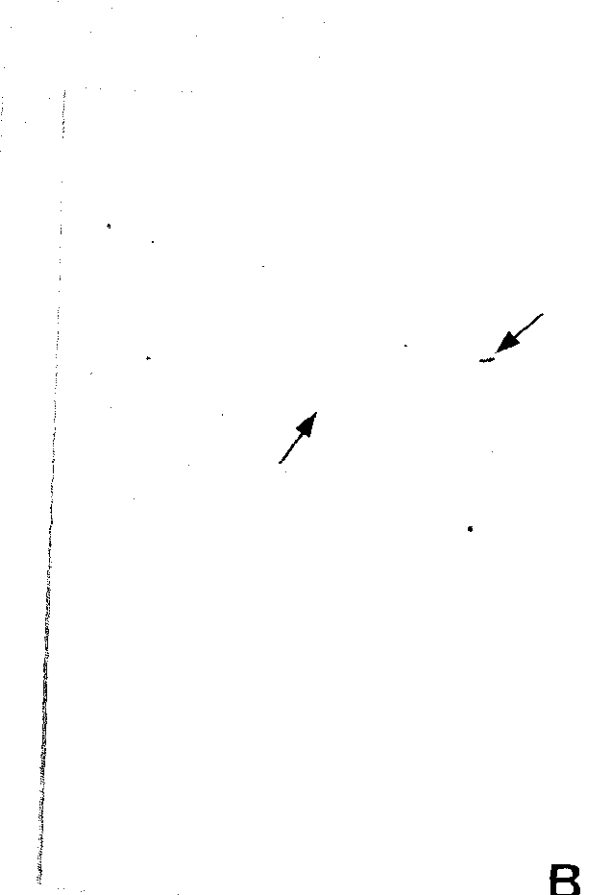
En el detalle se muestra, a más aumentos, una neurona inmunopositiva para CRH, indicada en la Figura 3.3A mediante una punta de flecha.

No se aprecian diferencias evidentes entre los distintos grupos experimentales.

IIIIV: tercer ventrículo. Barras de calibrado: panorámica 100 μ m, detalle 10 μ m.



A



B

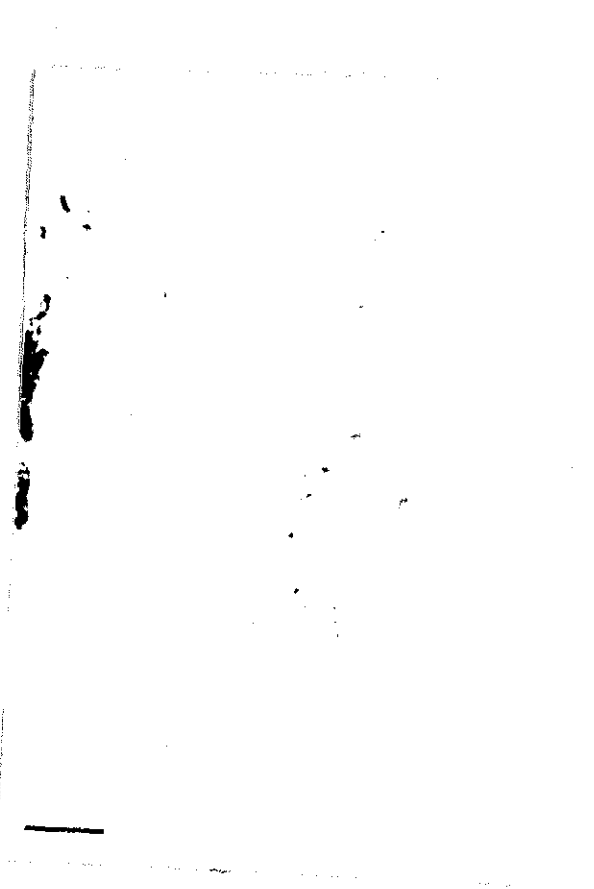
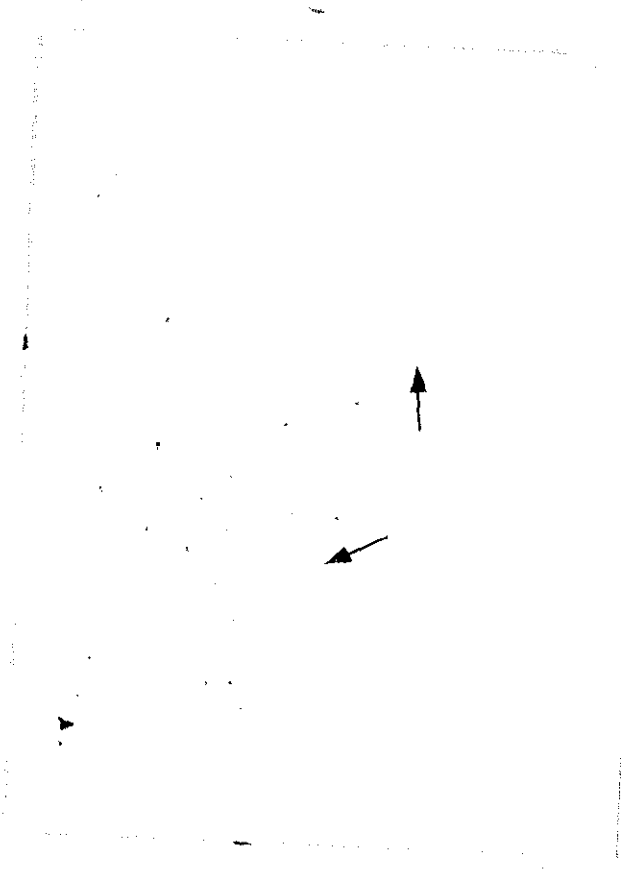


Figura 3.4.- Microfotografías de cortes transversales a nivel de la EM mostrando fibras inmunorreactivas para CRH, principalmente en su zona externa. (A) C2M, situación basal; (B) C2M, estrés; (C) A2M, situación basal; (D) A2M, estrés.

Obsérvese el incremento de marcaje para la CRH en los animales del grupo A2M. Las flechas indican áreas de intensa inmunorreactividad en las regiones laterales de la zona externa de la EM.

IIIIV: tercer ventrículo. Barra de calibrado: 100 μ m.

IIIV



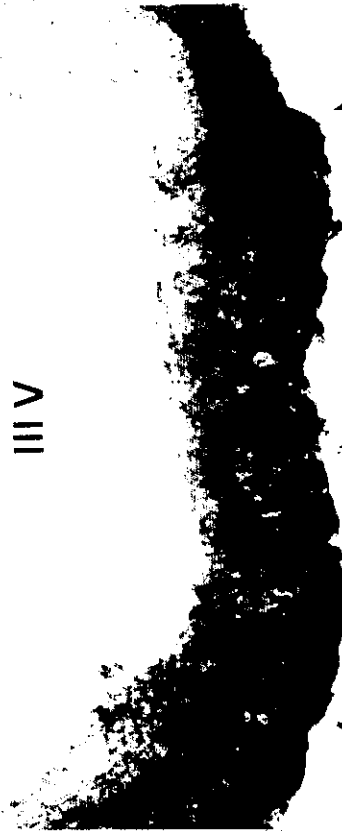
A

IIIV



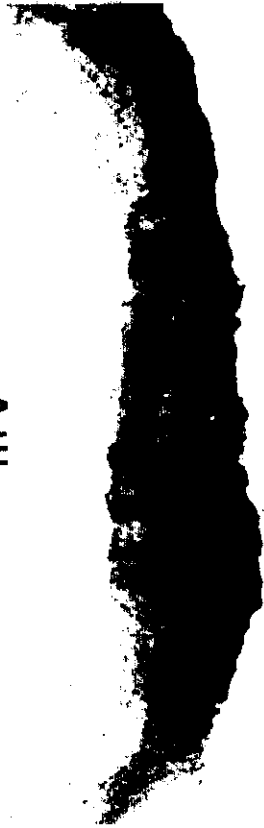
B

IIIV



C

IIIV



D

Figura 3.5.- Microfotografías de cortes transversales a nivel del NPV mostrando neuronas (flechas) y fibras inmunorreactivas (puntas de flecha) para la AVP mediante la técnica de la PAP. (A) C2M, situación basal; (B) C2M, estrés; (C) A2M, situación basal; (D) A2M, estrés.

No se aprecian diferencias entre los distintos grupos experimentales.

IIIIV: tercer ventrículo. Barra de calibrado: 100 μ m.

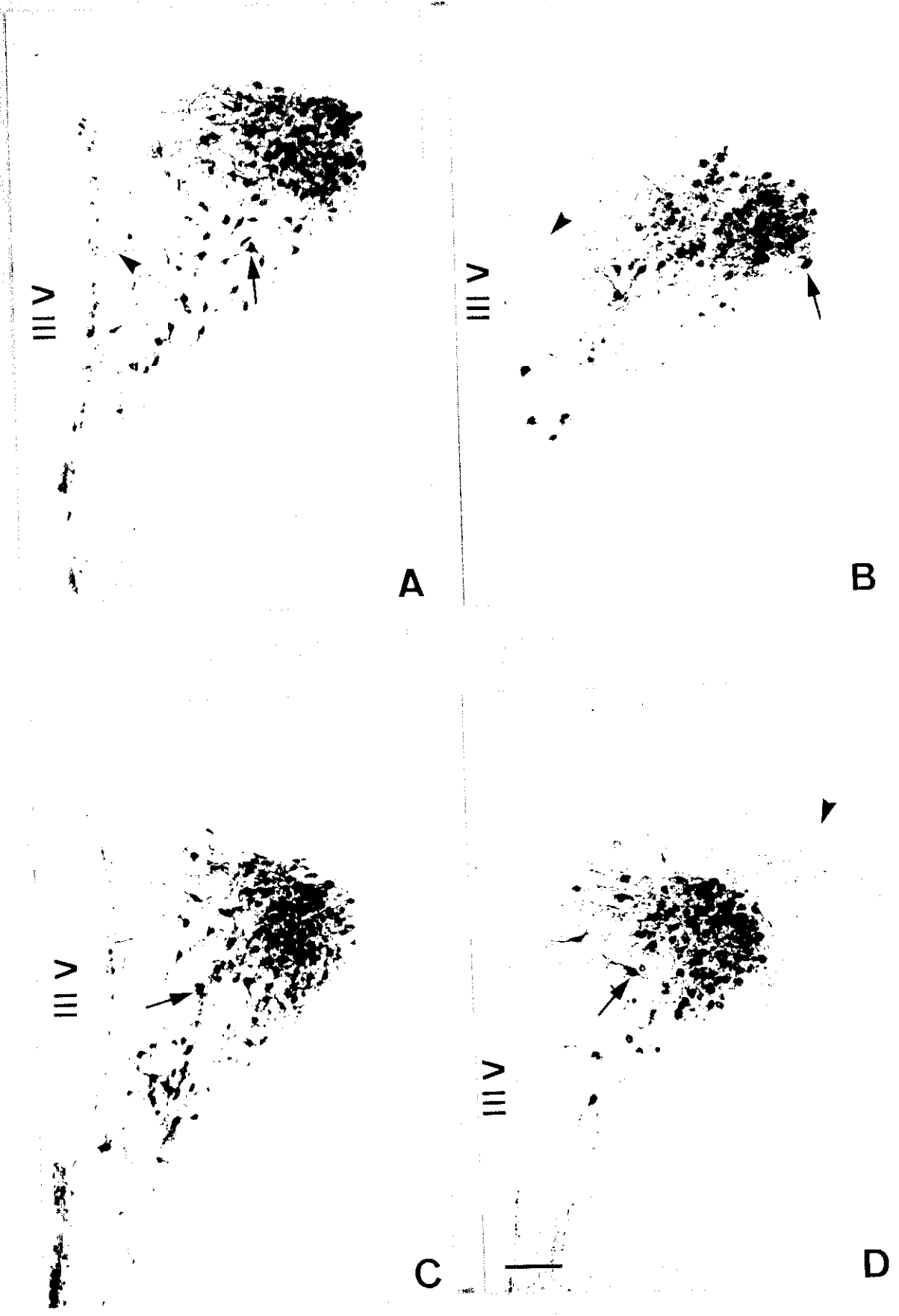


Figura 3.6.- En las microfotografías de cortes transversales a nivel del NPV, se muestran neuronas (flechas) y fibras inmunorreactivas (puntas de flecha) para la OT. (A) C2M, situación basal; (B) C2M, estrés; (C) A2M, situación basal; (D) A2M, estrés.

No se observan diferencias entre los grupos experimentales.

IIIIV: tercer ventrículo. Barra de calibrado: 100 μ m.

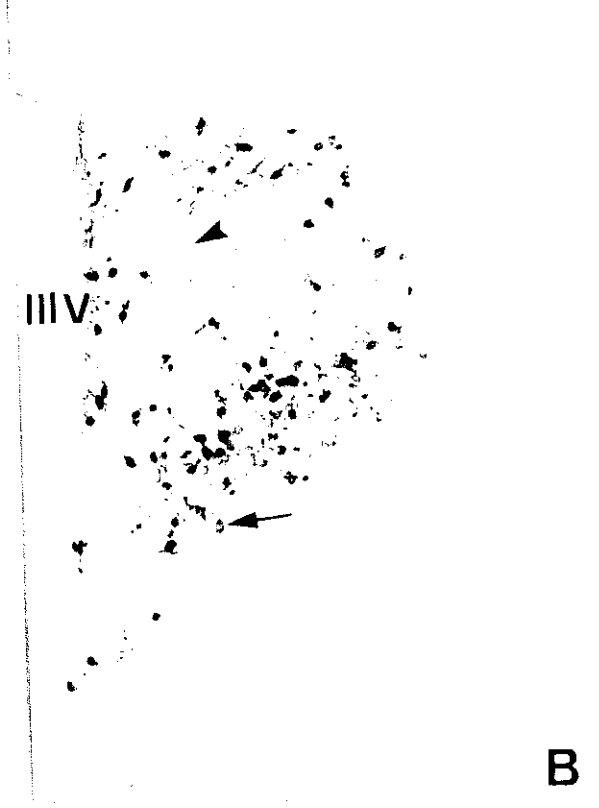
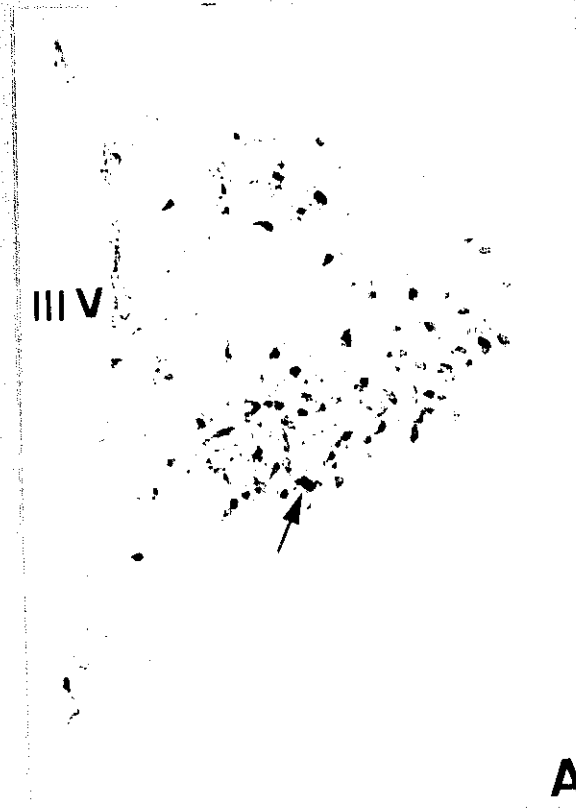
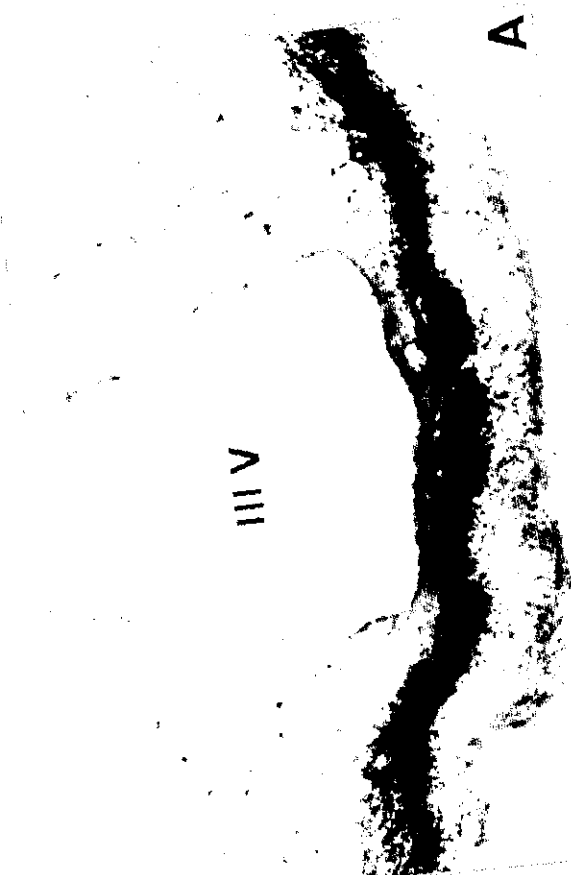


Figura 3.7.- Cortes coronales a nivel de la eminencia media (EM), mostrando fibras inmunorreactivas para la AVP, localizadas en su mayoría a nivel de la capa fibrilar de la zona interna de la misma. (A) C2M, situación basal; (B) C2M, estrés. (C) A2M, situación basal. (D) A2M, estrés.

No se aprecian diferencias entre los distintos grupos experimentales.

III V: Tercer ventrículo. Barra de calibrado: 100 μ m.



B

D

A

C

III V

III V

III V

III V

Figura 3.8.- Microfotografías de cortes transversales a nivel de la EM, observándose fibras inmunorreactivas para la OT, en su mayor parte localizadas en la capa fibrilar de su zona interna.

(A) C2M, situación basal; (B) C2M, estrés; (C) A2M, situación basal; (D) A2M, estrés.

No se aprecian diferencias evidentes entre los grupos experimentales.

IIIIV: tercer ventrículo. Barra de calibrado: 100 μm .

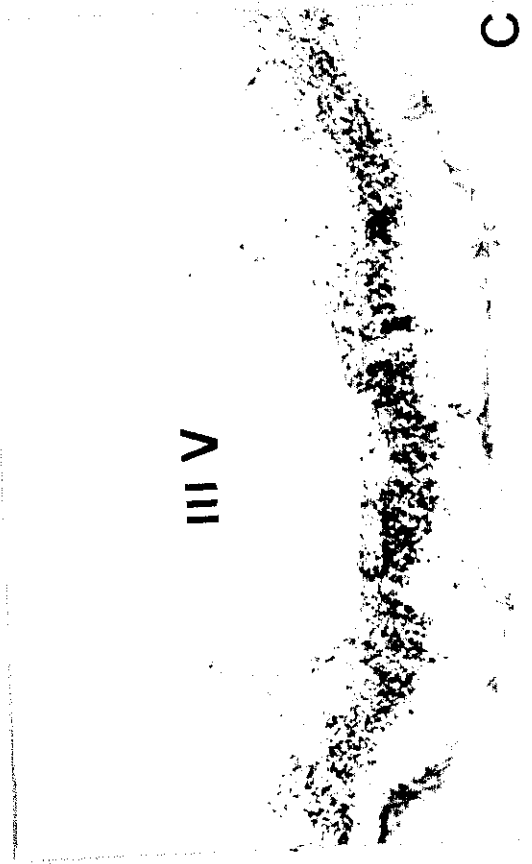
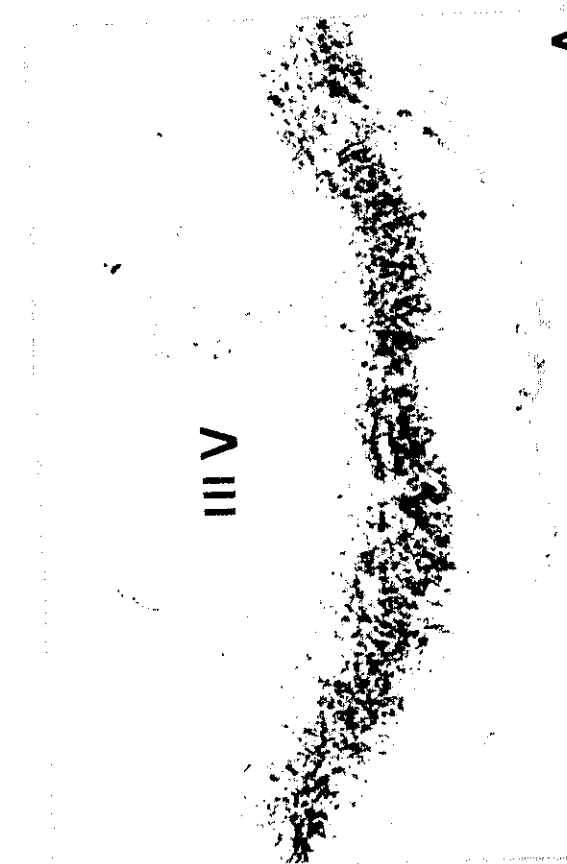
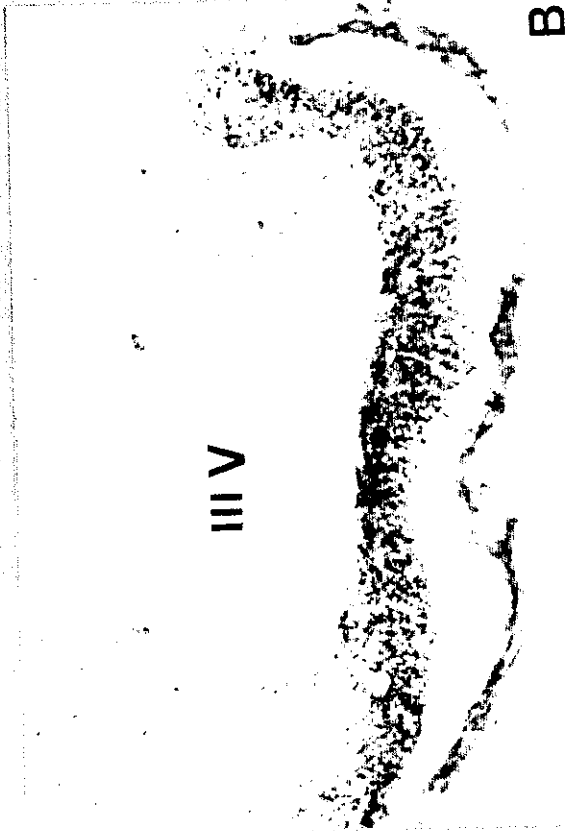
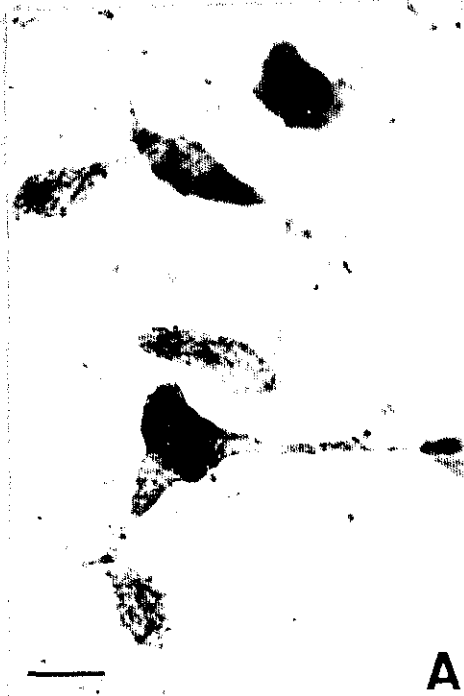
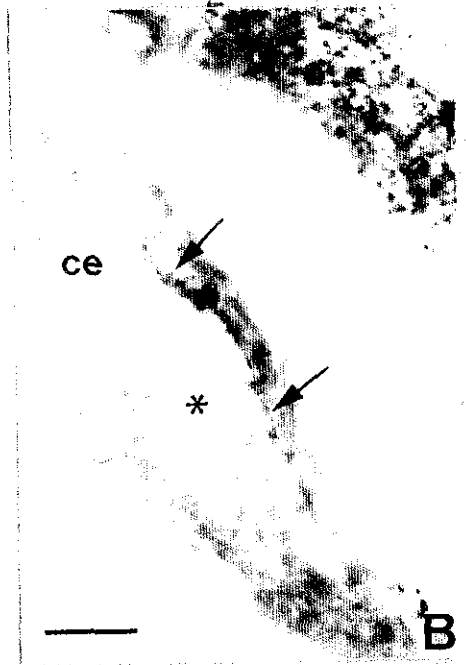


Figura 3.9.- Detalle de neuronas vasopresinérgicas (A) y oxitocinérgicas (C) en la división magnocelular del NPV. (B) Fibra inmunorreactiva para AVP (flechas) rodeando un vaso (asterisco) en la capa empalizada (ce) de la ZEEM. (D) Fibra varicosa inmunomarcada para OT (flechas) atravesando la capa reticular (cr) de la ZEEM y cursando hacia la capa empalizada (ce) de la ZEEM.

Barra de calibrado: 15 μ m.



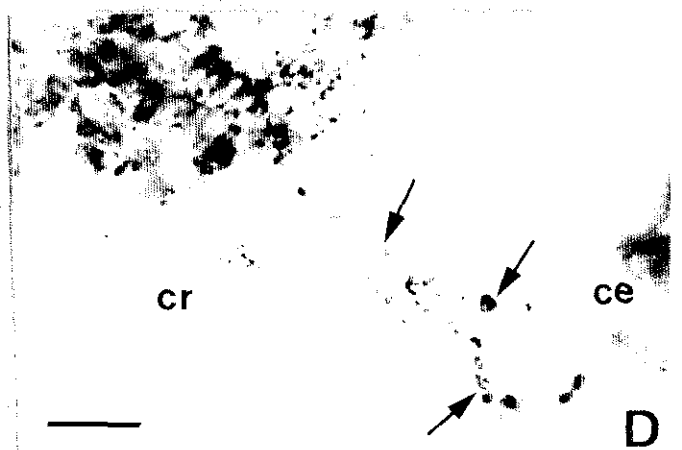
A



B



C



D

3.4.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE LA ACTIVIDAD UNITARIA EXTRACELULAR DE NUCLEOS CEREBRALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HHA.-

Nuestro siguiente objetivo consistió en comprobar si las alteraciones encontradas tras el aislamiento social en la funcionalidad del eje HHA estaban relacionadas con cambios en la actividad de centros nerviosos reguladores de dicha actividad, como son el núcleo de la estría terminal (NEST), el área preóptica (APO) y el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV). Para ello, se procedió a realizar un estudio de las unidades neuronales mediante el registro extracelular de su actividad espontánea así como de sus respuestas provocadas por estimulación de la amígdala medial (AMe).

En los animales pertenecientes al grupo control se registraron un total de 123 unidades: 65 en el NEST, 49 en el APO (28 células en el área preóptica lateral (APL) y 21 células en el área preóptica medial (APM)) y 9 en el NPV.

En los animales criados en aislamiento social se consiguieron un total de 86 registros: 29 en el NEST, 50 en el APO (APL: 35 neuronas, APM: 15 neuronas) y 7 en el NPV.

En todos los casos se comprobó histológicamente la localización correcta de los electrodos de registro y estimulación, como se describió en el apartado de Material y Métodos (Figura 3.10A, B y C).

Figura 3.10.- Localización anatómica de los electrodos de registro y estimulación.

(A) Fotomicrografía que muestra un ejemplo del marcaje con el colorante Chicago sky blue (flecha) tras el registro de una unidad en el APL.

Abreviaturas: APL, área preóptica lateral; CA, comisura anterior. Barra de calibrado: 200 μm .

(B) Fotomicrografía que muestra la localización del electrodo de estimulación en el AMe (flecha).

Abreviaturas: AMe, núcleo medial de la amígdala; QO, quiasma óptico. Barra de calibrado: 400 μm .

A

CA

APL



B



AMe

OO



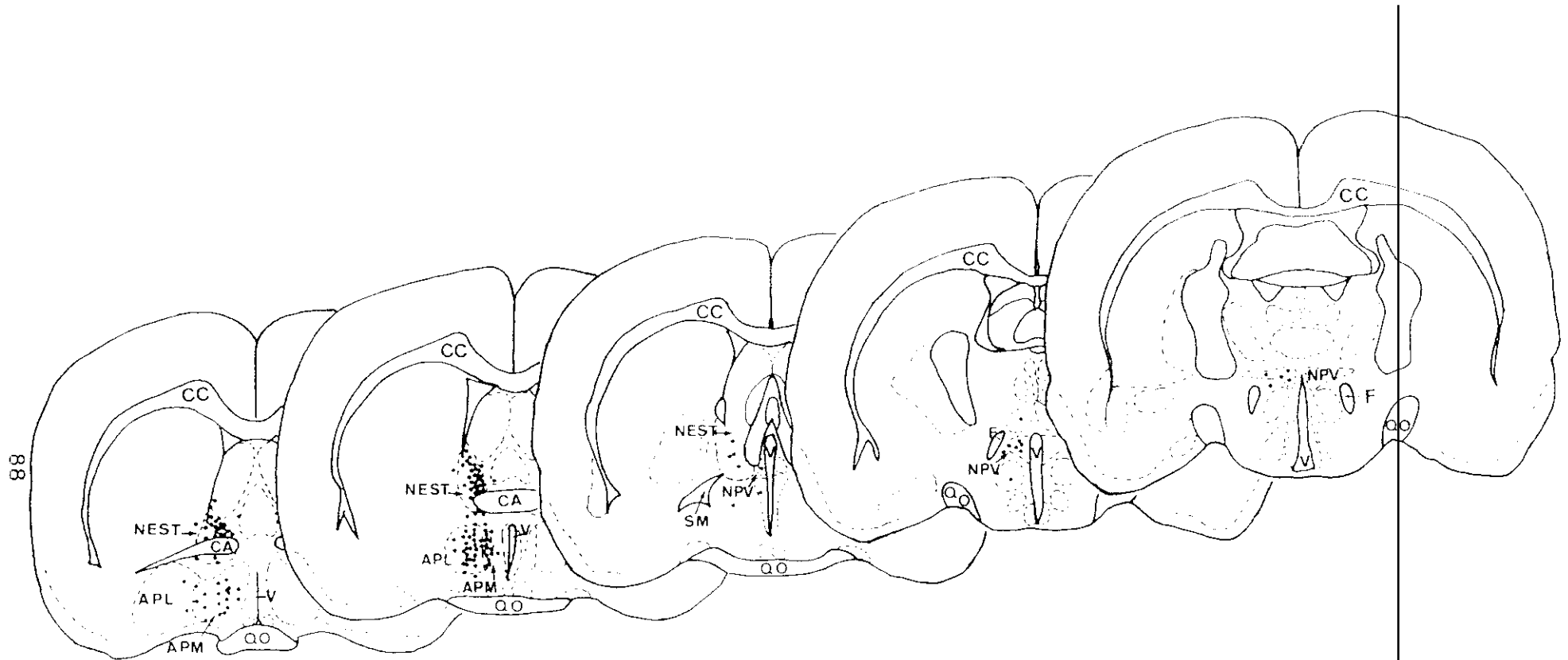


Figura 3.10 (C).- Esquema de secciones transversales de cerebro que muestran la localización anatómica de algunas unidades aisladas en el NEST, APO y NPV.
 Abreviaturas: APL, área preóptica lateral; APM, área preóptica medial; CA, comisura anterior; CC, cuerpo calloso; F, fornix; NEST, núcleo de la estría terminal; NPV, núcleo paraventricular hipotalámico; QO, quiasma óptico; SM, stria medullaris; V, tercer ventrículo.

El registro de las unidades se llevó a cabo a partir del momento en que se estabilizó la descarga de la célula, eliminándose con ello la posibilidad de que existiera algún tipo de daño celular.

Además del estudio de la actividad espontánea, se registró la respuesta de cada unidad a la estimulación eléctrica del AMe. Las células se clasificaron de acuerdo con el tipo de respuesta que presentaban, tratándose en todos los casos seleccionados para el presente trabajo de una respuesta ortodrómica, sin que la estimulación de la AMe provocase en ningún caso una espiga antidrómica. Como se ha expuesto en Material y Métodos las respuestas de las unidades registradas provocadas por la estimulación amigdalina consistieron en una activación (OD+), o en una inhibición o reducción (OD-) de su descarga (figura 3.11).

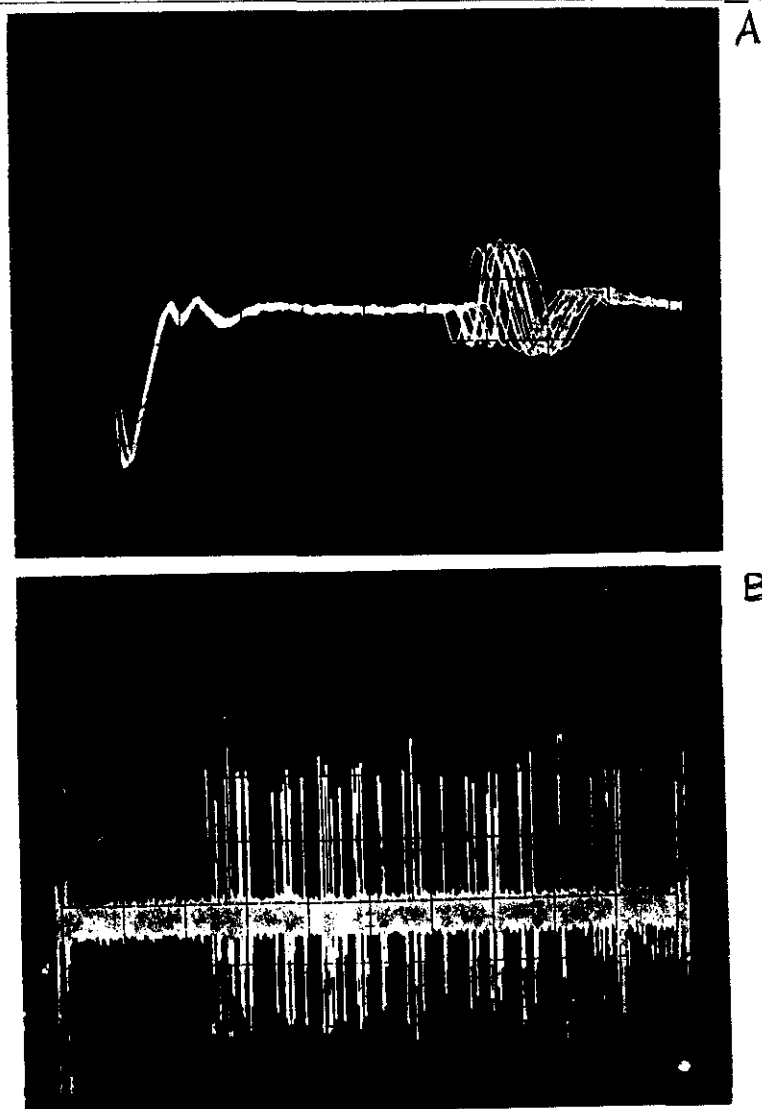


Figura 3.11.- (A) 20 barridos superpuestos de la actividad unitaria registrada en células del NEST tras la estimulación eléctrica del núcleo medial de la amígdala (AMe) a 0.2 Hz de frecuencia de estimulación. La célula mostró un incremento de descarga de potenciales de acción (OD+) en respuesta a la estimulación amigdalina. La flecha señala el artefacto del estímulo.

(B) Trazos en el osciloscopio de 20 barridos superpuestos de la actividad unitaria registrada en una célula de tras la estimulación eléctrica de la amígdala medial (AMe) a 0.2 Hz de frecuencia. La descarga de la célula resultó abolida (OD-) por la estimulación de la AMe. La flecha indica el artefacto del estímulo.

Sólamente se registró una célula "silenciosa" (es decir, que no descargaba espontáneamente) que fué detectada al descargar en respuesta a la estimulación del AMe.

3.4.1.- Núcleo de la estria terminal (NEST).-

En este núcleo se registraron 65 células en los animales control y 29 células en los animales aislados socialmente.

La frecuencia de descarga espontánea fué similar en ambos grupos de animales (control: 3.81 ± 0.60 espigas/segundo (Hz); aislados: 4.14 ± 0.67 Hz), como se representa en la Tabla VI. En esta tabla y en la Figura 3.12 también aparecen reflejadas las distribuciones de frecuencias de respuesta de las células del NEST a la estimulación eléctrica del AMe (en forma de % de neuronas que presenta cada patrón de respuesta). La mayoría de las unidades aisladas en el NEST aumentaron su frecuencia de descarga en respuesta a la estimulación de la AMe en ambos grupos de animales (63.6% en controles y 65.5% en aislados).

La comparación de las distribuciones de frecuencias de respuesta, mediante la prueba χ^2 , indicó que el aislamiento social no provocaba alteraciones estadísticamente significativas en el patrón de respuesta de las unidades registradas en el NEST a la estimulación eléctrica del AMe (Tabla VI y Fig. 3.12).

TABLA VI

Frecuencia de descarga espontánea de las células registradas en el NEST de ratas control y aisladas, expresada en número de espigas/segundo (Hz), así como su distribución de frecuencias de respuesta a la estimulación eléctrica del AMe (en porcentaje de células).

	f (Hz)	RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN		
		OD+	OD-	NR
C2M (n=65)	3.81±0.60	63.6 %	28.8 %	7.6 %
A2M (n=29)	4.14±0.67	65.5 %	31.0 %	3.5 %
	n.s. #	n.s. \$		

El análisis estadístico de los datos relativos a la frecuencia de descarga espontánea se realizó mediante el test t de Student (#), y el correspondiente a los datos de frecuencia de cada respuesta se llevó a cabo mediante el test de X^2 (\$). n.s.: diferencias estadísticamente no significativas. n: número de células.

Tipo de respuesta de las células registradas a la estimulación de la amígdala medial: excitatoria (OD+), inhibitoria (OD-), ausencia de respuesta (NR).

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA AMÍGDALA MEDIAL
Núcleo de la estría terminal

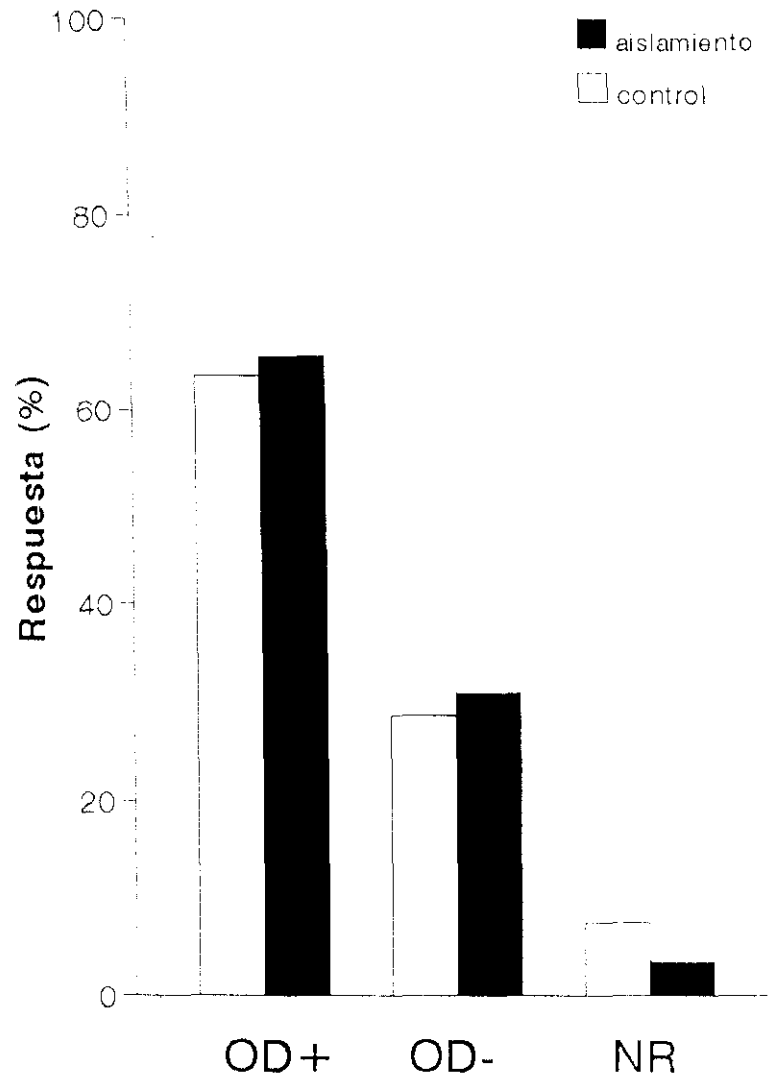


Fig. 3.12.- Distribución de las respuestas de células del NEST a la estimulación de la amígdala medial (AMe) en animales control y aislados. OD+: células activadas; OD-: células inhibidas; NR: células que no respondieron a la estimulación.

También se analizaron la latencia y duración de las respuestas, la frecuencia espontánea de descarga y profundidad a la que se localizaron las células, una vez agrupadas según su tipo de respuesta a la estimulación de la AMe. Los resultados de este análisis y la comparación estadística entre el grupo control y el grupo mantenido en aislamiento social se muestran en la Tabla VII, sin que se observaran diferencias significativas respecto a las variables estudiadas. Destacamos aquí que, dentro de la población de neuronas registradas en el NEST que respondían con OD+ a la estimulación del AMe, tres células mantuvieron la duración de esta respuesta por encima de los 200 ms (280, 700 y 1124 ms) en el grupo de animales aislados, valor muy por encima de la media encontrada en el grupo de animales control.

TABLA VII

Valores de las distintas variables analizadas tras la agrupación de las células registradas en el NEST según su tipo de respuesta a la estimulación de la AMe: profundidad (mm) a la que se localizaban las unidades aisladas, frecuencia de descarga espontánea (f) en espigas/segundo (Hz), y latencia y duración de la respuesta (ms).

Respuesta	Variables	NEST	
		Control (n=65)	Aislados (n=29)
OD+	Profundidad (mm)	6.37±0.09 (n=41)	6.41±0.15 (n=19)
	f (Hz)	3.03±0.73	3.78±0.97
	Latencia (ms)	33.9±8.8	36.5±13.0
	Duración (ms)	25.3±6.5	135.8±70.44
OD-	Profundidad (mm)	6.49±0.11 (n=19)	6.25±0.17 (n=9)
	f (Hz)	6.34±1.52	5.81±1.18
	Latencia (ms)	9.4±2.8	9.6±2.9
	Duración (ms)	195.9±43.5	237.7±129.9
NR	Profundidad (mm)	6.83±0.14 (n=5)	5.89 (n=1)
	f (Hz)	4.69±2.97	0.80

Media±E.E.M. OD+: respuesta excitatoria; OD-: respuesta inhibitoria; NR: ausencia de respuesta. n: número de células registradas. Test t de Student, excepto cuando no se cumplieron los requerimientos de normalidad, que se utilizó el test U de Mann-Whitney.

En alguna de las células del NEST, tras la activación provocada por la estimulación de la amígdala medial se observó una inhibición de la frecuencia de descarga, fenómeno que simbolizamos por OD+/- (B):

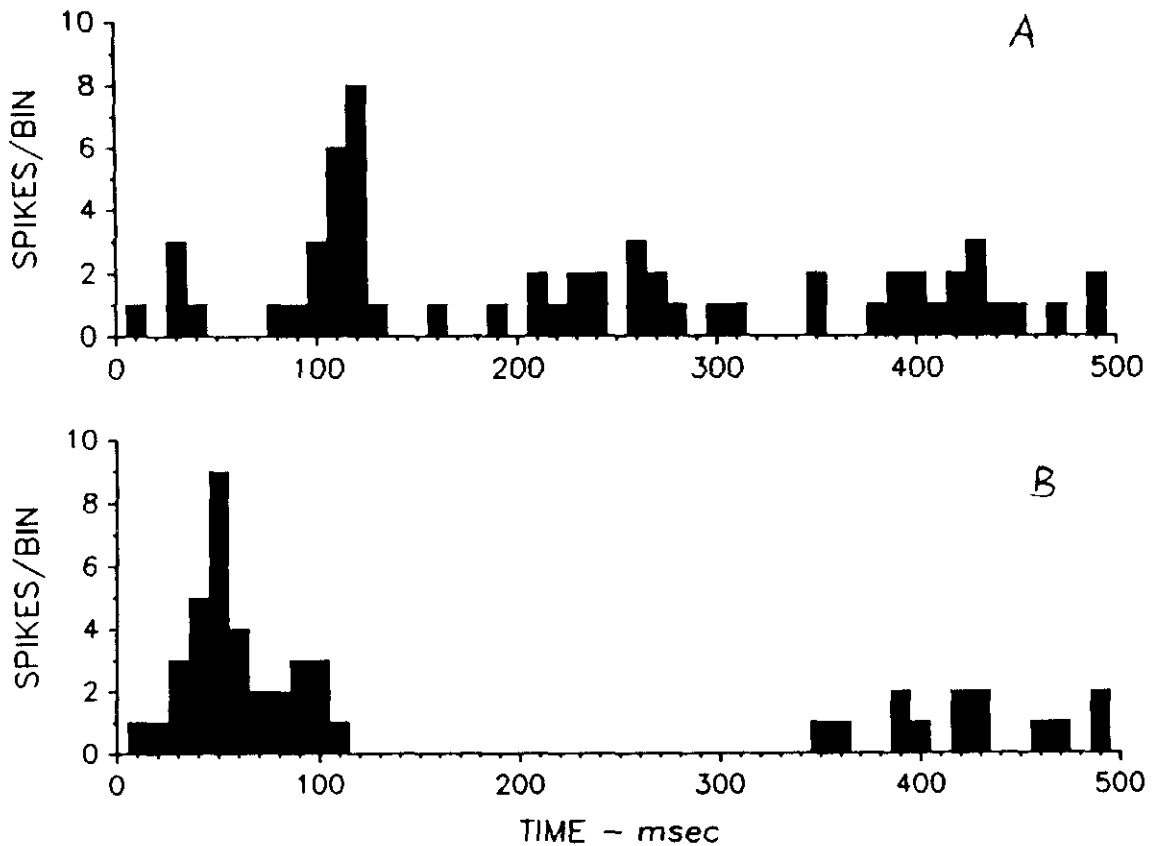


Fig. 3.13.- Respuestas de unidades del NEST a la estimulación eléctrica de la amígdala medial (AMe), tomando como referencia (tiempo 0) la ocurrencia del estímulo. La barra representa 10 ms y se muestran datos de 20 épocas de estímulos. En la figura A se observa la respuesta excitatoria (OD+) a dicha estimulación (indicada por la flecha vertical). La figura B muestra una respuesta inicial excitatoria de menor latencia seguida por una inhibición (OD+/-) de gran duración.

No se encontraron diferencias entre el grupo control y el mantenido en aislamiento ni respecto a la frecuencia de aparición de este tipo especial de respuesta, ni en la frecuencia de descarga espontánea de las células que lo exhibían, ni respecto a la duración de la inhibición:

- Controles (n=9 células, 21.95% de las que fueron activadas por estimulación de la AMe):
 - f=2.03±0.51 Hz
 - Duración de la inhibición: 759.56±494.96 ms.
- Aislados (n=4, 21.05% de las células OD+):
 - f=6.41±4.18 Hz
 - Duración de la inhibición: 112.00±41.79 ms.

Únicamente en tres células registradas en el NEST de animales aislados se produjo un cambio en la respuesta a la estimulación de la amígdala medial después de unos minutos de registro, pasando de un incremento en la frecuencia de descarga a la inhibición de ésta (OD+ a OD-). En los animales control no se detectó este tipo de fenómeno pero, en cambio, se registraron 3 células que respondieron con dos períodos consecutivos de excitación a la estimulación de la AMe (intervalo (ms) entre ellos (¿¿figura 3c del manuscrito AD como muestra del fenómeno??)).

3.4.2.- Area preóptica (APO).-

En esta región se registró la actividad unitaria de 49 células en animales control y de 50 en animales deprivados socialmente. Todas las unidades aisladas presentaron actividad espontánea excepto en el caso de una célula ¿silente? encontrada en área preóptica lateral (APL) de animal control, en la que se registró únicamente su respuesta a la estimulación eléctrica de la AMe.

Las unidades aisladas en el APO mostraron una frecuencia de descarga espontánea mayor que las del NEST, y dicha descarga no se modificó significativamente tras el aislamiento social (controles: 9.85±1.1 Hz; aislados: 8.10±0.83 Hz; Tabla VIII y Fig. 3.13). La mayoría de células aisladas en el APO de animales con contacto social fueron activadas por la estimulación de la AMe (62%); tras el aislamiento social disminuyó significativamente el número de células preópticas que presentaron dicha respuesta (36%), incrementándose el porcentaje de células que resultaron inhibidas (38%), en comparación con el grupo control ($p < 0.05$, $X^2 = 9.02$), como se muestra en la tabla VII y Figura 3.13.

TABLA VIII

Frecuencia de disparo espontáneo (f) en Hz de las unidades aisladas en el área preóptica (APO) de ratas control y aisladas (media±E.E.M.), así como su patrón de respuesta a la estimulación de la amígdala medial (en porcentaje).

	f (Hz)	RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN		
		OD+	OD-	NR
C2M(n=49)	9.85±1.10	62.0 %	14.0 %	24.0 %
A2M(n=50)	8.10±0.83	36.0 %	38.0 %	<u>26.0 %</u>
	n.s. #	p<0.05 \$		

#: test t de Student; \$: test de X^2 . n.s.: diferencias estadísticamente no significativas.

OD+: activación; OD-: inhibición; NR: Ausencia de respuesta; n: número de células.

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA AMÍGDALA MEDIAL
Area Preóptica

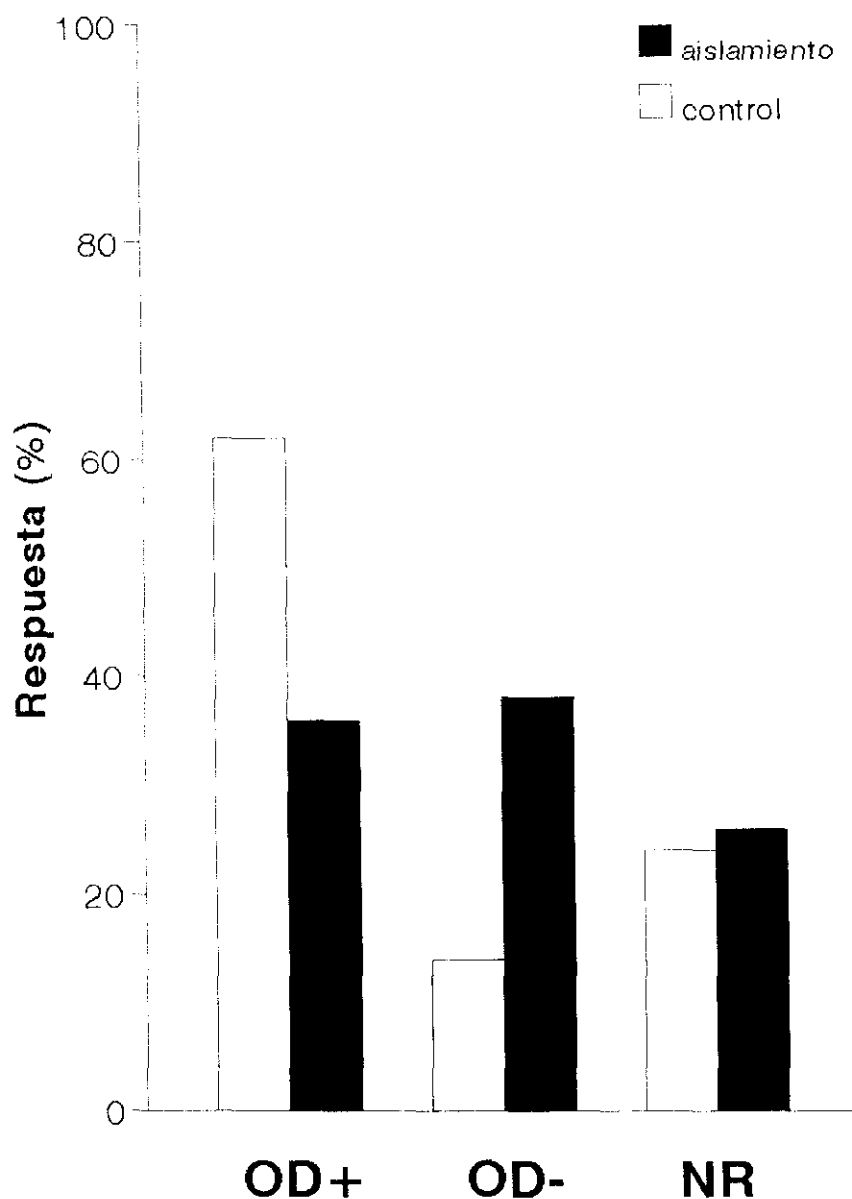


Fig. 3.13.- Distribución de las respuestas de células del APO a la estimulación de la amígdala medial (AMe) en animales control y aislados. OD+: células activadas ortodrómicamente. OD-: células inhibidas ortodrómicamente. NR: células que no respondieron a la estimulación. El aislamiento social alteró significativamente el patrón de respuesta de las células registradas ($p < 0.05$, test de χ^2).

Tras el agrupamiento de las unidades registradas en el APO de acuerdo al tipo de respuesta a la estimulación de la AMe, se analizaron: la profundidad a la que se localizaron las unidades aisladas, su frecuencia de descarga espontánea, y la latencia y duración de la respuesta. En la Tabla IX aparecen reflejados los resultados de este análisis, observándose que la descarga espontánea de las células del APO que no respondieron a la estimulación de la amígdala medial era significativamente menor en animales aislados que en el grupo control ($Z=-1.97$, $p<0.05$). No se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales respecto a las demás variables consideradas.

TABLA IX

Profundidad (en mm) a la que se localizaban las células registradas en el APO, frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz, latencia de respuesta a la estimulación eléctrica de la AMe y duración de dicha respuesta (ms) en los distintos grupos de células clasificados según el tipo de respuesta.

Respuesta	Variables	APO	
		Controles (n=49)	Aislados (n=50)
OD+	Profundidad (mm)	7.92±0.09 (n=30)	7.36±0.19 (n=18)
	f (Hz)	8.17±1.25	7.24±1.25
	Latencia (ms)	62.7±24.9	54.1±14.6
	Duración (ms)	53.8±12.5	62.7±14.0
OD-	Profundidad (mm)	7.67±0.24 (n=7)	7.57±0.13 (n=19)
	f (Hz)	9.47±3.25	9.21±1.39
	Latencia (ms)	10.4±4.5	8.7±1.8
	Duración (ms)	185.9±77.9	103.9±15.3
NR	Profundidad (mm)	7.99±0.18 (n=12)	7.49±0.12 (n=13)
	f(Hz)	14.74±2.88 *	7.83±1.90 *

Los datos muestran la media±E.S.M.

OD+: activación. OD-: inhibición. NR: Ausencia de respuesta.
n: número de células.

*: $p<0.05$, test U de Mann-Whitney.

Al igual que en el NEST, algunas de las células respondieron con una secuencia excitación-inhibición (OD+/-) a la estimulación de la AMe: 2 unidades en el grupo control y 1 en el grupo aislado (6.5% y 5.6%, respectivamente, de las células con respuesta OD+), cuyas frecuencias de descarga

espontánea y duraciones de la inhibición fueron:

- control: $f=8.0\pm 1.41$ Hz; duración inh.= 153 ± 4.24 ms
- Aislamiento: $f=22$ Hz; duración inh.=38 ms

Tras observar alteraciones en la actividad eléctrica de las neuronas registradas en el área preóptica como consecuencia del aislamiento social, las células fueron analizadas separadamente para determinar si dichas alteraciones eran distintas si las unidades registradas procedían del área preóptica lateral (APL) o del área preóptica medial (APM).

3.4.2.a. Area preóptica lateral (APL).-

La frecuencia de descarga espontánea fué similar en las 28 unidades registradas en el APL de animales control (11.33 ± 1.54 Hz) y en las 35 células aisladas en animales sometidos a deprivación social (8.24 ± 1.02 Hz), como se representa en la Tabla IX. Tampoco se encontraron alteraciones significativas debidas al aislamiento social en el patrón de respuesta a la estimulación de la AMe, aunque se observó un incremento en el número de células que fueron inhibidas por estimulación de la AMe (Tabla X y figura 3.14).

TABLA X

Frecuencia de disparo espontáneo (f) en Hz de las unidades aisladas en el área preóptica lateral (APL) de ratas control y aisladas (media±E.E.M.), así como su patrón de respuesta a la estimulación de la amígdala medial (en porcentaje).

	f (Hz)	RESPUESTA A LA ESTIMULACION		
		OD+	OD-	NR
C2M (n=28)	11.33±1.54	44.8 %	20.7 %	34.5 %
A2M (n=35)	8.24±1.02	34.3 %	45.7 %	20.0 %
	n.s. #	n.s. \$		

#: Análisis estadístico de los datos de frecuencia de descarga mediante el test t de Student.

\$: test de X^2 para el análisis de los datos de frecuencia de respuesta.

n.s.: diferencias estadísticamente no significativas.

OD+: activación; OD-: inhibición; NR: Ausencia de respuesta.

n: número de células.

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA AMÍGDALA MEDIAL
Area preóptica lateral

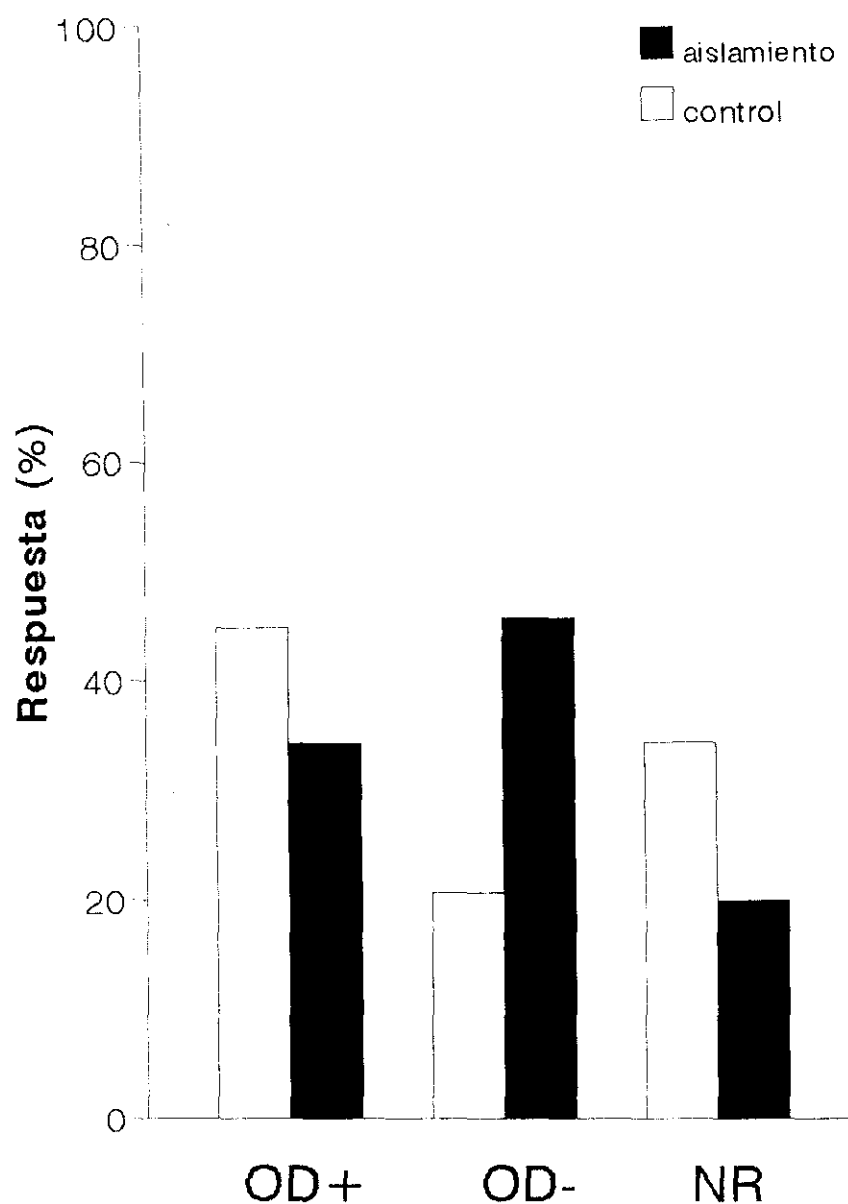


Fig. 3.14.- Distribución de las respuestas de células del APL a la estimulación de la amígdala medial (AMe) en animales control y aislados. OD+: células activadas ortodrómicamente. OD-: células inhibidas ortodrómicamente. NR: células que no respondieron a la estimulación. Las diferencias en la distribución de la respuesta entre el grupo control y el mantenido en aislamiento social se determinó por medio del test de X^2 . n.s.: diferencias no significativas entre grupos.

En cuanto al análisis de la profundidad a la que se encontraron las unidades registradas, la frecuencia espontánea de descarga de las mismas, y la latencia y duración de cada tipo de respuesta, tras el aislamiento social se observó una disminución significativa de la frecuencia de descarga espontánea en las células que no respondían (NR) a la estimulación de la AMe ($Z = -2.26$, $p < 0.05$), como se refleja en la Tabla XI. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales respecto a las demás variables estudiadas.

TABLA XI

Profundidad (mm) a la que se localizaban las unidades aisladas en el APL, frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz, latencia de respuesta a la estimulación eléctrica de la AMe y duración de dicha respuesta (ms) en los distintos grupos de células clasificados según el tipo de respuesta.

Respuesta	Variables	APL	
		Controles (n=28)	Aislados (n=35)
OD+	Profundidad (mm)	7.84±0.14 (n=12)	7.14±0.19 (n=12)
	f (Hz)	8.81±2.18	7.57±1.85
	Latencia (ms)	37.5±13.4	63.0±20.8
	Duración (ms)	44.8±11.2	72.5±18.6
OD-	Profundidad (mm)	7.73±0.28 (n=6)	7.51±0.15 (n=16)
	f (Hz)	8.71±3.77	9.81±1.60
	Latencia (ms)	10.8±5.4	7.2±2.0
	Duración (ms)	208.2±88.7	108.8±19.7
NR	Profundidad (mm)	7.89±0.19 (n=10)	7.24±0.14 (n=7)
	f (Hz)	15.35±2.98	5.51±1.57 *

Los datos representan la media±E.E.M.

OD+: activación. OD-: inhibición. NR: Ausencia de respuesta.
n: número de células.

*: $p < 0.05$, test U de Mann-Whitney.

Dentro del grupo control no se encontró en el APL ninguna célula que tras la activación provocada por la estimulación de la amígdala medial presentara una inhibición de la frecuencia de descarga (OD+/-) y sólo una célula exhibió tal tipo de respuesta en un animal aislado (8.3% de las células OD+). Esta unidad descargaba espontáneamente con una frecuencia de 22 Hz y la duración de la inhibición fué de 38 ms.

3.4.2.b. Area preóptica medial (APM).-

Se registraron 21 unidades en el APM de animales control y 15 en el de animales aislados. El aislamiento social no alteró la frecuencia de descarga espontánea, como se refleja en la tabla XII.

La mayoría de células registradas en el APM del grupo control aumentaron su frecuencia de descarga en respuesta a la estimulación del AMe (85.7%). La deprivación social alteró dicha respuesta, produciendo una disminución significativa del número de unidades que eran activadas tras la estimulación (40%) y un aumento paralelo de células que resultaron inhibidas (controles: 4.8%; aislados: 20%), como se muestra en la Tabla XII y Figura 3.15 ($\chi^2=8.23$, $p<0.05$).

TABLA XII

Frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz de las células registradas en el área preóptica medial (APM) de ratas control y aisladas ($media \pm E.E.M.$), así como su respuesta a la estimulación de la amígdala medial (en porcentaje de células que presentó cada tipo de respuesta).

	f (Hz)	RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN		
		OD+	OD-	NR
C2M (n=21)	<u>7.62±1.47</u>	85.7 %	4.8 %	9.5 %
A2M (n=15)	7.79±1.56	40.0 %	<u>20.0 %</u>	40.0 %
	n.s. #	p<0.05 \$		

#: Análisis estadístico mediante el test t de Student.

\$: test de X^2 .

n.s.: diferencias estadísticamente no significativas.

OD+: activación; OD-: inhibición; NR: Ausencia de respuesta;

n: número de células.

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA AMIGDALA MEDIAL
Area preóptica medial

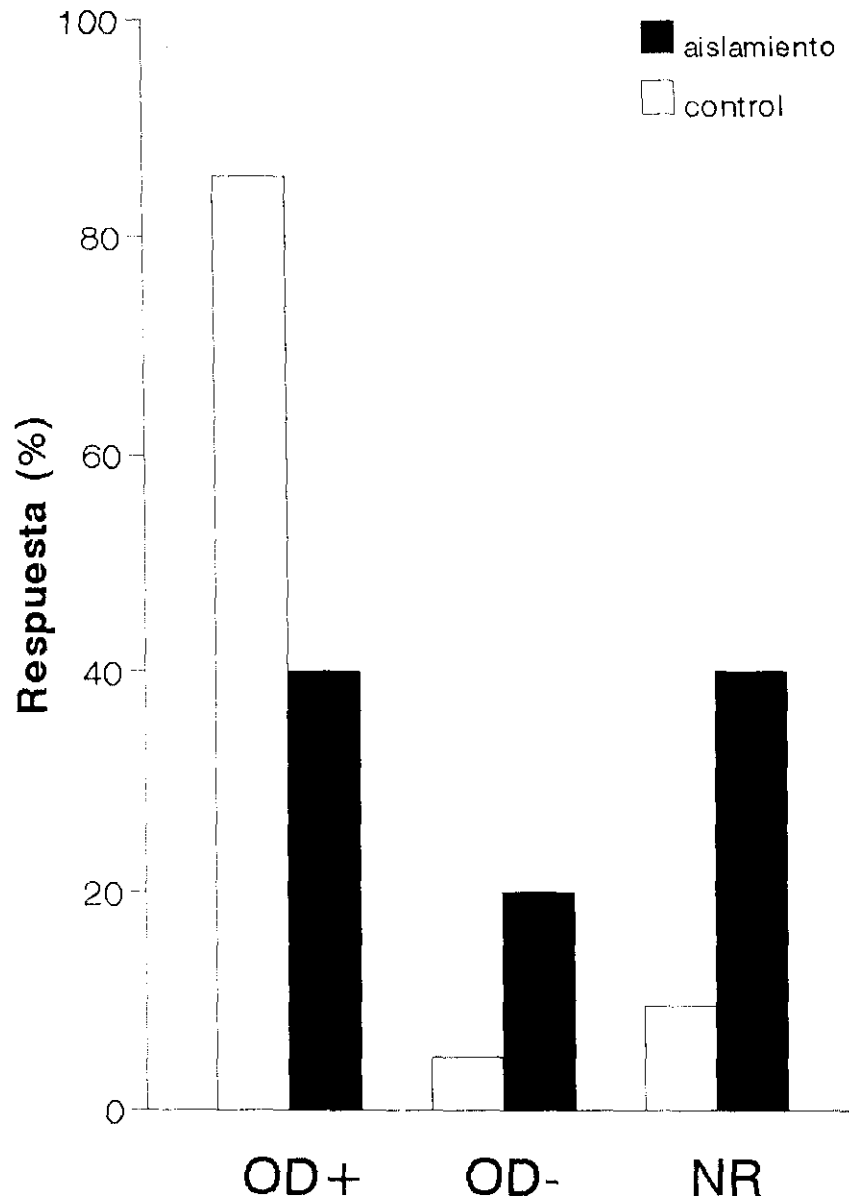


Fig. 3.15.- Distribución de las respuestas de células del APM a la estimulación de la AMe en animales control y aislados. OD+: células activadas ortodrómicamente. OD-: células inhibidas ortodrómicamente. NR: células que no respondieron a la estimulación. Las diferencias en el patrón de respuesta entre el grupo control y el mantenido en aislamiento social resultaron estadísticamente significativas ($X^2=8.23$, $p<0.05$).

Tras analizar la latencia y duración de cada tipo de respuesta a la estimulación de la AMe, así como la frecuencia de descarga espontánea y la profundidad a la que se localizaban las unidades aisladas, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre animales control y aislados (Tabla XIII).

TABLA XIII

Profundidad (mm) a la que se localizaban las unidades aisladas en el APM, frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz, latencia de respuesta a la estimulación eléctrica de la AMe y duración de dicha respuesta (ms) en los distintos grupos de células clasificados según el tipo de respuesta.

Respuesta	Variables	APM	
		Controles (n=21)	Aislados (n=15)
OD+	Profundidad (mm)	7.98±0.11 (n=18)	8.00±0.22 (n=6)
	f (Hz)	7.71±1.57	6.58±2.08
	Latencia (ms)	79.1±40.7	37.8±18.2
	Duración (ms)	59.6±19.8	50.5±16.8
OD-	Profundidad (mm)	7.31 (n=1)	8.04±0.30 (n=3)
	f (Hz)	14.00	6.00±2.56
	Latencia (ms)	8.0	15.0±3.6
	Duración (ms)	52.0	91.7±8.9
NR	Profundidad (mm)	8.48±0.64 (n=2)	7.60±0.06 (n=6)
	f (Hz)	12.00±11.04	10.53±3.64

Los datos representan media±error estándar de la media. Análisis estadístico de los datos mediante el test *t* de Student.

n: número de células.

OD+: activación ortodrómica. OD-: inhibición ortodrómica. NR: Ausencia de respuesta.

En el grupo control, 2 células exhibieron una respuesta OD+/- a la estimulación de la AMe, constituyendo el 11.1% de las unidades activadas (OD+). Su frecuencia de descarga espontánea era de 8.00±1.41 Hz y la duración del período inhibitorio: 153.00±4.24 ms. No se encontró este tipo de respuesta en el grupo privado socialmente.

3.4.3. Núcleo paraventricular hipotalámico (NPV).-

Las unidades registradas en el NPV de animales control (n=9) y de animales aislados (n=7) presentaban frecuencias de descarga que no eran significativamente diferentes (control: 6.91 ± 3.03 Hz; aislamiento: 3.39 ± 1.20 Hz), como se muestra en la Tabla XIV.

El NPV contiene una población de neuronas que secretan vasopresina y se caracterizan electrofisiológicamente por sus patrones fásicos de descarga eléctrica espontánea^{45,53,63}, como se ha descrito en la Introducción. En el grupo control del presente estudio registramos 3 unidades que mostraban dichos patrones fásicos de actividad de descarga y se trataría, por tanto, de células magnocelulares vasopresinérgicas. De ellas, una resultó activada por la estimulación de la amígdala medial, otra fué inhibida y la otra no respondió. En el grupo mantenido en aislamiento social no identificamos ninguna neurona que disparase fásicamente.

A continuación nos centraremos en el estudio de las células del NPV que no presentaron un patrón fásico sino tónico de descarga espontánea (continuo y heterogéneo) y que se localizaban histológicamente en la división parvocelular dorsomedial, por su interés para nuestro trabajo, al poder incluir células CRF-positivas. Todas las células con actividad no-fásica en animales control fueron activadas por la estimulación de la AMe (100%); en cambio, el aislamiento social redujo significativamente ($X^2=4.97$, $p<0.05$) dicho porcentaje (42.9%), incrementando el número de células que fueron inhibidas (28.5%) y no respondieron (28.6%), como se representa en la Tabla XIV y Figura 3.16.

TABLA XIV

Frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz de las células registradas en el núcleo paraventricular (NPV) con un patrón de actividad no-fásica (media±E.E.M.), así como su patrón de respuesta a la estimulación de la AMe (en porcentaje), tanto en el grupo control como el mantenido en aislamiento social.

RESPUESTA A LA ESTIMULACION

	f (Hz)	OD+	OD-/NR
C2M (n=6)	6.91±3.03	100 %	0 %
A2M (n=7)	3.39±1.20	42.9 %	57.1 %
	n.s. #		p<0.05 \$

#: test t de Student; \$: test de X^2 .

n.s.: diferencias estadísticamente no significativas. n: número de células.

OD+: activación. OD-/NR: células inhibidas o que no respondieron (En el grupo aislado socialmente, OD-:28.5% y NR:28.6%).

RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DE LA AMÍGDALA MEDIAL
Núcleo paraventricular (células con actividad no-fásica)

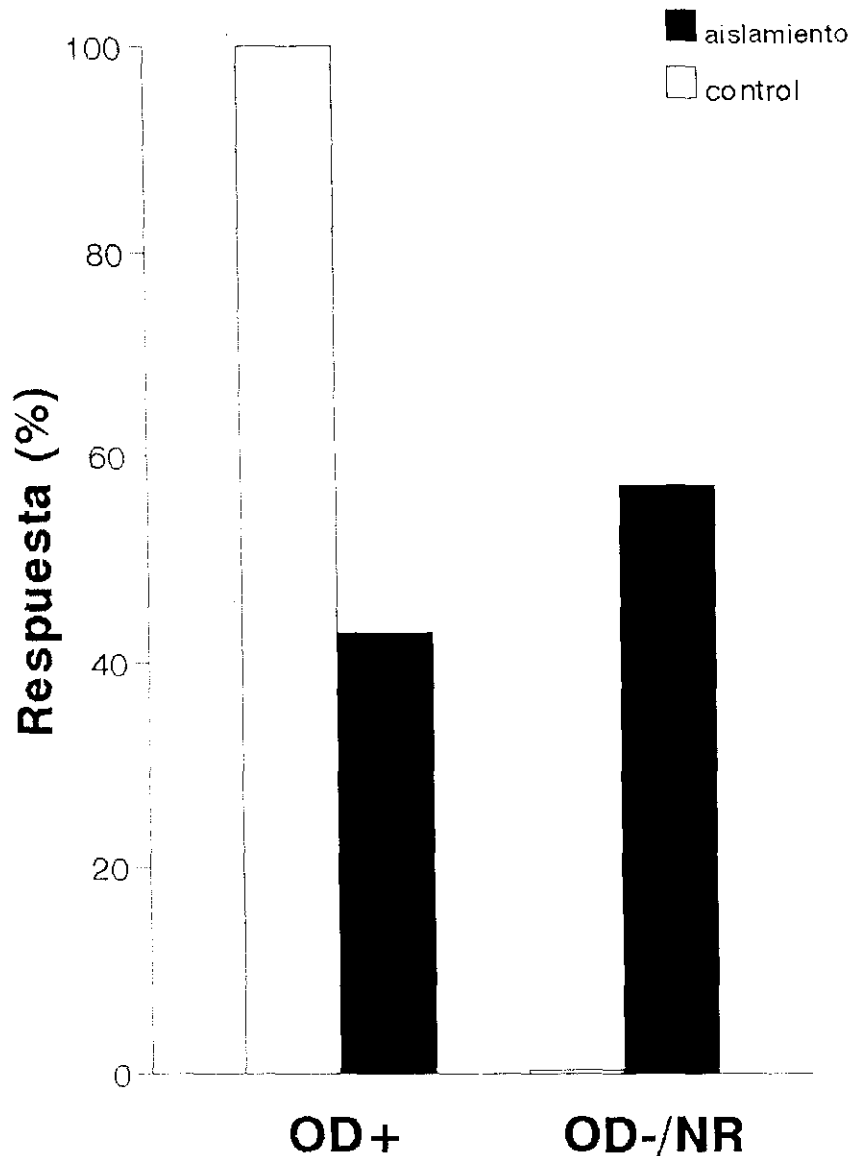


Fig. 3.16.- Distribución de las respuestas de células con patrón de actividad no-fásica del NPV a la estimulación de la amígdala medial en animales control y aislados. OD+: células activadas ortodrógicamente. OD-/NR: células inhibidas o que no respondieron a la estimulación. El aislamiento social provocó una disminución significativa del número de células que fueron activadas, acompañada de un incremento de células OD-/NR ($\chi^2=4.97$, $p<0.05$).

No se encontraron unidades que respondieran a la estimulación de la AMe con una etapa inicial de activación seguida de un período extenso de inhibición (OD+/-) ni en ratas control, ni en aisladas.

En la Tabla XV se representa la profundidad a la que se encontraban las unidades con actividad no-fásica registradas en el NPV, la latencia y duración de cada tipo de respuesta a la estimulación de la AMe, así como su frecuencia de descarga espontánea. Las células que eran activadas tras la estimulación de la AMe, presentaban una frecuencia de descarga espontánea significativamente menor en los animales aislados que en los control ($t=2.09$, $p<0.05$). En el grupo control todas las células registradas en el NPV respondieron con activación a la estimulación de la amígdala medial.

TABLA XV

Profundidad (mm) a la que se localizaban las unidades con actividad no-fásica aisladas en el NPV, frecuencia de descarga espontánea (f) en Hz, latencia y duración (ms) de la activación como respuesta a la estimulación eléctrica de la AME y duración de dicha respuesta (ms).

Respuesta	Variables	NPV	
		Controles (n=6)	Aislados (n=7)
OD+	Profundidad (mm)	7.64±0.06 (n=6)	7.18±0.35 (n=3)
	f (Hz)	6.91±2.53	1.02±0.50 *
	Latencia (ms)	55.83±32.58	127.3±143.0
	Duración (ms)	189.17±100.74	102.0±109.3
OD-	Profundidad (mm)	(n=0)	7.51±0.37 (n=2)
	f (Hz)	—	2.30±0.99
	Latencia (ms)	—	10.0±0.0
	Duración (ms)	—	127.5±17.7
NR	Profundidad (mm)	(n=0)	7.67±0.26 (n=2)
	f (Hz)	—	8.25±1.06

Los datos representan media±error estándar de la media.

n: número de células.

Análisis estadístico de los datos mediante el test t de Student (* p<0.05).

OD+: activación ortodrómica.

3.5.- EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE EL CAMPO DENDRITICO DE NEURONAS DEL AREA PREOPTICA.-

Una vez constatada la existencia de alteraciones en la actividad eléctrica espontánea y, sobre todo, en la respuesta a la estimulación de la amígdala de las neuronas del área preóptica, así como del núcleo paraventricular, nos propusimos identificar cuantitativamente si dichas alteraciones estaban relacionadas con cambios en la sinaptología neuronal. Para ello, realizamos un estudio en el campo dendrítico de neuronas del área preóptica tras la situación de deprivación social, ya que como se ha visto en el planteamiento del presente estudio, pueden estar implicadas en la regulación de la actividad del eje HHA a través de sus eferencias al núcleo paraventricular.

3.5.1.- Area preóptica medial. Densidad de espinas dendríticas en neuronas del APM-ST.-

El estudio de cuantificación se realizó sobre las espinas de dendritas orientadas perpendicularmente a la estría terminalis en neuronas del área preóptica medial estrial (APM-ST; Fig. 3.17). Como dato se utilizó el cociente: número de espinas/mm de dendrita.

Como puede apreciarse en la Tabla XVI, los animales aislados presentaban una densidad media de espinas dendríticas significativamente superior a su respectivo grupo control en las neuronas del APM-ST ($t=2.56$, $p<0.05$).

TABLA XVI

Número de espinas/mm en dendritas orientadas de neuronas del APM-ST en animales control y aislados (media±E.E.M.).

	e/mm
C2M	217.36±10.86
A2M	267.88±16.47
	t=2.56, p<0.05

n= 34 dendritas/grupo experimental

Análisis estadístico mediante el test t de Student.

3.4.2.- Area preóptica lateral. Cuantificación del campo dendrítico de una población homogénea de neuronas.-

Como se ha dicho con anterioridad, el tipo neuronal estudiado corresponde a una población homogénea de neuronas situadas en la región rostral del área preóptica lateral (APL), localizadas anteriormente al cruce de la comisura anterior. Dado que dicho tipo neuronal no ha sido definido previamente, al menos de forma expresa, en este área trataremos, en primer lugar y de un modo detallado, sobre sus características diferenciales, estudiadas mediante el método de Golgi.

3.5.2.a.- Estudio descriptivo del tipo neuronal estudiado: neuronas multipolares rostrales.-

Dentro del APO, y siguiendo los criterios anatómicos descritos en el apartado de Material y Métodos para delimitar el APL, centramos nuestra atención en un tipo neuronal que aparece a lo largo de 600-800 µm en dirección rostrocaudal, entre el límite rostral del APL y el cruce de la comisura anterior, que supone el límite caudal.

Se trata de un área muy rica en fibras, en la cual la

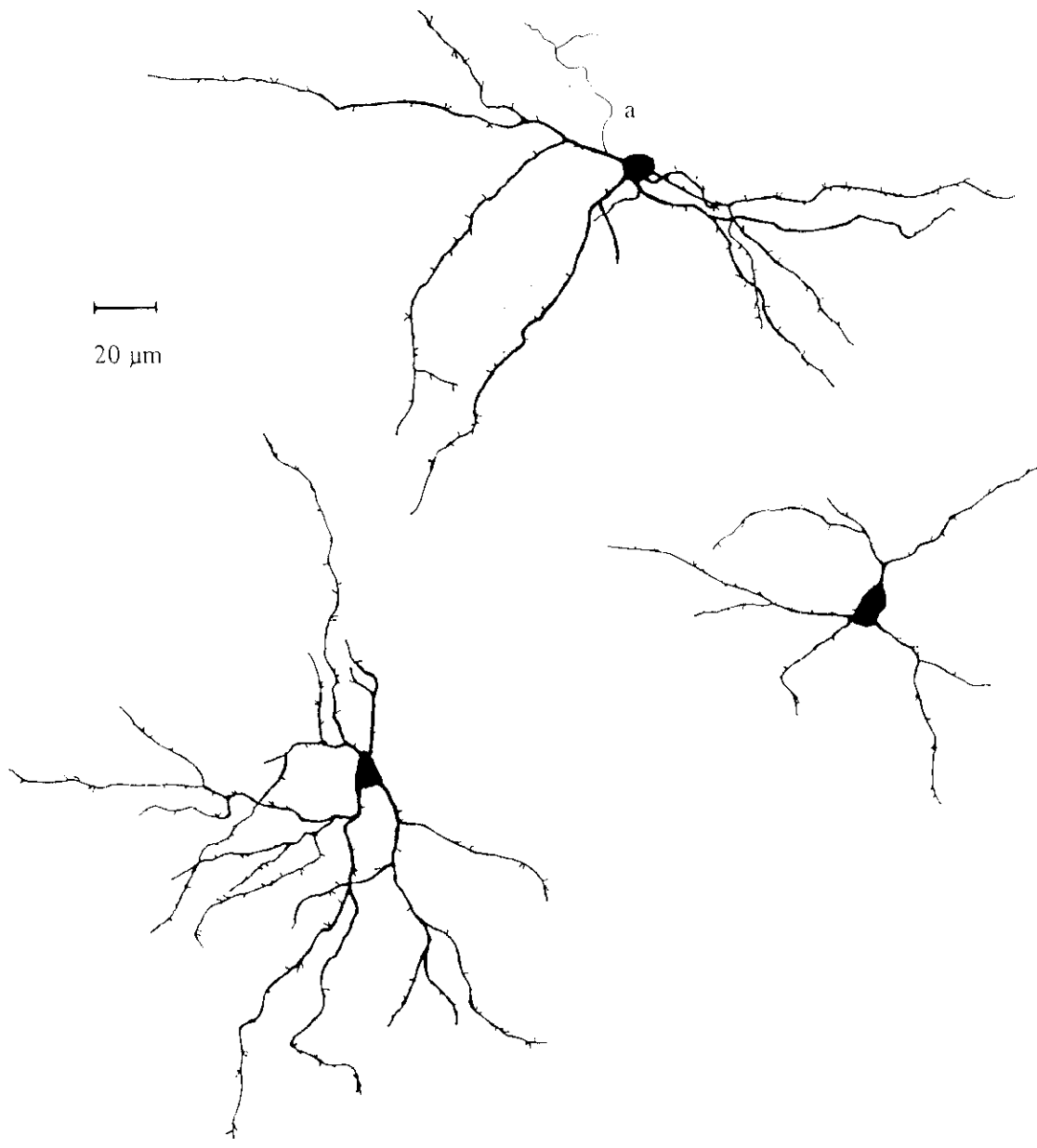
población dominante es la estudiada por nosotros (aproximadamente el 45% de las existentes) pero donde, además, aparecen de forma dispersa otras células de diferentes tamaños y formas (Bleier y col., 1979).

La población neuronal delimitada en este estudio dentro del APL rostral estaba constituida por unas pequeñas neuronas multipolares (de 3 a 4 troncos dendríticos por neurona, en algunos casos 2) de soma polimorfo (con gran abundancia de somas redondeados) y 15 μm de diámetro, aproximadamente (Figura 3.18A y B). Presentan prolongaciones dendríticas finas y de trayecto bastante rectilíneo, aunque en algunos casos se encuentran zonas de curvatura. El campo dendrítico que describen, de forma elíptica o circular, oscila entre 200-300 μm de diámetro. Las dendritas desarrollan, en general, pocas espinas dendríticas, las cuales son pedunculadas y aparecen dispuestas perpendicularmente a la dendrita.

La ramificación del campo dendrítico es, en general, más abundante que en otros tipos neuronales del APL. Siguiendo un criterio centrífugo (ver apartado de Material y Métodos), los órdenes de rama 1, 2 y 3 eran los más abundantes (85.5%), seguidos de los órdenes 4 (11%) y 5 (2%), mientras que los órdenes 6, 7 u 8 aparecían de forma muy escasa (0.5%). Los axones eran difícilmente observables en nuestras preparaciones, pudiendo constatarse su inserción en el soma o en dendritas proximales. En alguna ocasión se visualizó alguna ramificación temprana en los mismos.

La frecuencia de aparición de este tipo neuronal sigue un gradiente rostrocaudal, de tal forma que caudalmente al cruce de la comisura anterior estas neuronas se hacen muy escasas o no existen.

Este tipo de neuronas, que mantenía las características descritas de un modo constante, era claramente diferenciable de los otros tipos existentes en este nivel rostral, coincidentes, por otra parte, con los descritos por McMullen y Almlí (1981) en regiones más caudales del APL y en el AHL (ver apartado de Discusión).



3.5.2.b.- Efectos del aislamiento social sobre las neuronas multipolares rostrales del APL.-

- Número de espinas dendríticas/mm de tronco dendrítico

Como se muestra en la Tabla XVII, el aislamiento social produjo un incremento significativo de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas del APL en comparación con la situación control ($t=7.53$, $p<0.01$).

TABLA XVII

Número de espinas dendríticas/mm de tronco dendrítico (media±E.E.M) en neuronas del APL rostral en animales control y aislados socialmente

	e/mm
CONTROLES	245±16
AISLADAS	483±28
$t=7.53$, $p<0.01$	

n= 30 troncos dendríticos/grupo experimental

Análisis estadístico de los datos mediante el test t de Student.

- Características cuantitativas del campo dendrítico.

a) Variables métricas.

En la Tabla XVIII se representan los datos correspondientes a longitud total de la arborización dendrítica por neurona y por tronco dendrítico, así como la longitud terminal-soma por árbol dendrítico. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre animales control y aislados en cuanto a estas variables se refiere

(longitud por neurona: $t=0.83$, n.s.; longitud por tronco dendrítico: $t=1.27$, n.s.; longitud terminal-soma: $t=0.81$, n.s.).

TABLA XVIII

Longitud de la arborización dendrítica por neurona y por tronco dendrítico, así como longitud terminal-soma en μm (media \pm E.E.M.) de las neuronas multipolares rostrales del área preóptica lateral de animales control y aislados socialmente.

	POR NEURONA	POR TRONCO DENDRÍTICO	TERMINAL-SOMA
CONTROL	1065.2 \pm 63.6	235.6 \pm 14.4	120.2 \pm 2.9
AISLADOS	1153.6 \pm 76.0	265.4 \pm 11.7	116.9 \pm 2.6
	$t=0.83$, n.s.	$t=1.27$, n.s.	$t=0.81$, n.s.

Análisis estadístico de los datos mediante el test t de Student.

$n=30$ neuronas para la medición de la longitud total de la arborización dendrítica y $n=30$ troncos dendríticos (1/neurona) para la longitud por tronco dendrítico. Para la longitud terminal-soma, en controles $n=69$ terminales y en aislados $n=76$ terminales.

n.s.: Diferencias no significativas.

b) Grado de ramificación dendrítica de las neuronas del APL.

Tal y como se explicó en Material y Métodos, el parámetro indicativo del grado de ramificación neuronal fué el número de ramas dendríticas de los diferentes órdenes, de acuerdo con un criterio centrífugo. Los resultados se utilizaron en forma de frecuencias absolutas para el análisis estadístico y en forma de frecuencia relativa para la

representación gráfica en el diagrama de barras de la Figura 3.19. Como se muestra en ella, los órdenes más abundantes de ramas en ambas situaciones experimentales eran el 2 y el 3. Una vez realizado el test de X^2 para comparar las frecuencias absolutas de ramas de los distintos órdenes entre el grupo control y el sometido a aislamiento social, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($X^2=32.49$, $p<0.01$) entre ambas situaciones experimentales. Así, podríamos establecer que el aislamiento social provoca una disminución en la frecuencia de aparición de ramas de órdenes bajos (1 y 2) de las neuronas del APL, mientras que aumenta la frecuencia de ramas de órdenes altos (concretamente, las correspondientes a los órdenes 4 y 5). Estos resultados reflejan, por lo tanto, un aumento significativo de la ramificación en la situación de aislamiento, en comparación con la situación control.

RAMIFICACIÓN DE NEURONAS DEL APL

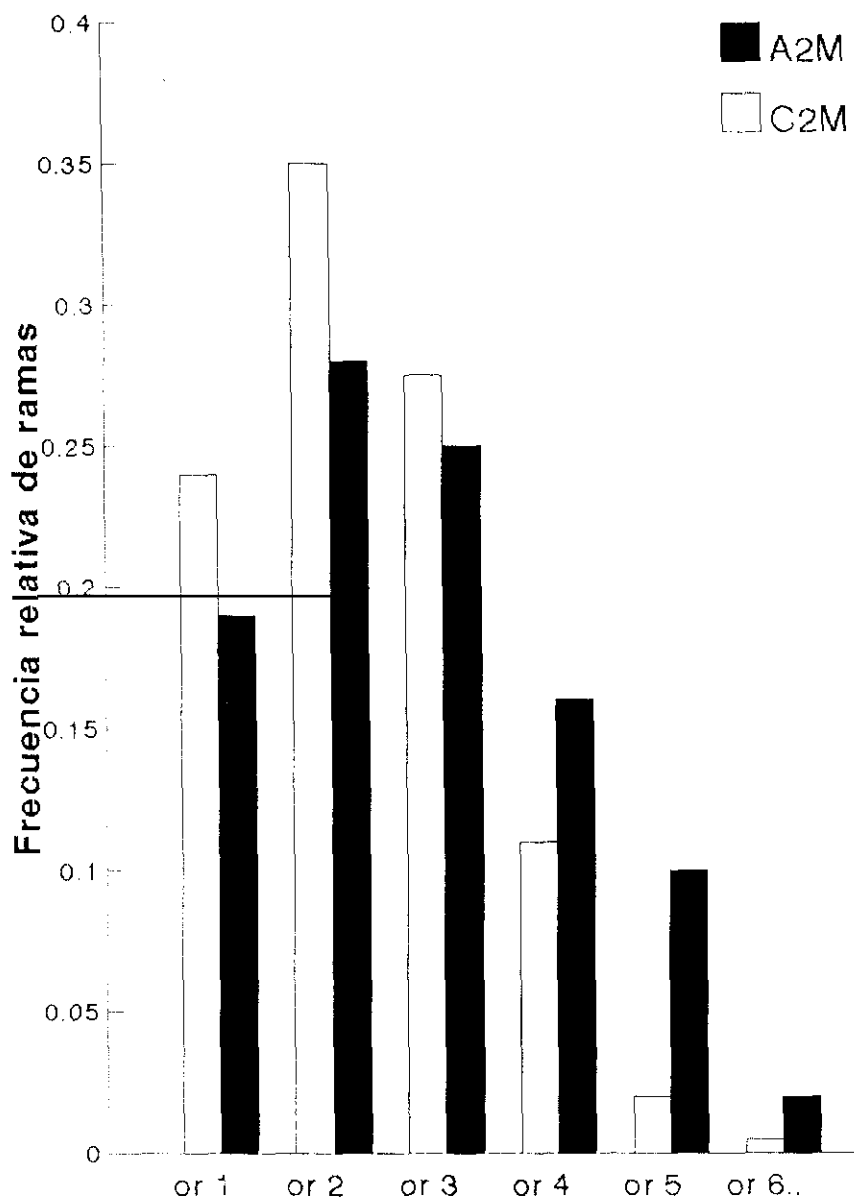


Figura 3.18.- Frecuencia relativa de ramas de los diferentes órdenes en neuronas del APL. C2M: grupo control de 75 días de edad; A2M: animales aislados durante 2 meses desde el destete a los 15 días de edad (75 días de edad).

Tras el análisis estadístico de los datos mediante el test de X^2 se encontró un incremento significativo de ramificación en el grupo A2M respecto del C2M ($X^2=32.49$, $p<0.01$). $n=30$ neuronas.

c) Densidad dendrítica en torno al soma neuronal.

El estudio se llevó a cabo mediante la cuantificación de las intersecciones de las dendritas con esferas imaginarias concéntricas de radios crecientes de 20 μm a partir del soma neuronal, tal como se describía en el apartado de Material y Métodos.

La Figura 3.20 representa el valor medio de intersecciones (\pm E.E.M.) con cada esfera concéntrica de Sholl por neurona en los dos grupos estudiados: A2M y C2M. En ella se aprecia un aumento de la densidad neuronal en torno al soma en los animales aislados respecto de los controles de la misma edad, concretamente entre 40-100 μm de distancia al soma.

No obstante, la comparación estadística global de los datos de ambas condiciones experimentales mediante un ANOVA de doble vía no detectó diferencias estadísticamente significativas ($F_{(1,58)}=2.616$, n.s.), por lo cual no se procedió a realizar ningún tipo de análisis *a posteriori*

De todo este grupo de resultados puede concluirse que las neuronas multipolares rostrales experimentan un fuerte incremento en su densidad de espinas dendríticas y un aumento más moderado (significativo o no, según la variable estudiada) de su ramificación dendrítica.

DENSIDAD DENDRÍTICA EN TORNO AL SOMA NEURONAL (APL)

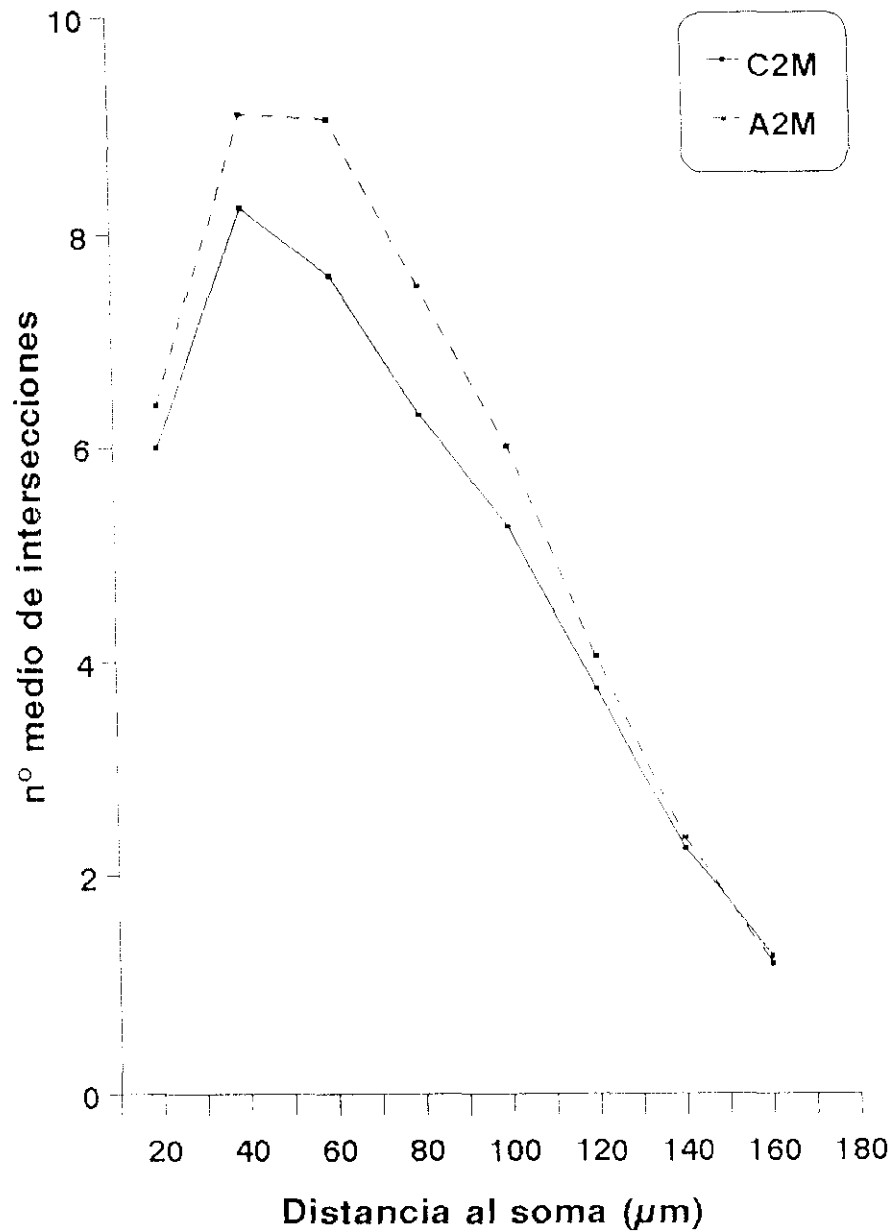


Figura 3.19.- Comparación de la densidad dendrítica en torno al soma neuronal (media±E.E.M.) de las células estudiadas en el APL de la rata, entre el grupo control (C2M) y el criado en aislamiento social (A2M).

Comparación de los datos mediante análisis de varianza de doble vía ($F=2.616$, n.s.). n.s.: diferencias no significativas. (¡¡¡falta por representar en la figura de HG3 el error estándar de cada media!!!). $n=30$ neuronas.

4. DISCUSSION

PLANTEAMIENTO GENERAL.-

De acuerdo con los objetivos expuestos en la Introducción, hemos intentado definir, mediante un abordaje multidisciplinario, las alteraciones morfo-funcionales que una situación de aislamiento social prematuro y prolongado puede provocar en determinados centros del eje límbico-hipotalámico-hipofisario-adrenal (LHHA).

Las características de este sistema son complejas y sus procesos de plasticidad frente a condiciones experimentales requieren un estudio de tipo integrado. Además, debido a que el eje LHHA está constituido por múltiples centros funcionalmente interdependientes es necesario centrar el estudio en aquél o aquéllos niveles que puedan ser más importantes. Esto hace que la bibliografía sea heterogénea en cuanto a los centros estudiados, así como en lo referente a los tipos de situación experimental, lo cual, como vamos a ver, condiciona enormemente los resultados.

Por ello, la Discusión va a desarrollarse según el siguiente esquema:

- En primer lugar se realizará una Discusión parcial por apartados, intentando llegar a conclusiones válidas en cada uno de los bloques de resultados obtenidos con una determinada técnica o respecto a un determinado parámetro.

- Posteriormente, y de forma progresiva, se hará una Discusión global, en la que se integren las conclusiones parciales para llegar a una interpretación conjunta. En esta etapa nos moveremos, en gran parte, a nivel de hipótesis, susceptibles de ser contrastadas en estudios posteriores.

4.1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES.-

Antes de pasar a comentar los resultados obtenidos en parámetros neuroendocrinos, electrofisiológicos o estructurales relacionados directamente con el eje LHHA, vamos a considerar aquéllos otros implicados en ciertas características biológicas de los animales tales como el desarrollo corporal, ingesta, actividad, etc.

4.1.1.- Alteraciones comportamentales.-

El comportamiento y la fisiología del animal adulto están determinados, en parte, por las relaciones sociales que establecen las crías con la madre y los compañeros de camada.

En el caso de mamíferos sociales superiores, como los primates se ha comprobado que la experiencia de la separación prolongada de las madres suele provocar graves alteraciones comportamentales y síntomas de depresión (Harlow, H.F., Zimmermann, R.R. (1959). *Affectional responses in the infant monkey*. *Science* 130:421-432; Harlow y col., 1965 en Kandel; Scott et al., 1973). Existen también evidencias de que la pérdida permanente de los padres durante la infancia provoca graves reacciones depresivas en humanos (Spitz, 1940: en libro Kandel; Heinicke, 1973 en Garzón y col., 1979-21). Aunque los datos son algo contradictorios en rata, parece existir un acuerdo general al considerar que el aislamiento social a lo largo del proceso del desarrollo (antes del destete, o desde el momento del destete) y durante largos períodos de tiempo, provoca importantes alteraciones comportamentales y neuroendocrinas de carácter duradero (Hatch y col., 1963-18; Hatch y col., 1965-17; Baer, 1971-2 de *paperelcisol*; Morgan y col., 1975-40 de *elcisolpap*; Garzón y col., 1979-21; Garzón y del Río, 1981-23; Holson y col., 1988-53) que han sido caracterizadas, en algunos casos, como un "síndrome depresivo" (Garzón y col., 1979-21; Garzón y del Río, 1981-23).

Según el modelo de depresión experimental de Garzón y col. (1979-21), el aislamiento social en ratas durante 9-10 meses desde los 16-18 días de edad, producía un síndrome comportamental caracterizado por la existencia de hiperactividad locomotora en campo abierto y mayor reactividad frente al experimentador, síndrome que podía bloquearse selectivamente mediante la administración de antidepresivos.

Las condiciones experimentales utilizadas en nuestro estudio están basadas en este modelo de Garzón y col. (1979-21), aunque reduciendo la duración del aislamiento social a un período de 2 meses. El motivo de dar por buena esta modificación para nuestros propósitos está en que las

alteraciones comportamentales descritas por estos autores eran detectables ya desde las 6 semanas de aislamiento (Garzón y del Río, 1981-23), aunque el síndrome de hiperactividad locomotora se hacía significativo, permanente y estable a partir de los 10 meses de aislamiento. Además, en otros modelos de aislamiento social que se realizan a partir del destete se encontraba este tipo de alteración a las 6-8 semanas del aislamiento (Weinstock y col., 1978-9; Syme, 1973: en Garzón y col., 1981; Jones y col., ??-48; Koch y Arnold, 1972-60; Morgan y col., 1975-62). Sin embargo, cuando el aislamiento social prolongado se aplica a partir de los dos meses de edad de la rata, no se producen diferencias entre la actividad en campo abierto de ratas control y aisladas (Garzón y del Río, 1981-23). De acuerdo con esto, parece que la inducción del aislamiento en el período crítico pre-destete provoca alteraciones profundas en las estructuras y circuitos cerebrales que se expresan en forma de alteraciones comportamentales pero que, lógicamente, deben ir acompañadas de numerosos cambios en toda una serie de parámetros del eje LHHA objeto de nuestro estudio. Desde este punto de vista, el proceso seguido en este trabajo nos parecía adecuado considerando, por otra parte, la simplificación que suponía un acortamiento tan importante del período de estudio.

Según las observaciones realizadas en nuestro trabajo, los animales aislados presentaban evidentes síntomas de nerviosismo y mayor reactividad cuando eran manipulados por el experimentador, mostrando, además, más actividad locomotora que los animales control cuando se las sometió al ambiente novel que suponía la jaula de pesaje. Esta excesiva reactividad al manejo por parte del experimentador y la hiperactividad en un ambiente novel, han sido encontradas de forma consistente en las ratas criadas en aislamiento social (Hatch et al, 1965; Weinstock y Speiser, 1973; Thoa y col., 1977-51; Einon y Morgan, 1978; Gentsch y col., 1988-54), denominándose a esta situación "síndrome de estrés por aislamiento". Este tipo de desórdenes de actividad se han encontrado también en humanos y parecen deberse, parcialmente, a influencias sociales. Tales cuadros son denominados clínicamente: Desorden de Hiperactividad y Déficit de Atención (Roth y col, 1992: Zeitschrift für Med. Psych.).

Existen varias hipótesis que intentan explicar la base de las alteraciones comportamentales producidas por la cría en aislamiento social. Por una parte, existen interpretaciones como las de Thoa y col. (1977) que basan el incremento de reactividad de los animales aislados en un aumento de la emocionalidad de los mismos. Sin embargo, frente a esta hipótesis, se ha propuesto que la hiperactividad detectada tras el aislamiento social, concretamente en estudios de campo abierto, refleja en realidad una menor reacción de los animales aislados a la novedad del ambiente con menos manifestaciones de miedo o timidez (Gentsch y col, 1988-54; Holson y col., 1988-53). Esto podría representar una "desconcentración" o actividad más dispersa del animal que no facilite, sino que más bien inhiba el reconocimiento adecuado del ambiente y de su posible adversidad (13 de 54-tesis).

En relación con las alteraciones comportamentales descritas en animales aislados, se han encontrado alteraciones neuroquímicas subyacentes como, por ejemplo, en los ciertos sistemas dopaminérgicos (Guisado y col., 1980) y/o serotoninérgicos centrales (Greco y col., 1989). La existencia de estos procesos dá una idea de "plasticidad" a nivel neuroquímico durante el aislamiento, pero los resultados existentes son demasiado parciales como para implicar circuitos concretos en relación con la determinación del comportamiento.

Concluyendo con este apartado puede decirse que, a la vista de nuestros resultados, los animales aislados presentan (desde el punto de vista comportamental) una hiperactividad motora que está de acuerdo con la bibliografía al respecto. Dicho síndrome pensamos que deberá establecerse sobre la base de alteraciones en los procesos de maduración y desarrollo neuronal.

4.1.2.- Peso corporal. Ingesta y consumo de agua.

Una segunda característica analizada en este estudio fué el efecto del aislamiento sobre el desarrollo corporal, la ingesta y el consumo de agua de los animales. El aislamiento social prematuro y prolongado no produjo alteraciones en el peso corporal de los animales, lo cual es

coherente con los resultados de consumo diario de comida y agua, que tampoco varían en los intervalos estudiados en nuestros animales. Por tanto, puede decirse que no se produjeron patrones de crecimiento anormal durante el aislamiento y que tanto el peso corporal como los gramos de pienso y comida ingeridos diariamente estaban en el rango normal para las ratas de esta edad (Hatch y col., 1965; Adell y col., 1990; Armario y col., 1990; Gamallo y col., 1986-300; ¡¡PEDIR VICTOR PUBLICACIONES TABLAS PANLAB!!).

Un aspecto importante a comentar sobre estos resultados es que la dieta de los animales aislados fué suplementada con leche desde el momento del aislamiento (a los 15 días de edad) hasta la época de destete de sus compañeros control (a los 21 días de edad), para evitar problemas de malnutrición y, dentro de lo posible, de diferencia de calidad del alimento ingerido durante este período. Este hecho es relevante para nuestro estudio, ya que se ha comprobado que la ingesta de leche regula los cambios fisiológicos que produce la separación materna en las crías de rata de 2 semanas de edad (Hofer, 1973-43) y puede tener un papel en los efectos de la deprivación materna sobre la respuesta hipofisaria-adrenal al estrés (Stanton y col., 1988:Behav Neurosci 102). Por otra parte, la nutrición, especialmente en fases tempranas del desarrollo tiene efectos sobre el desarrollo neuronal y la sinaptología de determinados centros nerviosos (Salas y col., 1974:en tesis Fernando), por lo cual era importante normalizar al máximo este aspecto en los animales experimentales.

Otro aspecto a tener en cuenta es el hecho de que no hemos realizado el seguimiento de pesos a distintas edades de los animales aislados para no alterar de ningún modo las condiciones experimentales.

Como puede apreciarse en el cuadro 1, no existe homogeneidad en la bibliografía en cuanto a los efectos que provoca el aislamiento social prolongado desde épocas tempranas de la vida sobre el peso corporal del animal adulto. Esta marcada variabilidad entre estudios puede ser atribuida a diferencias de las condiciones experimentales durante el aislamiento en los distintos trabajos. En esta situación puede influir la edad a la que se produce el destete y, consecuentemente, el comienzo del aislamiento, que

oscila entre 21-28 días de edad en la bibliografía consultada.

El aislamiento produce, en la mayoría de los casos, un incremento de ingesta en los animales que puede ir o no asociado con un incremento de peso corporal (Thoa y col, 1977-51; Morgan y col, 1975-62; Morgan y Einon, 1977-267; Morinan y Leonard, 1980-3; Miller y col, 1971-59). La información relativa al consumo de agua es mucho más escasa, de modo que se pueden extraer aún menos conclusiones al respecto.

Dado que la cría en aislamiento social ha sido considerada una situación estresante para el animal (Hatch y col, 1965-17; Baer, 1971-305), hemos incluido en el cuadro, además de resultados de ciertos trabajos de aislamiento, trabajos sobre los efectos de distintos tipos de estrés crónico sobre el peso corporal y la ingesta en roedores, con el fin de comparar las consecuencias de estas situaciones experimentales. Frente a la variabilidad de resultados encontrada en los trabajos de aislamiento social, parece general el efecto negativo que tiene el estrés crónico sobre el peso corporal que, en la mayoría de los casos, está relacionado con una disminución de la ingesta alimenticia. En los casos en los que la ingesta de alimento es similar que en animales control, el incremento de los niveles basales de B que se produce normalmente en estas situaciones de estrés crónico podría ser responsable de la reducción del peso corporal, bien directamente debido a una acción catabólica de los glucocorticoides (Munck y col, 1984-en Meaney y col, 1991; Baxter y Tyrrell, 1987-en Meaney y col, 1991; 36 y 137- de **Van de Kar y col., 1991-7**; Danowski, 1962 en **Hatch y col., (1965-17)**; ¡¡REVISIONES O REFERENCIAS CLASICAS DE EFECTOS GC!!) o bien indirectamente, mediante la inhibición de la secreción de hormona de crecimiento (Wexler, 1980-306¡¡¡MAS!!!).

Integrando todo lo comentado en este apartado y comparando los resultados de aislamiento con los efectos que produce el estrés crónico, la situación estudiada por nosotros parece suponer una alteración experimental "moderada", ya que no tiene efectos sobre variables relacionadas con el desarrollo corporal.

4.1.3.- Manifestaciones patológicas.-

Para concluir este capítulo dedicado a comentar el estado general de los animales durante el período de aislamiento social hay que señalar la existencia, en algunos casos, de ciertas manifestaciones patológicas exclusivamente en el grupo experimental.

Así, pudimos encontrar síntomas de parasitosis externas, ulceración de mucosas, calvas y pelo hirsuto, que determinaban una apariencia enfermiza en algunos animales aislados.

Todo esto, junto con el incremento significativo en el peso del timo de estos animales, podría indicar una situación alterada del sistema inmune.

La ideas de que el estrés, debido a las variaciones que origina en los niveles circulantes de corticosterona, pueda afectar la función inmunitaria fué ya enunciada por Selye (1950), existiendo una abundante bibliografía al respecto que así lo confirma, pero en la cual no vamos a entrar ya que excede los objetivos del presente trabajo.

Sin embargo, teniendo en cuenta la consideración de autores como Stein y col (1985: *J Immunology* 135) o Klein y col. (1992-52) de que el efecto del estrés repetido sobre el sistema inmune depende de la naturaleza, duración e intensidad del estímulo estresante, así como de las características sociales de la especie estudiada, vamos a comentar algunos datos no publicados obtenidos en nuestros mismos animales aislados, dentro de una colaboración con otro equipo de investigación del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Según ellos y como resumen, se puede adelantar que el aislamiento produjo alteraciones en los niveles de inmunoglobulinas, de tal forma que las IgG disminuyen, las IgA aumentan a partir de los 2 meses de aislamiento, mientras que las IgM no varían). Del mismo modo, se han detectado alteraciones en la histología del bazo, etc (Leceta, 1993, comunicación personal). Estos resultados están de acuerdo con alteraciones inmunológicas encontradas en monos ardilla aislados de la madre y de los compañeros de camada, donde la alteración más importante es la disminución

de niveles de IgG a los 7 días del aislamiento, siendo mucho menor la de IgA e IgM. En este caso, los niveles volvían a los valores normales a los 14 días del aislamiento social, sugiriéndose que el efecto de la separación sobre las inmunoglobulinas era transitoria (Coe y col, 1985). Estos resultados, que necesitan un análisis más profundo, apoyan la idea de la existencia de una alteración inmunitaria durante la situación de aislamiento, la cual podría estar mediada, en mayor o menor medida, por los niveles circulantes de corticosterona y, por tanto, quizás sea dependiente de la funcionalidad del eje LHHA.

La conclusión final que se puede obtener de estos tres primeros apartados es que los animales destetados prematuramente (a los 15 días de edad) y aislados durante 60 días, muestran una situación biológica levemente alterada dentro de un cuadro tradicionalmente denominado "síndrome de estrés por aislamiento". Este síndrome debería estar determinado por alteraciones en el funcionamiento del eje HHA que repercutirían en distintos parámetros dependientes del mismo, los cuales son objeto de discusión en los apartados siguientes.

4.2. ACTIVIDAD ADRENOCORTICAL.-

Como hemos comentado anteriormente, la cría en aislamiento social de un animal normalmente gregario, como la rata, produce un síndrome comportamental caracterizado por el incremento de reactividad del animal, incluyendo la aparición de hiperactividad ante la novedad del ambiente. Estas alteraciones comportamentales, junto con la existencia de endocrinopatías, dieron lugar a que se acuñara el término "síndrome de estrés por aislamiento" (Hatch y col., 1963-18; Baer, 1971-305 ¡añadir otros clásicos!!). Sin embargo, la investigación posterior de los aspectos fisiológicos del síndrome de aislamiento no ha conseguido dar validez a este concepto de "estrés", aunque existen evidencias de alteraciones neuroendocrinas, concretamente de la actividad adrenocortical de los animales aislados (Hatch y col., 1965-17; Gamallo y col., 1986-13; Genstch y col., 1981-12 de 54--tesis).

Con el objetivo de analizar si el modelo de aislamiento social utilizado en nuestro trabajo provocaba alteraciones en la actividad adrenocortical de los animales, hemos estudiado:

- los niveles circulantes de corticosterona (B)
- el peso de las glándulas adrenales y del timo,

Ambos tipos de parámetros se utilizan generalmente como indicadores de la función adrenal (Hennessy y Levine, 1978-en Armario y col., 1990-10tesis; Levin y col, 1987; Aguilera y col, 1993; Klein y col, 1992-52;). Por otra parte, también analizamos el peso de los testículos, como indicador de alteraciones en la función gonadal, que resulta suprimida por el estrés (Brain, 1972-6 de 306 de tesis; ¡más referencias clásicas de alteraciones de gónadas por B!!).

La corticosterona plasmática es un producto final de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), de modo que, como se ha descrito en Introducción, la exposición del animal a distintos agentes estresantes provoca la secreción de corticosterona por las glándulas adrenales. El incremento de concentración de B que se produce en plasma, además, un índice muy sensible de la liberación de ACTH (Barrett y Stockham, 1963), todo lo cual hace de la corticosterona un marcador muy sensible de la respuesta al estrés.

En nuestro trabajo, las valoraciones de B se realizaron en dos situaciones fisiológicas diferentes: situación basal y respuesta a 15' de estrés agudo por inmovilización, ya que la actividad basal de eje HHA puede aparecer relativamente normal tras ciertas situaciones experimentales, mientras que puede resultar alterada la respuesta al estrés, que supone una situación fisiológica diferente del eje. Se ha comprobado que las consecuencias comportamentales y fisiológicas a largo plazo de las experiencias sociales tempranas, se expresan con más probabilidad bajo condiciones que implican algún grado de novedad o desafío, situaciones que son estresantes y tienden a provocar reacciones emocionales (Moore, 1968; Plaut y Grotta, 1971). En ausencia de estrés, en cambio, los patrones comportamentales y fisiológicos atribuibles a experiencias sociales tempranas diferentes están probablemente enmascaradas.

Además de los niveles circulantes de corticosterona, los pesos de las glándulas endocrinas pueden suministrar evidencias de estrés crónico en una situación experimental. Así, cuando se somete el eje HHA a una activación prolongada,

el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona resultante provoca involución tímica, incremento en el peso de las cápsulas suprarrenales y supresión de la función reproductora (Selye, 1936-1 de Klein y col, 1992; Brain, 1972-6 de 306 de tesis; Levin y col, 1987; 6-de Scribner y col, 1991-34; Scribner, 1991-34; Klein y col, 1992; Christian, 1971-1 de Rivier y col, 1986).

Por todo ello, resulta conveniente realizar la discusión conjunta de los resultados de los niveles plasmáticos de B y de los pesos de glándulas adrenales y timo, con el fin de obtener una visión de conjunto de los cambios provocados por el aislamiento social en la actividad adrenocortical. Los resultados relativos a los pesos de testículos serán comentados más adelante.

4.2.1. Niveles circulantes de corticosterona. Peso de la glándulas adrenales y timo.

Los niveles circulantes de corticosterona obtenidos en nuestro estudio se encuentran dentro de los rangos descritos en la bibliografía para ratas de esta edad (75 días), tanto en situación basal (Swanson y Simmons, 1989; Greco y col., 1989; Viveros y col., 1988; Meaney y col., 1992, 44D), como en respuesta a 15' de inmovilización (Orr y col., 1990-tesis; Aguilera y col., 1993; **Saavedra y col., 1979-64**). Hay que destacar aquí que existe una gran variabilidad en los niveles basales de corticosterona en plasma descritos en la bibliografía en animales control. Las diferencias entre estudios se pueden explicar, fundamentalmente, por el hecho de que la toma de muestras se realiza en distintas fases del ritmo circadiano. En nuestro trabajo hacemos notar que los niveles basales son los correspondientes a la fase oscura del ritmo circadiano ("luces apagadas"), que corresponde con el período de actividad de la rata, de modo que las concentraciones de B obtenidos son superiores a las descritas en otros trabajos en los que las mediciones se realizan durante la fase diurna (luces encendidas) (**Bartová, 1968-32; Kant y col., 1988; Swanson y Simmons, 1989-28; Aguilera y col., 1993-1**; Yates et al, 1961-en Barrett y Scockham, 1963). Por otra parte, el incremento de los niveles circulantes de corticosterona que se produjo en respuesta al estrés agudo por inmovilización entra dentro del rango correspondiente a

la secreción de corticosterona en respuesta a un estrés moderado (Akana y col., 1988, en Swanson y Simmons, 1989). Nuestros resultados son también coincidentes con los de la bibliografía en cuanto a los pesos relativos de glándulas adrenales y timo en ratas control (Hatch y col., 1965-17; Gamallo y col. 1986-13; Holson y col., 1991-2; Aguilera y col., 1993-1)

Como mostramos en el capítulo de Resultados la cría en aislamiento social desde fases tempranas de la vida de la rata provocó en el animal adulto una disminución de la concentración plasmática de B, tanto en situación basal, como en respuesta a 15' de estrés por inmovilización, siempre en comparación con el grupo criado socialmente. Esta reducción de los niveles circulantes de B indica la existencia de una actividad adrenocortical disminuida en ambas situaciones fisiológicas.

Aunque en los animales aislados no varió significativamente el peso relativo de las glándulas adrenales, el peso del timo de los animales aislados resultó incrementado. Este incremento es coherente con la disminución de concentración de corticosterona en plasma encontrada en los animales aislados ya que, como se ha mencionado anteriormente, las concentraciones de B son importantes en la regulación del peso fresco del timo (Selye, 1936-1 de Klein y col, 1992; Levin y col, 1987; 6-de Scribner y col, 1991-34; Scribner, 1991-34). Estos efectos están relacionados con la existencia de receptores para glucocorticoides en este órgano linfoide (McGimsey y col, (1991-106).

La discusión de estos resultados vamos a hacerla en relación con trabajos previos de aislamiento existentes en la bibliografía, así como con otros trabajos de estrés crónico, en los cuales se manifiestan también alteraciones en la secreción adrenocortical normal. Con ello pretendemos realizar una caracterización lo más completa posible de las alteraciones encontradas en nuestro modelo, así como establecer una interpretación hipotética de los posibles mecanismos a nivel del eje HHA que pueden ser responsables de las mismas.

Como puede apreciarse en el cuadro 2, existe divergencia en los resultados referentes a la actividad adrenocortical basal y en respuesta al estrés en animales sometidos a aislamiento

social a partir del destete. Mientras algunos trabajos encuentran que los niveles basales de corticosterona se incrementan en los animales aislados (Gamallo y col., 1986-13; Wiener y col., 1992-50; Iglesias y col., 1991-47; Greco y col., 1989-15; Greco y col., 1992-305), otros no obtienen diferencias entre el grupo aislado y el control (Gentsch y col., 1981-303; Gentsch y col., 1986-12 de 54 de tesis; Holson y col., 1991-2; Morinan y Leonard, 1980-13; Hatch y col., 1965-17; Viveros y col., 1988-36; Benton y col., 1978-306; Iglesias y col., 1991-47; Plaut y Grotta, 1971-19; Irwin y col., 1986-20). Por último, y de un modo acorde con nuestros resultados, también existen trabajos que detectan disminución de los niveles circulantes de corticosterona (Brain y Nowell, 1971-9 de 306; 24 y 31 de Holson y col., 1988-53). ¿Cómo puede explicarse esta variabilidad de resultados?. **Holson y col. (1988-53)** comentan un factor importante a considerar; en su trabajo ellos detectan una disminución de los niveles basales de B (de 100ng/ml en controles a unos 70 ng/ml en aislados) en la fase diurna, aunque sin alcanzar la significación estadística, y sugieren que esta tendencia diurna podría traducirse en diferencias más evidentes durante la fase oscura del ritmo circadiano. Por tanto, cabe pensar que aquéllos trabajos que no detectan variaciones en los niveles basales de B en fase diurna, sí podrían detectarlos en forma de disminución durante la fase oscura, del mismo modo que lo obtenido en este trabajo.

En cambio, el aislamiento social no afecta, en general, el peso de las glándulas adrenales. De acuerdo con ello, nosotros tampoco obtuvimos variaciones en los pesos de las adrenales de los animales aislados, lo cual indica que las alteraciones causadas por el aislamiento en la actividad adrenocortical no han sido demasiado graves, ya que no se ha producido hipertrofia ni atrofia en estas glándulas endocrinas.

Por otra parte, ya se ha comentado anteriormente que el timo es un órgano muy sensible a las alteraciones de los niveles circulantes de B, de modo que resulta coherente que, tal y como se muestra en el cuadro 2, los trabajos que obtienen alteraciones en la concentración plasmática basal de B tras el aislamiento, detecten, a su vez, cambios inversamente proporcionales en el peso del timo.

En cuanto al efecto que el aislamiento social produce sobre

la respuesta adrenocortical al estrés, éste parece ser más intenso que sobre los niveles basales de B (ver cuadro 2), lo cual parece deberse a que las alteraciones sociales tempranas provocan cambios funcionales que se hacen más patentes bajo condiciones que implican algún grado de desafío para el animal (Plaut y Grotta, 1971), como ya ha sido comentado anteriormente.

De nuevo, el efecto del aislamiento social sobre la respuesta adrenocortical al estrés, aunque más homogéneo que sobre los niveles basales de B, es distinto en los diferentes trabajos. Así, mientras existen algunos trabajos que encuentran un incremento de respuesta en los animales aislados (Holson y col., 1991-2; Suomi, 1991-40; ¿¿¿Moore, 1968, ¡¡BUSCAR!!??), otros autores, de acuerdo con nuestros resultados, observan que la respuesta adrenocortical al estrés se ve reducida (Gentsch y col, 1981-303; Gentsch y col, 1986-12 de 54-tesis; Viveros y col, 1992-50; Brain y Nowell, 1971-9 de 306; Plaut y Grotta, 1971-19). Por último, también existen evidencias de que el aislamiento social no provoca cambios en la respuesta al estrés (Holson y col., 1991-2; Irwin y col, 1986-20).

Es interesante precisar que pueden haber existido diferencias en las condiciones experimentales durante el aislamiento social que expliquen la gran variabilidad de resultados constatada. En este sentido, hemos encontrado tres elementos que pueden ser especialmente determinantes: a) el nivel de estímulos sensoriales recibidos y procesados por el animal aislado, b) la duración del aislamiento social y c) la edad a la que se inducía dicho aislamiento.

a) En cuanto a la estimulación sensorial durante el aislamiento, en el cuadro 2 hemos incluido indicaciones acerca de las experiencias visuales, auditivas y olfatorias que han tenido los animales aislados con los demás animales de la colonia, así como el contacto con el experimentador (que se produce, normalmente, durante la limpieza de las jaulas). Considerando que pueden existir diferencias drásticas entre los distintos estudios en relación con estas condiciones de aislamiento, podrían producirse varios tipos de "síndrome por aislamiento" con características distintas. Así, el denominado "estrés por aislamiento" (Hatch y col, 1963-18; Baer, 1971-305;!!!!!!+++!!), caracterizado por una mayor reactividad del animal aislado a los estímulos estresantes, se correspondería con unas condiciones de cría en aislamiento social con una reducción drástica de estímulos

sensoriales. Cuando se ha reproducido este mismo modelo, se ha encontrado hipersecreción de B en respuesta a estímulos estresantes (Holson y col, 1991-2). Sin embargo, en los modelos de aislamiento en los que la manipulación de los animales por el experimentador es normal, o bien no se altera la respuesta adrenocortical del animal al estrés (Holson y col., 1991-2; Irwin y col, 1986-20), o bien se produce una reducción de la misma (Gentsch y col, 1986-12 de 54 tesis; Viveros y col, 1988-36; Plaut y Grotta, 1971-19). Este último es el caso de nuestros resultados.

En este sentido, existen evidencias experimentales que demuestran que la manipulación de los animales por el experimentador desde épocas tempranas de su vida modula la respuesta del sistema hipófisis-adrenal al estrés en el adulto, reduciendo la reactividad de los animales a los estímulos estresantes (Meaney y col., 1989-55).

b) En cuanto al factor duración del período de aislamiento social, es especialmente ilustrativo el trabajo de Iglesias y col. (1991), que encuentra un incremento en los niveles circulantes de B cuando se aíslan ratas juveniles durante 20 días, mientras que si se prolonga el aislamiento (40-45 días) las diferencias con el grupo control desaparecen. Sugieren, por tanto, que el aislamiento es un agente estresante que provoca un incremento en la función adrenal cuando la exposición es corta, pero que en exposiciones prolongadas provoca un fenómeno de "habitación" (término que volveremos a comentar más adelante) a dicho estrés.

Como puede verse, las duraciones de los modelos de aislamiento recogidos en el cuadro 2 son generalmente extensas, de modo que la hipótesis de Iglesias y col (1991) podría ser perfectamente aplicada para interpretar los resultados recogidos en él, así como los de nuestro trabajo.

c) El tercer factor que puede intervenir en la determinación de los diferentes efectos de los diferentes estudios de aislamiento es el momento de la vida del animal en el que se inicia el aislamiento social. Es interesante destacar aquí que el modelo de aislamiento social utilizado en nuestro trabajo se desarrolla desde una fase previa al destete (a los 15 días de edad), mientras que los demás trabajos estudian los efectos del aislamiento desde el destete o en fase adulta. Se ha comprobado que la época previa al destete es una etapa de la vida de la rata

especialmente sensible al aislamiento social (concretamente entre los días 17-18 postnatales), de modo que las consecuencias del mismo se reducen mucho cuando se produce a partir de los 20-21 días de edad (Yates y col., 1991-268). Parte de la gran sensibilidad de las crías al aislamiento durante esta etapa previa al destete (16-18 días de edad) radica en que en estos momentos están asumiendo la responsabilidad principal en el mantenimiento del contacto con la madre, de modo que la deprivación materna, además de la separación de los compañeros de camada, es altamente estresante para los animales. Por tanto, hay que tener en cuenta que cuando el aislamiento social se desarrolla desde esta fase pre-destete aparece un nuevo factor, el factor "deprivación materna", que no aparece en los modelos de aislamiento que se desarrollan a partir del destete.

Se ha visto que la deprivación materna (sumada o no al aislamiento de los compañeros de camada) durante cortos períodos de tiempo en ratas de 14-18 días provoca una elevación de los niveles plasmáticos de B (Takahashi y col., 1991-46; Hennessy y Weinberg, 1990; Rosenfeld y col., 1991-58; Stanton y Levine, 1988-27). Esta activación de la secreción adrenocortical se está produciendo en unos momentos en que el sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal está en desarrollo (Bartová, 1968; Vázquez y Akil, 1992), de modo que puede provocar cambios a distintos niveles del eje si se mantiene la sobreestimulación del sistema. De hecho, se ha comprobado que cuando se mantienen elevados los niveles plasmáticos de B de las crías de rata desde el nacimiento al destete, se producen unas alteraciones equivalentes a las obtenidas por nosotros en la actividad adrenocortical, consistentes en unos niveles basales de B plasma disminuidos cuando los animales tienen 75 días de edad, además de que se reduce también la secreción de corticosterona en respuesta al estrés (Benesová y Pavlík, 1989-42).

Considerando todo lo anterior, podemos pensar que las alteraciones producidas por la situación de aislamiento utilizada en nuestro estudio podrían ser diferentes cualitativa y cuantitativamente si el destete no hubiera sido prematuro, debido al diferente estado de maduración y de sensibilidad en que se encontraría el sistema estudiado. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que el sistema HHA en desarrollo está fuertemente sujeto a la regulación materna (Stanton y col., 1988-26), de manera que la deprivación de la

madre sufrida por nuestros animales, combinada con el aislamiento social prolongado, sería responsable del conjunto de alteraciones que estamos comentando.

En resumen, puede decirse que el aislamiento social prematuro y prolongado utilizado en esta tesis provoca una disminución de la actividad adrenocortical, reflejada tanto en la disminución de los niveles basales de B (acompañada de un aumento paralelo del peso del timo), como en la menor secreción de B en respuesta a estrés por 15' de inmovilización. La hipótesis explicativa que planteamos es que estas alteraciones de la función adrenocortical son el resultado de la alteración del eje HHA en desarrollo debido, por una parte, a la deprivación materna que supone el destete prematuro y, por otra parte, a la cría en aislamiento social hasta los 75 días de edad de la rata.

A continuación, vamos a discutir nuestros resultados a la luz de algunos ejemplos experimentales de estrés crónico (situación ésta que afecta la actividad adrenocortical normal del individuo) ya que, aunque de naturaleza diferente, pueden resultar ilustrativos para interpretar mejor los mecanismos subyacentes a los cambios encontrados en animales aislados. Según los ejemplos recogidos en el cuadro 3, las alteraciones que producen las distintas situaciones experimentales parecen más homogéneas que las encontradas en los modelos de aislamiento social anteriormente comentados. Quizás el motivo sea que las manipulaciones experimentales se realizan principalmente en individuos adultos.

La exposición constante o repetida a un estímulo estresante en estos casos provoca, en general, un incremento de los niveles basales de B, acompañado de involución tímica y reducción del peso corporal, así como una mayor secreción de B en respuesta a estrés agudo. Estos tipos de cambios se han considerado indicadores clásicos de las situaciones de estrés crónico, y reflejan una "hiperactividad" del sistema hipofisario-adrenal en situación basal, así como una "sensibilización" ante los estímulos estresantes (Scribner y col., 1991-34; Armario y col., 1988-38; Pittman y col, 1990-3; De Goeij y col, 1992-126)

Sin embargo, existen otros trabajos cuya interpretación no coincide con la anterior. Así, en el cuadro 3 encontramos también evidencias de que la repetición de un estrés agudo

provoca "habituaación" o "adaptación" del eje HHA al estímulo, provocando que los niveles basales de B vuelvan a los valores control tras un cierto período de tiempo de exposición al estrés (Hashimoto y col., 1988; Kant y col., 1985; Spencer y McEwen, 1990..todos en Harbuz y Lightman, 1992-24). La habituación parece ser específica del agente estresante repetido, de modo que aunque no existe respuesta al mismo estímulo, situaciones de estrés agudo diferentes pueden provocar una respuesta normal (Spencer y McEwen, 1990; Kant y col., 1985) o incluso incrementada respecto de los animales control (Hashimoto y col., 1988).

La manifestación de un fenómeno de sensibilización o de habituación a un estímulo estresante depende fundamentalmente de los siguientes factores: a) la intensidad del estímulo estresante que se aplica crónicamente, de tal forma que a mayor intensidad del estímulo se dá una menor magnitud de habituación (Pittman y col, 1990-3) y una mayor magnitud de sensibilización (Orr y col., 1990-tesis); b) la frecuencia y duración de la exposición al estímulo: así, cuando el animal vive continuamente en exposición a un agente estresante, se produce una habituación completa, volviendo su actividad adrenocortical a los niveles pre-estrés (Mason, 1972: en Pittman y col, 1990-3). Todo lo expuesto hasta aquí corrobora parte de lo ya propuesto por Thompson and Spencer (1966: en Pittman y col., 1990-3) en el sentido de que "la exposición frecuente a un estímulo estresante de baja intensidad suele provocar habituación al estímulo, mientras que la exposición poco frecuente a un estímulo de gran intensidad suele provocar una sensibilidad exagerada al mismo, así como a otros estímulos estresantes".

Como hemos visto, el tipo de aislamiento social utilizado por nosotros provocaba una actividad adrenocortical disminuida en situación basal así como una capacidad disminuida del eje HHA para responder al estrés agudo. Esta hipoactividad podría deberse al fenómeno descrito de "habituaación" o más bien a una "desensibilización" del sistema HHA ante la exposición permanente y prolongada al aislamiento, que constituye un estímulo estresante de baja intensidad. Esta desensibilización se produciría tanto frente al aislamiento, de manera que explicaría la disminución de los niveles basales de B en plasma, como frente a estímulos estresantes diferentes, reduciendo, por tanto, la secreción de B en

respuesta a los 15' de inmovilización. Los animales aislados resultan ser, por tanto, menos reactivos a los estímulos aversivos o estresantes.

Como ya hemos indicado, consideramos que estas alteraciones no se deben exclusivamente a la exposición prolongada de los animales al aislamiento como factor estresante, sino también a la carencia de estímulos sociales y sensoriales que son necesarios para la maduración de respuestas adaptativas normales frente a situaciones nuevas o estresantes a las que se ve sometido el individuo (Koch y Arnold, 1972-60).

En este sentido, el hipoadrenocorticismo encontrado tendría sus ventajas adaptativas frente al hiperadrenocorticismo mantenido, el cual supone un "alto precio" patofisiológico, originando: inmunosupresión, atrofia muscular, osteoporosis/hipercalcemia, hiperglicemia/hiperlipidemia, diabetes esteroide, etc. (Baxter y Tyrrell, 1987-en Meaney y col, 1991; 8,10 de Sapolsky y col., 1986-45). Sin embargo, las alteraciones observadas el modelo de aislamiento social utilizado por nosotros son, dentro de lo que cabe, de carácter moderado, como queda indicado por la ausencia de efectos sobre el peso corporal, la ingesta, el consumo de agua y el peso de las glándulas adrenales y testículos, como ocurre también en casos de estrés crónico suave (Adell y col., 1990; Alario y col, 1987).

Por otra parte, a la vista de nuestros resultados, la alteración en la actividad adrenocortical no parece repercutir de un modo drástico en la función gonadal de los animales aislados, al menos teniendo en cuenta que el peso de los testículos no varía. La actividad del eje hipotálamo-hipófisis gonadal y la función reproductora resultan generalmente suprimidas por estrés, constatándose un descenso en el peso de los testículos (Rivier y col., 1986: Science 231; Benesová y Pavlík; más referencias clásicas de introducción), habiéndose encontrado alteraciones de pautas comportamentales sexuales en machos aislados desde el destete (Viveros y Hernández, 1989). Sin embargo, también en este caso existen datos contradictorios en la bibliografía, existiendo trabajos que no observan alteraciones en el eje HHG tras estrés crónico (Armario y col., 1988: Biology Psychiatry 24, pg. 447-450) ni en el peso de testículos tras la cría de los animales en aislamiento social (Morinan y Leonard, 1980-3; Hatch y col., 1965-17). Nuestros resultados al respecto vuelven a apuntar hacia la existencia de una

alteración moderada y, por tanto, apoyan la idea propuesta de una adaptación frente a la situación estresante prolongada. La disminución en la actividad adrenocortical debe implicar la existencia de alteraciones a distintos niveles del eje HHA. Dentro de ellas, hemos centrado nuestro estudio a niveles centrales del eje estudiando, como se ha expuesto previamente, ciertos centros del sistema límbico-hipotálamo-hipofisario implicados en el control de la secreción adrenocortical.

4.3. EFECTO DEL AISLAMIENTO SOCIAL SOBRE PÉPTIDOS HIPOTALÁMICOS E HIPOFISARIOS REGULADORES DE LA SECRECIÓN ADRENOCORTICAL.-

En el apartado anterior de la discusión vimos cómo el aislamiento social desde una fase previa al destete y prolongado hasta los 75 días de edad de la rata provocaba una actividad adrenocortical disminuida en los animales, indicando que se podría haber un fenómeno de "desensibilización" ante los estímulos aversivos.

Los cambios que se producen en los niveles circulantes de glucocorticoides no nos permiten, sin embargo, extraer una información concluyente en relación con las alteraciones que experimenta el sistema hipotálamo-hipofisario-adrenal en su conjunto. Esto se debe a que los parámetros periféricos pueden estar determinados por cambios diversos en distintos niveles que, además, pueden responder a patrones de alteración diferentes.

Nuestro objetivo, por tanto, fué estudiar a continuación las alteraciones neuroquímicas que podía haber provocado el aislamiento social a niveles centrales del eje HHA, concretamente sobre la funcionalidad del complejo hipotálamo-hipófisis. Para ello se realizó, como ya se vió en Resultados, el estudio inmunocitoquímico de péptidos implicados en el control de la secreción adrenocortical: la hormona corticotropa (ACTH) en hipófisis y neuropéptidos hipotalámicos secretagogos de la ACTH (CRH, AVP, OT). Con el fin de caracterizar el patrón de las alteraciones causadas en la actividad hipotálamo-hipofisaria por la privación social, no sólo estudiamos los efectos sobre la actividad

basal del eje (que puede aparecer relativamente normal tras ciertas situaciones experimentales), sino que completamos los estudios analizando su patrón de respuesta a un estrés agudo, que constituye una situación fisiológica diferente del eje.

Antes de comenzar la discusión de nuestros resultados en este capítulo hay que recordar el cuadro funcional general del eje HHA desarrollado en el capítulo de Introducción (páginas..., figuras...). en el cual se refleja que la exposición a un estímulo estresante provoca la activación del sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal. Esta activación provoca cambios dinámicos en el contenido hipotalámico de CRH, AVP y OT, así como en el contenido de ACTH en la hipófisis, que son diferentes según el tipo de estrés aplicado (ver revisión de Harbuz y Lightman, 1992-24), lo cual indica que la respuesta al estrés agudo del sistema hipotálamo-hipofisario es realmente específica del agente estresante aplicado. Los cambios o alteraciones que se producen en este complejo son aún más heterogéneos cuando el animal se expone de forma crónica al estímulo estresante, como trataremos más adelante. Para cerrar esta breve introducción, recordaremos que el eje HHA presenta también ciertos mecanismos de autoregulación que evitan el riesgo de la exposición continuada del organismo a niveles elevados de glucocorticoides. El más importante de ellos es la propia capacidad de los glucocorticoides circulantes de inhibir la liberación subsiguiente de ACTH como respuesta al estrés, mediante el efecto de retroalimentación negativa que ejercen a nivel de hipófisis e hipotálamo (ver figura 1), así como a nivel de ciertas estructuras cerebrales extrahipotalámicas (*Rivier y col., 1982-101; Plotsky et al., 1986; Dallman et al., 1987; Van Loon and De Souza, 1987; sobre hipocampo: *Herman y col., 1990).

La discusión de nuestros resultados inmunocitoquímicos se va a realizar en dos bloques separados, debido a la diferente localización anatómica y papel funcional de los péptidos estudiados dentro del complejo hipotálamo-hipófisis: por una parte analizaremos los resultados de ACTH en hipófisis y, por otra, los de sus secretagogos hipotalámicos: CRH, AVP y OT.

2.- Inmunomarcaje para la ACTH en hipófisis.-

Como se ha expuesto en la Introducción, la ACTH es una hormona proteica con una cadena única de 39 aminoácidos que se encuentra en pars distalis de la hipófisis (Li y col., 1955:232 de Page, 1988-77; Eipper y Mains, 1977:282 de Page, 1988) y cuya síntesis y liberación por los corticotropos hipofisarios es estimulada por el CRH hipotalámico y por otros secretagogos que llegan a la hipófisis vía circulación portal (Vale y col., 1981:clásico; Rivier y col., 1982). También se ha encontrado una forma más corta de la hormona: el ACTH(17-39), localizada en la pars intermedia de la hipófisis de rata, conejo, cerdo y vaca (en revisión de Page, 1988-77), aunque aparece en menor concentración que la anterior.

Esta última forma del ACTH no fué detectada en nuestras preparaciones, ya que el antisuero utilizado por nosotros en el estudio inmunocitoquímico reconocía el fragmento 1-24 de la molécula del ACTH, por lo que sólo se apreció inmunorreacción en las células de la pars distalis y no en las de la pars intermedia de la hipófisis.

2.1.- Distribución de la inmunoreactividad para ACTH en animales control.-

* Situación basal.- Las células inmunopositivas para ACTH eran heterogéneas en cuanto a tamaño y morfología, aunque en situación basal la mayoría de células inmunoreactivas presentaban una morfología estrellada, con gránulos inmunopositivos localizados periféricamente en el citoplasma, existiendo también algunas células de morfología poliédrica, de acuerdo con descripciones previas de otros autores en hipófisis de rata (Siperstein, E.R. and Allison, V.F., 1965 nº 1 de ref. 71; Childs, G.V., 1991-86; Halmi y Moriarty, 1982-75; Yoshimura and Nogami, 1980-74). Las células ACTH-positivas aparecen formando grupos esparcidos en varias zonas a través de la glándula y deben su forma estrellada a la extensión de los procesos citoplásmicos entre las células vecinas (Yoshimura and Nogami, 1980-74).

* Respuesta al estrés por inmovilización.- Tras 15' de estrés por inmovilización se produjo un incremento apreciable de células inmunoreactivas para la corticotropina tanto en la adenohipófisis de ratas control como de ratas aisladas. La respuesta al estrés se caracterizó también por una mayor intensidad y extensión del

área celular inmunoreactiva. Nuestros resultados concuerdan con los cambios que se producen como consecuencia de la exposición a otros tipos de estrés agudo como, por ejemplo, la novedad del ambiente o el frío (Sasaki y col., 1990-87) o como consecuencia de la estimulación de los corticotropos por CRH (Westlund y col., 1985-149), suministrando una evidencia morfológica de que las tasas de síntesis y almacenamiento de ACTH se incrementaron durante la exposición al estrés, lo que permite concluir que las células corticotropas estaban activadas. Estudios de hibridación "in situ" han corroborado que, efectivamente, se produce un incremento de síntesis de ACTH en los corticotropos hipofisarios tras 15'-30' de exposición a estrés agudo, que se refleja en el incremento de células que presentan mRNA para proopiomelanocortina (POMC), la molécula precursora del ACTH (Wu y Childs, 1991-88; Shiomi y akil, 1982-100).

Además de estas consideraciones, es interesante destacar que según diversos autores la inmovilización del animal durante 15' produce un incremento de los niveles circulantes de B y ACTH (Orr y col., 1990-35; De Goeij y col., 1991-118; Haas y George, 1988-151; Tizabi y Aguilera, 1992-157), lo cual indica que en esos momentos se está produciendo también secreción de ACTH a plasma desde los corticotropos hipofisarios. Este dato puede aplicarse a nuestros animales, ya que el incremento de niveles circulantes de ACTH se produce de forma generalizada a partir de 2' de inmovilización (De Souza Y Van Loon, 1985-102; De Goeij y col., 1991-118; Gibbs, 1984-120), alcanzándose los niveles máximos entre 10-60' (De Goeij y col., 1991-118).

2.2.- Efectos del aislamiento social sobre la inmunorreactividad para ACTH:

* En situación BASAL, no se apreciaron diferencias entre animales aislados y control en cuanto al inmunomarcaje para ACTH en la pars distalis de la hipófisis. Existen algunos datos previos que indican que el estrés social crónico de intensidad relativamente baja no produce cambios evidentes en la hipófisis de los animales; por ejemplo, el estrés por hacinamiento durante 1 año no provoca cambios de peso en la hipófisis, ni en la morfología de las células hipofisarias, ni tampoco en la proporción de tipos celulares (Komitowski y col., 1988-68). Nuestras observaciones están, pues, de acuerdo con este tipo de

resultados.

* El aislamiento social, en cambio, sí provocó alteraciones en la respuesta de los corticotropos hipofisarios al ESTRÉS agudo, de manera que en las ratas aisladas se produjo un menor incremento de células inmunorreactivas para ACTH que en los correspondientes animales control. Este resultado apoya la hipótesis propuesta en el apartado anterior de que existe una "desensibilización" del eje HHA ante los estímulos estresantes, que produce una menor respuesta de los corticotropos hipofisarios al estrés agudo en los animales aislados.

El hecho de que el aislamiento provoque alteraciones en la respuesta de los corticotropos hipofisarios al estrés sin que existan cambios en el contenido basal de ACTH no es sorprendente. Ya que, tal como se ha comentado en el apartado anterior de la discusión, las alteraciones fisiológicas y comportamentales producidas por experiencias sociales anormales durante una época temprana de la vida del animal se expresan con más probabilidad bajo condiciones que implican algún grado de novedad o desafío (Plaut y Grotta, 1971). En ausencia de estrés, en cambio, las alteraciones provocadas en sistemas fisiológicos por este tipo de situaciones tempranas están probablemente enmascaradas.

Cuando nos planteamos el análisis comparativo de nuestros resultados con los de otros trabajos de aislamiento social nos encontramos con el problema de la escasez de este tipo de estudios a niveles centrales del eje HHA. Por otra parte, los resultados de los escasos trabajos existentes no son homogéneos, por una parte debido a las diferencias de diseño de los modelos de aislamiento (distinta duración y momento del aislamiento) y, por otra, a la distinta metodología utilizada para el análisis del contenido de los péptidos derivados de la POMC hipofisaria.

Así, en contraposición con nuestros resultados, Holson y col (1988) han encontrado mediante radioinmunoensayo que el contenido basal de ciertos péptidos derivados de la POMC, como la β -endorfina, están disminuidos en la hipófisis de animales aislados desde el destete hasta la edad adulta, sin que se estudien los efectos sobre la respuesta al estrés. Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse, en este caso, a la distinta técnica de estudio utilizada, ya que en caso de haberse producido pequeños cambios de contenido basal

de ACTH en las hipófisis de nuestros animales aislados, quizás éstos no podrían haberse detectado mediante la técnica inmunocitoquímica utilizada.

Sin embargo, las diferencias pueden ser debidas también al distinto momento de la vida del animal en el que se produce el aislamiento: época pre-destete (15 días de edad) en nuestro trabajo, y desde el destete (21 días de edad) en el de Holson y col (1988). En este sentido, y en relación con este factor, Vázquez y Akil (1992-94) han estudiado los diferentes efectos que produce el aislamiento crónico intermitente en ratas de 14 y 21 días de edad sobre el contenido de ACTH y del mRNA para POMC, su molécula precursora, en el lóbulo anterior de la hipófisis. En ratas de 21 días de edad este aislamiento produce una disminución tanto del contenido basal de ACTH como del mRNA para POMC en hipófisis. Sin embargo, en ratas de 14 días no se producen alteraciones, lo cual concuerda con nuestros resultados inmunocitoquímicos en situación basal. Parece, por tanto, que la magnitud de las alteraciones que provoca el aislamiento crónico en hipófisis variaría con la edad del animal, ya que al estar madurando el sistema HHA durante este período temprano de la vida, el patrón y la magnitud del daño que se produce puede ser diferente en muchos aspectos y, por tanto, difícil de comparar entre distintos trabajos. De nuevo, en el trabajo de Vázquez y Akil (1992-24) no aparece información relativa a posibles cambios en la respuesta del sistema corticotropo hipofisario al estrés en los animales aislados, aunque sí pone de manifiesto la importancia del factor "maduración cerebral" en la determinación de las consecuencias funcionales del aislamiento temprano.

Vamos a pasar a comparar a continuación nuestros resultados con aquéllos obtenidos en una serie de modelos de estrés crónico, ya que en ellos podremos encontrar más información relativa a las alteraciones que produce la exposición repetida o continuada a un agente estresante a nivel hipofisario, así como sobre los mecanismos subyacentes a dichas alteraciones.

En general, parece que distintos tipos de estrés crónico provocan un incremento del contenido basal de ACTH (y de otros péptidos derivados de POMC), así como del mRNA que codifica para POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis (ver revisión de Harbuz y Lightman, 1992-24). Este es el caso del

estrés crónico por choque eléctrico, por restricción o por frío (Höllt y col, 1986-99; Daniel-Severs y col, 1973; en Harbuz y Lightman, 1992-24; Hashimoto y col., 1988-en 24 tesis; Young y Akil, 1985-103). Sin embargo, esta tendencia no es homogénea en todos los tipos de estrés crónico aplicados. Así, por ejemplo, se ha descrito que tras estrés crónico de régimen variable el contenido basal de ACTH no sufre alteraciones en las hipófisis de los animales (Chappell y col, 1986-147).

Algunos de estos trabajos han sido comentados en el apartado anterior de discusión como ejemplos del fenómeno de "habitación" del eje HHA frente a la exposición crónica a los estímulos estresantes, fenómeno caracterizado por el retorno de los niveles circulantes de glucocorticoides de los animales sometidos a estrés crónico a las concentraciones basales de los animales control (ver revisión de Harbuz y Lightman, 1992-24). Si tenemos en cuenta que en las hipófisis de estos animales se produce un incremento del contenido de ACTH y de mRNA para POMC, parece que, efectivamente, los niveles circulantes de B no son un buen indicador del status neuroendocrino del animal sometido a estrés crónico.

Existen evidencias de que ciertos tipos de estrés crónico también producen alteraciones en la respuesta de los corticotropos hipofisarios frente al estrés agudo. Concretamente en el trabajo de Young y Akil (1985-103), las ratas sometidas a estrés crónico por choque eléctrico experimentan un aumento de contenido de ACTH en el lóbulo anterior de la hipófisis, tanto en situación basal, como en respuesta a estrés agudo, siempre comparando con los animales control.

De un modo general, las alteraciones producidas por el estrés crónico parecen, en principio, opuestas a las que produce el aislamiento sobre el contenido de ACTH y de mRNA para POMC en hipófisis, según lo expuesto anteriormente en nuestros resultados, así como en los trabajos de Vázquez y Akil (1992-94) y de Holson y col (1988). En este sentido, consideramos que hay tres factores que pueden ser claves en la determinación concreta de los cambios que tienen lugar: a) el tipo y el grado de severidad del factor estresante, b) la duración y c) la edad del animal que lo experimenta. Respecto al primer elemento, se ha comprobado que el incremento de mRNA para POMC que se produce en corticotropos hipofisarios es menor cuando el estrés que se aplica al animal es más

débil (Wu y Childs, 1991-88). De acuerdo con ello, es lógico pensar que el aislamiento social, con su carácter complejo pero relativamente moderado, puede haber provocado un patrón de alteración característico a nivel de la hipófisis, que no se produce en otras situaciones estresantes más drásticas. Un punto interesante a resaltar es que en el modelo de aislamiento social que hemos utilizado los patrones de alteración de los niveles circulantes de B y del contenido de ACTH en hipófisis parecen ser coherentes, demodo que apuntan hacia una hipofuncionalidad del sistema HHA tanto a nivel hipofisario como periférico, que se hace más evidente cuando el sistema se ve retado por una situación de estrés. En esto parece seguir siendo fundamentada nuestra hipótesis de "desensibilización" del eje HHA ante los estímulos estresantes.

Además de la naturaleza y severidad del estrés, están los otros dos factores antes mencionados, que pueden ser determinantes de los cambios encontrados: la prolongada duración de nuestro modelo de aislamiento social, y la época temprana de la vida del animal en la que se lleva a cabo el destete y el aislamiento consiguiente. Es evidente que en nuestro estudio se ha producido una interferencia compleja en los procesos normales de MADURACIÓN de los corticotropos hipofisarios, punto éste que vamos a comentar detenidamente. El contenido de ACTH en hipófisis de rata aumenta desde el nacimiento, produciéndose un fuerte incremento entre la segunda y la quinta semana de vida, momento en el que alcanza niveles próximos a los de adulto (Bartová, 1968; Noel y Mains, 1991-89). Este incremento en el contenido hipofisario de ACTH en rata se debe, de acuerdo con la bibliografía, al menos a dos mecanismos:

1) Durante el desarrollo postnatal se produce un aumento en el procesamiento de la molécula precursora del ACTH: la proopiomelanocortina (POMC) y un cambio en la naturaleza de los productos finales de escisión. El mantenimiento de un alto porcentaje de material precursor (POMC) hasta la quinta semana de vida postnatal sugiere que los principales mecanismos de procesamiento proteolítico de POMC se desarrollan durante un largo período de tiempo durante el cual el contenido celular de los péptidos derivados de POMC se mantiene a niveles bajos (Noel y Mains, 1991-89; Sato y Mains, 1985-69).

Por lo tanto, el aislamiento social puede haber provocado

alteraciones en el proceso normal de maduración de los mecanismos de procesamiento proteolítico de POMC, de modo que cuando los corticotropos son activados por el estrés, se manifiesta una deficiencia en la producción de ACTH, que no se aprecia en situación basal.

2) Se produce un incremento de contenido de corticotropos en el lóbulo anterior de la hipófisis (Sato y Mains, 1985-69), además de que existe un proceso de selección de los mismos.

Durante el desarrollo postnatal se están produciendo cambios, no sólo en la cantidad de células que contienen ACTH, sino también en el tipo de corticotropo que madura. En este sentido, en el lóbulo anterior de la hipófisis de rata en desarrollo se han descrito corticotropos de contenido multihormonal, habiéndose demostrado, por ejemplo, almacenamiento conjunto de ACTH y TSH (Kawarai, 1980-en 86 de tesis; Childs y col., 1989-en 86 de tesis), así como de ACTH y gonadotropinas (FSH y LH) (Childs y col., 1982-71; Yoshimura y Nogami, 1980-74). Estas observaciones, sin embargo, se vuelven minoritarias en el animal adulto (ver revisión de Childs, 1991-86). Es posible que estas células de contenido multihormonal sean células "tronco", y por tanto más abundantes durante el desarrollo que en el animal adulto. **Childs y col. (1982-71)** encontraron abundancia de células corticotropas que almacenan ACTH y gonadotropinas (FSH y LH) durante el desarrollo postnatal y sugirieron que esta forma de célula tronco podría diferenciarse, según las necesidades del animal, en corticotrópica o gonadotrópica. Según Lorenzen y col. (34 de 71-tesis) existe una especie de "competición" a nivel hipofisario para mantener la funcionalidad del sistema hipófisis-adrenal o el hipófisis-gonadal, que según Childs y col (1982-71) se produciría a nivel la célula que almacena ACTH y gonadotropinas, célula que tras manipulaciones experimentales como la ADX y castración, elige preferentemente sostener el eje hipófisis-adrenal.

Debido a que el aislamiento social se produce prematuramente, durante una fase crítica del desarrollo del animal, cabe pensar en que se está afectando el proceso de diferenciación de estas células corticotropas "tronco" en un tipo hormonal concreto (p.e. en gonadotropo o corticotropo) y, por tanto, alterando de alguna forma la población de corticotropos que responderán al estrés en el adulto.

De una manera u otra, nos encontramos con la situación de que en nuestros animales no se detectan alteraciones en el contenido basal de ACTH y sí una respuesta disminuida de los corticotropos frente a un estrés agudo. ¿Cómo puede explicarse este hecho?. Se ha descrito que la exposición a un estímulo estresante durante 15'-30' provoca la activación de células corticotropas adicionales a las que presentan contenido basal de ACTH, tratándose quizás de células que producen ACTH únicamente cuando son activadas por el estrés. Estas células pueden estar normalmente en un estado de descanso y requerir un umbral superior de niveles de secretagogos para ser activadas (ver revisión de Childs, 1991-86). Nuestros resultados reflejan que tras el aislamiento no había cambios en la población de células corticotropas detectables inmunocitoquímicamente en situación basal, mientras que se producía un menor aumento de la población de células inmunorreactivas para ACTH tras 15' de estrés por inmovilización, que en animales control. Esto puede suceder por los siguientes motivos:

1- Porque aumente el umbral de sensibilidad al estrés, por ejemplo mediante una "desensibilización" de los corticotropos a las mismas concentraciones de secretagogos (CRH, AVP, OT, u otros) que llegan a la hipófisis vía portal. Existen evidencias de fenómenos de desensibilización en las células corticotropas, por ejemplo, tras estrés crónico por inmovilización. Esta desensibilización se produce mediante una pérdida de receptores de CRH en la hipófisis anterior que provoca una menor activación de los corticotropos ante los mismos niveles de este secretagogo (CRH) (Hauger y col., 1990-107).

También se sabe que algunas células corticotropas responden con más intensidad que otras al estrés debido a que presentan receptores en sus membranas para varios secretagogos (p.e. para CRH y AVP) que potencian su acción sobre los corticotropos de forma sinérgica (Childs y Burke, 1987. *Endocrinology* 120, 439-444; Childs, 1991-86). En nuestro estudio la situación de aislamiento podría haber alterado la cantidad o afinidad de estos receptores celulares, determinando los resultados obtenidos.

2- Por incremento de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre corticotropos, que reduciría la síntesis y liberación de la ACTH hipofisaria. Esta posibilidad, sin embargo, no parece probable, pues los

niveles basales de B en aislados son incluso menores que en los animales control. Sólomente si se hubiera producido un fuerte incremento en el número o afinidad de los receptores de glucocorticoides que existen en las células corticotropas hipofisarias (McGimsey y col, 1991-106; Spencer y col, 1991-107; Cintra y Bortolotti, 1992-109) podría aceptarse la validez de esta hipótesis.

En síntesis, la menor respuesta al estrés de los corticotropos hipofisarios de nuestras ratas experimentales puede haber sido el resultado de diversas alteraciones en el proceso de maduración de estas células. Como antes mencionamos, la repercusión del aislamiento sobre estos parámetros es diferente a los 14 días de edad que a los 21 (Vázquez y Akil, 1992-94) y en su determinación no sólo estarán implicadas las la maduración de las células corticotropas -según las posibilidades comentadas-, sino también la maduración de los circuitos nerviosos implicados en la activación de la respuesta hipofisaria al estrés. El aislamiento social en esta época "crítica" puede provocar alteraciones a nivel del sistema nervioso central que causen un defecto de síntesis y/o liberación de secretagogos hipotalámicos de ACTH, disminuyendo, por tanto, la concentración de secretagogos de ACTH que llega a hipófisis en respuesta a estrés, sin que necesariamente tenga que variar el umbral de activación de los corticotropos hipofisarios.

Esto justificaría, además, el hecho de que el contenido basal de ACTH en hipófisis no se vea afectado por el aislamiento social ya que los niveles basales de síntesis y liberación de ACTH durante la fase nocturna del ritmo circadiano están sujetos a distinto control nervioso que la respuesta al estrés, aunque dependan de la liberación de CRH a la circulación portal (Van Oers y Tilders, 1991).

3.- Inmunomarcaje para CRH, AVP Y OT

Como se ha expuesto anteriormente, el control de la síntesis y secreción de la ACTH hipofisaria se ejerce principalmente a través de secretagogos hipotalámicos que acceden a los corticotropos de la hipófisis anterior vía circulación portal. Entre estos secretagogos existen tres neurohormonas sintetizadas en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV)

que tienen un papel esencial en el control de la respuesta hipofisaria-adrenal al estrés: CRH, AVP y OT (*Vale y col, 1981: Science 213; *Antoni, 1986; *Rivier y Vale, 1983-129; De Goeij y col., 1991; *Gibbs, 1986-128).

El CRH fué identificado en 1981 por Vale y col (Science 213:1394) como un péptido de 41 aminoácidos que constituye el factor principal responsable de la secreción de ACTH y β -endorfina de la hipófisis anterior (Rivier y col, 1982: In vivo CRF...). Por otra parte, OT y AVP son nonapéptidos sintetizados en grupos separados de neuronas neurosecretoras magnocelulares y parvicelulares del NPV (Dierickx, 1980-124; comprobar otras revisiones), que desempeñan un papel complejo en la regulación de la secreción de la ACTH hipofisaria en respuesta al estrés.

3.1.- Distribución de la inmunorreactividad para CRH, AVP y OT en NPV y eminencia media de animales control.-

* Situación basal.- Nuestros resultados referentes a la localización de cuerpos celulares y fibras inmunoreactivas para AVP, OT y CRH están básicamente de acuerdo con descripciones previas (Buma and Nieuwenhuys, 1987; Dierickx, 1980; Yoshimura and Nogami, 1980; Whitnall, 1988-130). Las observaciones realizadas sobre estos péptidos son las siguientes:

1) CRH.-

Como se expuso en el capítulo de Resultados (Fig. ??), se localizaron pequeños somas neuronales débilmente inmunoreactivos para el CRH mayoritariamente en la división parvocelular medial dorsal del NPV -según los criterios citoarquitectónicos utilizados (Swanson y Kuypers, 1980; Sawchenko y Swanson, 1983: J Comp Neurol 218, pg. 121-144) - ver figura 3-. Estas observaciones están en concordancia con descripciones previas de otros autores (Kiss, 1988-135; Swanson y col., 1983-131; Sawchenko y Swanson, 1989-132). También se localizaron algunas células CRF-positivas en la división magnocelular en la que predominan las células inmunorreactivas para OT, según ha sido puesto de manifiesto por Swanson y col., 1983-131; 17,63,121 de 132-tesis. En esta región se ha demostrado que existe colocalización de estos dos péptidos (Pretel y Piekut, 1990-160; 15, 75,98 y 103 de 132-tesis).

También de forma concordante con la bibliografía, hemos encontrado abundantes fibras inmunorreactivas para CRH en la zona externa de la eminencia media (ZEEM), mayoritariamente orientadas de forma perpendicular a la superficie de la eminencia media. En la rata, estas fibras CRH-inmunorreactivas pasan desde el extremo lateral del NPV, alrededor del fornix, hacia la ZEEM (**Paull y Gibbs, 1983-158; Sawchenko y Swanson, 1989-132; Swanson y col., 1983-131**) siguiendo el mismo curso que el tracto oxitocinérgico y vasopresinérgico paraventrículo-neurohipofisario.

2) AVP y OT.-

En nuestras preparaciones (figuras x y z de Resultados) aparecen grandes somas inmunoreactivos para AVP localizados mayoritariamente en un grupo dorsolateral de la parte central de la región magnocelular del NPV, que se corresponde con el NPV posterior magnocelular lateral -ver figura 3 (Swanson y Kuypers, 1980; Sawchenko y Swanson, 1983: *J Comp Neurol* 218, pg. 121-144)-. Por otra parte, los somas inmunorreactivos para OT pertenecen a neuronas también magnocelulares que se localizaban en regiones situadas alrededor de las anteriores, constituyendo la subdivisión magnocelular ventral del NPV (Fig. 3). La localización de estas neuronas magnocelulares vasopresinérgicas y oxitocinérgicas concuerda con la descrita en estudios inmunocitoquímicos previos (**Vandesande y col.; 1977-85; Kiss, 1988-135; Dierickx, 1980-124; Sofroniew, 1985-79**).

Además de estas células de tamaño grande, aparecían algunas células vasopresinérgicas u oxitocinérgicas de soma pequeño, localizadas en la región parvocelular del NPV, similares a las ya descritas por otros autores (**Page, 1988-77; Whitnall, 1988-130; Sofroniew, 1985-79; Kiss, 1988-135; Sawchenko y Swanson, 1982: en ref 79 de tesis**). Entre estas células existe un grupo especialmente interesante, formado por neuronas vasopresinérgicas parvocelulares de la región parvocelular medial, que presentan coexistencia de AVP y CRH, y son las que participan activamente en la respuesta al estrés, además de ser sensibles a la retroalimentación negativa por glucocorticoides (Whitnall, 1988-130; Sofroniew, 1985-79; Sawchenko y Swanson, 1989-132).

Los axones de las células vasopresinérgicas y oxitocinérgicas del NPV dejan el núcleo en su vértice y cursan lateral y ventralmente alrededor del fornix para incorporarse al tracto hipotalámico-hipofisario, que

atraviesa la zona interna de la eminencia media para terminar en el lóbulo neural de la hipófisis (Vandesande y col, 1977-85; ver revisión de Page, 1988-77). Aunque en nuestro trabajo las fibras inmunopositivas para AVP y OT se localizaron mayoritariamente en la capa fibrilar de la zona interna de la EM, de acuerdo con una abundante bibliografía al respecto (ver revisiones de **Sofroniew, 1985-79** y Page, 1988-77) también hemos observado algunas fibras varicosas con grandes dilataciones próximas a capilares portales en las capas reticular y empalizada de la zona externa de la EM, lo cual había sido ya descrito en otros trabajos (Vandesande y Dierickx, 1975; Vandesande y col., 1977-85; **Dierickx, 1980-124; Sofroniew, 1985-79**). Se ha demostrado que estas fibras, procedentes mayoritariamente del NPV (**Vandesande y col., 1977-85**), liberan su contenido neurosecretor a la circulación portal hipofisaria (Buma y Nieuwenhuys, 1988-152), al igual que los terminales nerviosos que contienen CRH (Silverman y Pickard, 1983-130). La ZEEM de rata contiene un número moderado de fibras nerviosas vasopresinérgicas u oxitocinérgicas, pero este contenido se incrementa de forma marcada en ciertas situaciones, como el estrés crónico (De Goeij y col, 1992-126; De Goeij y col, 1991-118) o la adrenalectomía bilateral (**Vandesande y col., 1977-85; Dierickx, 1980-124; Sawchenko, P.E. (1987): J Neurosci 7, pg. 1093; Sofroniew, 1985-79**).

*Respuesta al estrés por inmovilización.- Como se ha visto en Resultados, el estrés agudo por inmovilización durante 15' no afectó, de forma evidente, a la distribución ni a la intensidad de inmunoreacción para CRH, AVP y OT en las neuronas del NPV de los animales control.

Sin embargo, se produjo una ligera disminución en la intensidad de marcaje para el CRH en la ZEEM, aunque no se apreciaba en todos los animales estudiados. Tampoco se observaron cambios en el inmunomarcaje para AVP ni OT a nivel de esta zona.

En el Cuadro 5 se muestra esquemáticamente un conjunto de datos previos de la bibliografía referentes al tema, utilizando como estrés agudo la inmovilización o restricción. Los resultados que recoge son difícilmente comparables entre sí y con los obtenidos por nosotros en este trabajo de aislamiento, debido a múltiples causas entre las que cabe señalar: no todos los trabajos aportan información sobre los

tres secretagogos de la ACTH; las técnicas de estudio son diferentes y tienen distinto grado de sensibilidad; en unos casos se valora el péptido y en otros su correspondiente mRNA; los estudios no siempre se centran en NPV y ZEEM, ya que a veces se valoran los niveles en plasma portal o en circulación general; la duración del estrés agudo por inmovilización o restricción no es la misma en todos los trabajos, y además puede variar el momento en el cual se hacen las valoraciones... Debido a todos estos factores, vamos a concentrar la discusión de nuestros resultados, exclusivamente, en aquéllos puntos más claros y más relacionados con la situación experimental estudiada.

- Fijándonos en el CRH, objeto de un mayor número de estudios, puede constatar que tras tiempos de inmovilización o restricción superiores a los 15' (30', 60', 2 horas, etc.), en general (aunque no siempre) se encuentra un descenso del contenido de CRH en la ZEEM, tanto utilizando técnicas inmunocitoquímicas (Whitnall, 1989-119; De Goeij y col, 1991-118, Kiss y Aguilera, 1992-274; Aguilera y col, 1993-1) como radioinmunoensayo (Chappell y col, 1986-147). El tiempo de exposición al estímulo estresante es importante en relación al grado (cuantía) de la depleción de CRH que se produce en ZEEM, como puede apreciarse claramente en el trabajo de De Goeij y col (1991-118), donde tras 30', 60', o 150' de inmovilización se encuentra que el contenido de CRH ha descendido hasta un 66%, 62% o 49% de los niveles control, respectivamente. De acuerdo con estos datos, se ha propuesto que existe una liberación de CRH a la circulación portal, dependiente de la intensidad del estrés y dependiente, también, de la duración del mismo. Sin embargo, la magnitud del fenómeno es difícilmente detectable y su percepción está en función de la sensibilidad de la técnica utilizada. Así, por ejemplo, Romero y col (1993-272) no encuentran variaciones de CRH en ZEEM tras un período de restricción de 30', lo cual es contrario a lo descrito por De Goeij y col (1991-118) para el mismo tiempo.

De acuerdo con el trabajo de De Goeij y col. (1991-118), sería lógico que los estudios que utilizan tiempos de inmovilización por debajo de la media hora, entre los cuales se encuentra el nuestro, no encuentren variaciones detectables, incluso mediante radioinmunoensayo (Haas y George, 1988-151; Tilders y Berkenbosch, 1986 en 151 de

tesis y 28 de 151-tesis, PARA COMPROBAR R.I.A.-ESTAN PARA BUSCAR EN CAJAL??). No obstante, el hecho de que en todos estos casos se produzca la activación del sistema ACTH en hipófisis indica que probablemente se esté dando una liberación de CRH a circulación portal, aunque el descenso del contenido del péptido en la ZEEM sea difícilmente detectable. Esto puede ser debido, por una parte, a dificultades de sensibilidad en las técnicas utilizadas pero, por otra parte, es posible que exista una elevada tasa de recambio en esos momentos que compensaría la liberación de CRH mediante un incremento de síntesis y transporte del mismo. Podría pensarse, de acuerdo con lo propuesto por Chappell y col. (1986-147), que existe una reserva de CRH en ZEEM para su rápida liberación cuando el animal es expuesto a un estímulo estresante durante un período corto de tiempo, provocando una disminución más o menos medible del péptido en EM que es inmediatamente enmascarada por el incremento de síntesis y transporte del péptido.

Refiriéndonos concretamente a nuestros resultados, el hecho de que algunos animales control mostraran un menor marcaje de CRH en la ZEEM tras el estrés agudo parece indicar que se está produciendo el fenómeno comentado.

En relación con el contenido de CRH en NPV, los distintos autores coinciden en no encontrar variaciones tras estrés agudo por inmovilización, de acuerdo con nuestros resultados. Sí se encuentran incrementos, sin embargo, cuando se valoran los niveles de su mRNA (Imaki y col, 1992-116; Harbuz y col., 1993-277).

- Los trabajos sobre AVP y OT en NPV y ZEEM son más escasos e igualmente difíciles de comparar con los nuestros (Cuadro 5). En cuanto a AVP, los resultados apuntan en el mismo sentido que para el CRH, de modo que cuando el tiempo de inmovilización es más prolongado se constata la depleción del contenido de AVP en ZEEM (De Goeij y col, 1991-118). Sin embargo, de nuevo aquí los datos no son homogéneos, pues cuando se aplica el estrés por restricción durante el mismo tiempo (30') pueden no detectarse variaciones de AVP, aunque sí un descenso del contenido de OT en ZEEM (Romero y col, 1993-272). No es de extrañar, por tanto, que en nuestro estudio no se observen variaciones de AVP ni de OT. Sin embargo, quizás existan variaciones de otro tipo en los niveles de estos dos péptidos, como por ejemplo en plasma,

donde existe una abundante bibliografía que constata cambios diversos tras cortos períodos de inmovilización o restricción, así como tras otros tipos de estrés agudo (Husein y col, 1979; Gibbs, 1984; Lang y col., 1983; Wu y Childs, 1990). Estos resultados indican que, en relación con la AVP y la OT, hay que considerar la posible importancia de una vía de actuación de estas hormonas sobre las células corticotropas, a través de una vía alternativa distinta del sistema porta hipofisario, procedente del lóbulo posterior de la hipófisis (referencias.....), sobre la cual sólo podemos comentar que nosotros no hemos encontrado variación en las fibras vasopresinérgicas y oxitocinérgicas en neurohipófisis de los animales aislados.

Aunque la exposición corta a la inmovilización (1') provoca que disminuyan los niveles hipotalámicos de OT pero no de AVP (Miaskowski y col., 1988-121), no hemos encontrado trabajos que estudien el contenido de estos péptidos concretamente en el NPV tras 15' de estrés por inmovilización. La exposición durante 15' a otros tipos de estrés agudo, como la novedad del ambiente y el frío, sin embargo, tampoco parece producir alteraciones en el contenido de AVP en NPV o eminencia media (Wu y Childs, 1990-145), en concordancia con nuestros resultados, aunque sí se incrementa el contenido de su mRNA en el NPV a los 30' del estrés.

De lo comentado hasta el momento se puede extraer la conclusión de que existe una gran heterogeneidad en la respuesta hipotalámica al estrés, ya que incluso parece que no todos los tipos de estrés provocan liberación de CRH a través de los mismos mecanismos neurales (Haas y George, 1988-151). Parece, por tanto, que la respuesta al estrés varía cualitativamente de acuerdo con el tipo, intensidad, duración y momento en que se aplica el estímulo estresante, lo cual se contrapone con el concepto clásico de Selye de que supone una "respuesta no-específica del cuerpo a cualquier demanda" (33). La activación del eje hipofisario-adrenal sería una característica constante, pero la contribución hipotalámica al control de la secreción de ACTH parece ser diferente en respuesta a distintos e incluso al mismo tipo de estrés.

3.2.- Efectos del aislamiento social sobre la inmunorreactividad para CRH, AVP y OT en NPV

y eminencia media.-

Según nuestros resultados, el aislamiento social no produjo cambios aparentes en el patrón de distribución ni en el contenido de somas inmunorreactivos para CRH, AVP ni OT en el NPV, como tampoco en la intensidad de inmunorreacción. Igualmente, no se encontraron variaciones en el contenido de dichos péptidos tras la exposición de los animales aislados a 15' de estrés por inmovilización.

A nivel de la eminencia media tampoco se encontraron cambios en las fibras vasopresinérgicas y oxitocinérgicas. En cambio, los animales aislados mostraban un marcado aumento de la expresión de inmunoreactividad para CRH en las fibras nerviosas localizadas en la lámina externa de la EM, tanto en situación basal como tras 15' de estrés agudo por inmovilización, en comparación con los animales control (fig. de resultados?). Los animales aislados presentaban, además, un mayor campo de extensión de estas fibras dentro de la EM, así como una mayor intensidad de marcaje en las regiones laterales de la misma.

Hasta el momento, son bastante escasos los estudios de este tipo en animales aislados o sometidos a diferentes tipos de estrés crónico. La bibliografía consultada tiene un carácter parcial y variado, centrándose exclusivamente sobre algunos aspectos concretos de los sistemas estudiados. Vamos a comentar, en este apartado de discusión, sólo aquellos trabajos y aspectos que puedan proporcionar información útil en relación con nuestros resultados considerando, en todo momento, la gran cantidad de factores técnicos y de diseño experimental que dificultan las comparaciones.

- Estudios en el núcleo paraventricular.-

La ausencia de modificaciones constatada por nosotros está básicamente de acuerdo con lo obtenido por Ginsberg y col (1993-273), quienes tampoco han encontrado cambios en el contenido de CRH a nivel de este núcleo tras la cría de monos rhesus en aislamiento social desde el tercer día postnatal. Este trabajo, que utiliza también técnicas inmunocitoquímicas de estudio, no aporta información ni sobre el contenido de CRH en eminencia media, ni tampoco acerca de los otros secretagogos del ACTH (AVP y OT). De acuerdo con nuestros resultados y los aportados por Ginsberg y col (1993-273), podría sugerirse, de un modo general, que el aislamiento

social no altera la síntesis de CRH en el NPV.

Sin embargo, cuando el aislamiento prolongado se lleva a cabo en ratas adultas, se han descrito ciertos cambios; en concreto, se produce un incremento de células que contienen CRH, y de la proporción de ellas que contienen también AVP en la región parvicelular del NPV (Barrett y col, 1989-278). También se ha detectado un aumento de expresión del ARNm para AVP en la misma región (Angulo y col, 1991-146); el hecho de que este incremento se produzca exclusivamente en el NPV y no, por ejemplo, en el NSO permite su asociación con el incremento de actividad adrenocortical constatado en los animales aislados por estos mismos autores.

La disparidad de estos resultados respecto de los nuestros y los obtenidos por Ginsberg y col (1993-273) vuelve a poner de manifiesto la importancia del momento de la vida del animal en la cual se realiza el destete y se induce el aislamiento, en relación con las alteraciones que determina éste en el eje HHA. En relación con este factor desarrollo, comentado previamente, hay que señalar que la base estructural del complejo hipotálamo-hipofisario está presente desde el momento del nacimiento, siendo el sistema funcionalmente activo a partir de la primera semana postnatal en rata (Fink y Smith, 1971-275). De este modo la rata de 14 días presenta ya una respuesta intacta al estrés, así como una sensibilidad adecuada del sistema de síntesis de CRH y POMC a la retroalimentación negativa por glucocorticoides (Grino y col., 1989-93). Sin embargo, en el momento del aislamiento, cuando las ratas tienen 15 días de edad, no se ha completado todavía la maduración de los sistemas de neuropéptidos que estamos estudiando. Concretamente, el contenido de CRH a día 21 postnatal alcanza el 63% de los niveles del adulto, mientras que la AVP en esos momentos sólo alcanza aproximadamente el 17% , incrementándose fuertemente sus niveles entre los días 21-40 de vida (Rundle y Funder, 1988-161). En cuanto a la OT, parece que existe una maduración rápida entre los días 12-20 postparto, apareciendo niveles equivalentes a los de adulto en el día 21 postnatal (4 de 161 tesis).

Teniendo en cuenta que los períodos de desarrollo del animal son períodos especialmente "plásticos", y que las alteraciones durante los mismos pueden repercutir fuertemente en el conjunto de un circuito nervioso, puede pensarse que los diferentes resultados obtenidos tras aislamiento pre- y

postdestete se deben fundamentalmente a este factor "desarrollo". Las alteraciones que producen en el funcionamiento del sistema hipotálamo-hipofisario-adrenal serán, por tanto, cualitativa y cuantitativamente diferentes y la posible activación que tiene lugar en el NPV tras aislamiento en los animales adultos no parece tener lugar tras aislamiento prolongado desde los 15 días de edad.

- Estudios en eminencia media. -

Como ya se ha dicho, hemos encontrado inmunomarcaje incrementado para CRH en la eminencia media de los animales aislados, tanto en situación basal como tras 15' de estrés por inmovilización.

También aquí la bibliografía al respecto es escasa. Concretamente, no hemos encontrado estudios de esta zona en situaciones de aislamiento, siendo los datos más relacionados aquéllos realizados en situaciones de estrés crónico, tanto de tipo social, como no-social. Los datos de estos últimos trabajos no son concordantes con los nuestros. Así, en lo referente al CRH, tras el estrés crónico se constata depleción del contenido de su contenido en EM (Chappell y col., 1986-147; Bartanusz y col (1993-276) o bien que no se producen variaciones (Haas y George, 1988-151; De Goeij y col, 1991-118; De Goeij y col, 1992-126), todo ello en situación basal. Dichos trabajos no hacen referencia al efecto del estrés crónico sobre el contenido del CRH en respuesta a estrés agudo.

Respecto a los niveles de AVP en eminencia media (que no presentan alteraciones evidentes en nuestro experimento), los escasos estudios existentes apuntan hacia un incremento del contenido basal tanto tras estrés crónico por inmovilización (Bartanusz y col, 1993-276; De Goeij y col, 1991-118) como tras estrés crónico de carácter social (De Goeij y col, 1992-126). Este trabajo es especialmente interesante, como veremos a continuación, por la interpretación funcional que dan a los resultados.

La información que aportan los datos de contenido de los secretagogos del ACTH en eminencia media sobre la funcionalidad del eje HHA dependen, además, de que se complementen con la información existente sobre:

- tasa de síntesis de los péptidos en el NPV
- concentración de los mismos en plasma portal
- grado de activación de las células corticotropas hipofisarias y/o niveles circulantes de ACTH en plasma.

Ninguno de los trabajos citados anteriormente reúne, satisfactoriamente, información completa sobre todos estos puntos, aunque el trabajo de De Goeij y col, (1992-126) sí pone de manifiesto que en los animales sometidos a estrés social crónico se produce una hipofuncionalidad del eje HHA, concretamente en respuesta a estrés social agudo. En primer lugar, estos autores constatan que en ratas control se produce una depleción importante de AVP en la ZEEM cuando son sometidas a una situación de estrés social agudo, sin que varíe el contenido de fibras que contienen CRH. Por tanto, parece que se produce una liberación de AVP a la circulación portal con la que el animal responde eficazmente a la situación puntual de alarma. En el caso de los animales sometidos a estrés social crónico, no se produce dicha depleción de AVP en ZEEM en respuesta al estrés, lo cual indica que no se libera el péptido a circulación portal en respuesta al estrés, cambio que parece responsable de la menor respuesta adrenocortical de estos animales frente al estrés agudo (hipofuncionalidad del sistema HHA). En este caso, la presencia de unos niveles proporcionalmente elevados de AVP en ZEEM de los animales sometidos a estrés crónico son reflejo de una insuficiencia funcional del del eje HHA en parte debida a un problema de liberación del péptido a la circulación portal.

Es interesante que este caso de hiposensibilidad del eje HHA se dé en un modelo de estrés crónico de tipo social, ya que presenta más parecido con la situación de aislamiento que otros modelos de estrés crónico, como por ejemplo, por inmovilización. De acuerdo con los datos obtenidos en nuestro estudio, algunos de ellos comentados en otros apartados, parece que se refuerza la hipótesis ya propuesta de una hipofuncionalidad del eje HHA provocada por el aislamiento prematuro y prolongado. Por un lado, no había cambios visibles en las células corticotropas hipofisarias en situación basal, mientras que su respuesta al estrés está proporcionalmente disminuida; fijándonos en el CRH veíamos que sus niveles no varían en NPV en ninguno de los dos casos; sin embargo, se produce un incremento de este secretagogo en la EM de animales aislados tanto en situación basal como frente a un estrés agudo de 15' de inmovilización. Si consideramos que el aislamiento es una situación estresante que induce liberación de secretagogos de ACTH a la circulación portal (Alexander y col, 1988) se puede sugerir

que tal liberación está disminuida en nuestros animales (por lo menos en lo que al CRH se refiere), con lo cual tenemos una función deficitaria del eje HHA en este nivel, tanto en condiciones basales como en respuesta aguda a una emergencia. El razonamiento seguido está basado en el mecanismo de alteración propuesto por De Goeij y col (1992-126), aunque la diferencia fundamental con este trabajo es el secretagogo de la ACTH cuyo contenido se incrementa en la ZEEM: CRH en nuestro trabajo, y AVP en el de estos autores. Esta diferencia es difícil de interpretar, aunque puede estar basada en el hecho de que los sistemas hipotalámicos que controlan la secreción de ACTH hipofisaria están dotados de una elevada plasticidad química y estructural dependiente del tipo, intensidad, duración y momento en el que se aplica el estímulo estresante.

Una vez propuesta la hipótesis de que el incremento de contenido de CRH en ZEEM puede deberse a un déficit funcional en la liberación de CRH a la circulación portal, se plantea el interrogante de cuál puede ser el mecanismo implicado en esta situación. Sin entrar en detalles pormenorizados sobre este punto, vamos a limitarnos a esbozar cuáles son, a nuestro juicio, las posibilidades en este sentido teniendo en cuenta que la constatación de cualquiera de ellas requeriría estudios complementarios:

1) Un primer mecanismo podría ser la alteración a nivel de las interacciones que se producen entre distintos sistemas de fibras en la ZEEM y que modulan la liberación de ciertos factores (**Bouchaud y Bosler, 1986-80**). Así, por ejemplo podrían haber resultado alterados por el aislamiento ciertos sistemas neurotransmisores como los catecolaminérgicos que tienen un papel facilitador de la liberación de CRH a nivel de la ZEEM (Kiss y Aguilera, 1992-274). Además de las catecolaminas, que tienen un papel facilitador de la liberación de CRH a nivel de la ZEEM (Kiss y Aguilera, 1992-274) podrían estar alterados otros sistemas neurotransmisores como acetilcolina, serotonina y GABA, así como otros neuropéptidos que pueden modular la secreción de CRH a circulación portal (28, 29, 30, 31 de Kiss y Aguilera, 1992-274; Kordon, 1985-171; ¡¡COMPROBAR!!).

Por tanto, sería interesante comprobar si estos sistemas neurotransmisores están o no alterados en la eminencia media de los animales aislados.

2) Por otra parte, también se podría haber producido un

aumento de la retroalimentación negativa del CRH sobre su propia liberación a nivel de la eminencia media, mediante un aumento de los receptores (o de su afinidad) para CRH existentes en los terminales de las fibras que contienen este péptido (52 de Calogero y col, 1988-148).

Para concluir este capítulo podría establecerse de una manera razonable que el aislamiento social prolongado e inducido tras un destete prematuro implica una situación de hipofuncionalidad del eje HHA que se pone de manifiesto especialmente cuando estos animales son expuestos a una situación de emergencia, ya que entonces la reactividad de las células corticotropas hipofisarias es inferior a la normal. El origen de la alteración podría radicar a nivel de la eminencia media y concretamente afectaría a los mecanismos de liberación de CRH. Estos resultados, en general, no son coincidentes con los obtenidos en otras situaciones de aislamiento o estrés crónico cuando tienen lugar en edades adultas, siendo por lo tanto, fundamental el componente del desarrollo en la determinación del cuadro estudiado.

No se hacen patentes, mediante técnicas inmunocitoquímicas, cambios en los niveles de CRH, AVP y OT en el NPV, lo que puede indicar una situación normal en cuanto a la síntesis de los mismos. No obstante, según los objetivos de este trabajo y para obtener información sobre los niveles superiores que regulan la actividad HHA, incluyendo la amígdala como centro límbico representativo, se llevaron a cabo los estudios electrofisiológicos anteriormente explicados cuyos resultados son objeto de discusión en el capítulo siguiente.

Además de estos mecanismos es posible que se produzcan modificaciones centrales en la neurosecreción de CRH (secreción a circulación portal) a través de la alteración de sistemas neurotransmisores límbicos, participando en la diferente actividad basal y estimulada hipofisaria-adrenocortical observada entre las ratas control y aisladas. Un defecto en la transducción de la señal de estrés en

neurosecreción de CRH, debido a estimulación insuficiente de estas neuronas, debido a alteraciones en las vías de neurotransmisores. Quizás por una inervación inmadura del NPV (39,40,41 de ref. 157-tesis) en la época del aislamiento, que resultó alterada por dicha situación.

Por tanto, aunque nosotros no hayamos encontrado alteraciones en la inmunorreactividad para CRH, AVP, OT en NPV, pueden estarse produciendo cambios de actividad en los centros estudiados que nosotros no detectamos mediante las técnicas inmunocitoquímicas. Se deberían desarrollar otros estudios para detectar cambios en la actividad de los sistemas analizados y si las alteraciones encontradas se deben a alteraciones en vías extrahipotalámicas que regulan la síntesis y liberación de CRH, AVP y OT en neuronas del NPV. Se pasa, por tanto, a los estudios electrofisiológicos o cuantitativos.

**4.4.- EFECTO DEL AISLAMIENTO SOBRE VIAS
EXTRAHIPOTALAMICAS QUE CONTROLAN LA ACTIVIDAD HHA:
SISTEMA AMIGDALO-HIPOTALAMICO.-**

Toda una serie de estudios han indicado que, además de los centros nerviosos hipotalámicos, existen centros extrahipotalámicos que participan en el control de la liberación de corticosterona en situación basal, así como en la inducida por situaciones estresantes. Entre ellos, el sistema límbico -y más concretamente la amígdala- juega un papel importante en la regulación central de la actividad del sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal (Zolovick, 1972); Feldman y Conforti, 1981; Feldman, Conforti y Saphier, 1990). Las alteraciones que hemos descrito hasta el momento en los animales aislados -que sugieren, como se ha visto, una hipofuncionalidad del eje HHA en situación basal, pero sobre todo en respuesta al estrés por inmovilización- dejaban abiertas bastantes incógnitas acerca de los posibles mecanismos alterados. Ello nos llevó a plantear el bloque de experimentos de electrofisiología, en el cual nuestro objetivo era analizar si dicha hipofuncionalidad estaba relacionada con alteraciones en ciertas vías extrahipotalámicas que regulan la secreción adrenocortical (eje límbico-hipotalámico-hipofisario-adrenal: LHHA), concretamente, en las proyecciones de amígdala a hipotálamo.

Como ya ha sido comentado en la Introducción (ver *¿¿cuadro 5??*), las proyecciones amigdalinas que intervienen en la respuesta adrenocortical a los estímulos estresantes cursan mayoritariamente a través de la estría terminal hasta el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), bien mediante proyecciones directas (Silverman y col., 1981; Tribollet y Dreifuss, 1981; Gray, 1989), o bien mediante proyecciones indirectas, en parte a través del núcleo de la estría terminal (NEST) y el área preóptica (APO) (Krettek y Price, 1978a; Weller y Smith, 1982; De Olmos y col., 1985; 17; Gray y col., 1989-206). Tanto el NEST como el APO presentan conexiones nerviosas directas con la división parvocelular del NPV (52-55,57,58; Sawchenko y Swanson, 1983; Swanson y col., 1983), donde se concentran las neuronas que contienen CRH y que constituyen la vía final de integración en la activación de la secreción adrenocortical.

Por tanto, los estudios de la actividad espontánea y de la respuesta provocada por la estimulación del núcleo medial de la amígdala, realizados en el NEST, APO y NPV, podrían aportar información válida sobre sobre células y circuitos implicados en el control de la actividad adrenocortical.

En primer lugar, haremos un resumen de los resultados electrofisiológicos obtenidos en nuestro estudio, los cuales se recogen esquemáticamente en la figura 6, para una mejor comprensión de los mismos:

1. El aislamiento social provocó una disminución de la actividad espontánea en determinadas poblaciones celulares del NPV y del APL, pero no en el resto de estructuras estudiadas (NEST, APM).
2. El aislamiento social alteró la respuesta de las células de ciertos núcleos a la estimulación eléctrica de la amígdala medial. Así, en el NPV y APM se redujo el número de células que eran excitadas por dicha estimulación amigdalina, produciéndose un incremento paralelo del número de unidades que eran inhibidas o no respondían a la estimulación.

Estos resultados electrofisiológicos, junto con la disminución de los niveles plasmáticos de B y otras alteraciones descritas anteriormente en los animales aislados, sugieren la existencia de una reducción de la actividad límbico-hipotalámica-hipofisaria-adrenal como consecuencia del aislamiento social prolongado, cuando éste se produce en una época temprana previa al destete.

A continuación, vamos a pasar a la discusión de estos resultados, estructurados en dos bloques: por una parte, los efectos del aislamiento social sobre la frecuencia de descarga espontánea de las células y, por otra parte, las alteraciones que se producen en la respuesta a la estimulación del n. medial de la amígdala:

1.- FRECUENCIAS DE DESCARGA ESPONTÁNEA.-

La actividad espontánea de las unidades aisladas en los animales control era similar a la descrita en estudios previos para el NEST(9,67) y NPV(39,53,54,56). En el caso del APO, aunque las células disparaban algo más rápido que en otros estudios (55, 56), la frecuencia de descarga espontánea se encontraba dentro del rango de frecuencias descritas por otros autores (**Gardner y Phillips, 1977-203**; Dyer, 1973-en 203 de tesis).

El aislamiento social provocó una disminución de la frecuencia de descarga espontánea sólo en determinadas poblaciones de células: en las células del NPV que eran excitadas tras la estimulación eléctrica de AME y en las células del APL que no respondían a dicha estimulación. Sin embargo, la actividad espontánea de las demás células del NPV y APL, así como la totalidad de células registradas en el NEST y APM no varió en los animales aislados. Estos resultados indican que no se produjeron cambios drásticos en la actividad espontánea de las células de los núcleos estudiados tras la cría en aislamiento social.

Se ha comprobado que cuando se incrementa la actividad eléctrica de las neuronas del NPV y del APO se producen, de forma paralela, incrementos en los niveles circulantes de B en el animal (17,39,56). Por tanto, la menor actividad espontánea de las células del NPV y del APO podría estar relacionada con la disminución de los niveles basales de B en plasma encontrados en los animales deprivados socialmente. Si analizamos con más detalle los resultados, las células del NPV que presentan menor actividad espontánea en los animales aislados son precisamente las que resultan activadas tras la estimulación de la AME, de modo que estarían implicadas en la vía que estamos estudiando, participando también activamente en el incremento de la actividad adrenocortical que se produce tras la estimulación amigdalina. Se puede sugerir, por tanto, que la hipofuncionalidad basal de estas células

podría ser parcialmente responsable de la disminución de los niveles circulantes de B en los animales aislados. En cambio, aunque se ha comprobado que el APO contribuye de alguna forma al control de la expresión basal de mRNA para CRH y su secreción (Herman y col, 1990, 30 de manuscrito-isol), las células del APL que presentan menor actividad espontánea tras el aislamiento social son precisamente las que no responden a la estimulación de la amígdala medial y, por tanto, estarían implicadas en vías diferentes de la estudiada por nosotros. Quizás alguna de estas vías podrían, a su vez, participar en el control la actividad HHA basal como se ha propuesto, por ejemplo, para ciertas proyecciones hipocampales multisinápticas descritas al área preóptica o mediante la vía amigdalofugal ventral (Herman y col, 1990, 30 de manuscrito-isol) que realmente conecta el cortex periamigdalino con el APL .

En relación con los posibles mecanismos que subyacen a la disminución de la descarga espontánea de estas células, ya hemos comentado que el aislamiento en un período temprano anterior al destete provoca un incremento en los glucocorticoides circulantes(29,60) en un momento en que el eje HHA está todavía madurando (Vázquez y Akil, 1992-94). Teniendo en cuenta la modulación que ejercen las hormonas adrenales sobre la frecuencia de descarga de las células (7,10,52), el incremento de concentración de corticosteroides podría haber causado efectos de larga duración en la actividad espontánea de las células, mediante, por ejemplo, modificaciones de sus características electrogénicas, en la distribución de sus receptores, etc. De hecho, se han encontrado cambios de este tipo como, por ejemplo, un incremento en el número de canales de calcio en células de cortex frontal y n. caudado, cuando el aislamiento social se produce desde los 21 días de edad hasta los 3 meses (Czyrak y col, 1992-57). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que a la actividad espontánea disminuida contribuyan también diversas alteraciones en agentes extrínsecos a las células estudiadas, como, por ejemplo, cambios en las aferencias de estas neuronas, que podrían tener o no el mismo origen hormonal.

También podría pensarse en el caso contrario, es decir, que las alteraciones de actividad espontánea detectadas en las células del NPV y APL tengan su origen en los bajos niveles

basales de B en plasma de los animales aislados adultos. En este sentido, se ha descrito que los corticosteroides reducen la frecuencia de descarga de las células del NPV y células que proyectan a ellas(36,52,62) a través de receptores de corticosteroides existentes en las mismas (Fuxe y col, 1985-en 24 de tesis; Arriza y col, 1988-en 24 de tesis; Ceccatelli, 1989-134; McGimsey y col, 1991-106). Sin embargo, si éste fuera el caso, la baja concentración de B en plasma de los animales aislados habría provocado un incremento, más que una disminución en la actividad espontánea de las células del NPV y APL. La posibilidad que estamos analizando es especialmente difícil de justificar en el caso de las células del APL, si tenemos en cuenta el hecho de que no se han detectado receptores para corticosteroides en la región preóptica (Fuxe y col, 1985-en 24 de tesis; Arriza y col, 1988-en 24 de tesis; Ceccatelli, 1989-134; McGimsey y col, 1991-106). Por todo ello, parece difícil establecer una relación directa entre la disminución de actividad espontánea que se produce en las células del APL y NPV de los animales aislados y una posible alteración en la retroalimentación negativa de los corticosteroides.

2.- ALTERACIONES EN LA RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL N. MEDIAL DE LA AMIGDALA.-

Procederemos a discutir separadamente los resultados obtenidos en cada núcleo estudiado:

2.a. NUCLEO DE LA ESTRÍA TERMINAL.

Los registros realizados se localizaron principalmente en la división medial del NEST, y dentro de ella, sobre todo, en las regiones anteriores, siguiendo los criterios clásicos de citoarquitectura y conectividad del núcleo (Bleier, 1961; Krettek y Price, 1978; De Olmos y col., 1985), cuyas subdivisiones han sido revisadas recientemente (Moga y col., 1989-192; Del Abril, 1988-194). Según estos criterios, la subdivisión medial del NEST estaría conectada con grupos celulares como el n. medial de la amígdala, área preóptica medial e hipotálamo ventromedial y, por tanto, implicada en la regulación de procesos neuroendocrinos (Krettek y Price, 1978; Saper y col., 1976; Swanson, 1976). En este sentido, nosotros estábamos especialmente interesados en realizar los registros de actividad unitaria en las regiones anteromediales del NEST debido a que su estimulación

eléctrica produce un incremento de los niveles plasmáticos de B (14), además de que sus células reciben inervación directa de la amígdala medial (9; **Weller y Smith, 1982-208**).

- En animales control la estimulación eléctrica de la AME provocó aumento en la frecuencia de descarga en un gran porcentaje de las unidades registradas en el NEST (63.6%), mientras que pocas células resultaron inhibidas (28.8% de las células) y el porcentaje de unidades que no respondían a la estimulación fué realmente bajo (7.6%). Estos resultados sugieren que la proyección estudiada era predominantemente excitatoria y están de acuerdo con estudios electrofisiológicos previos(1,5,9,67), así como con estudios neuroanatómicos que demuestran la existencia de proyecciones desde AME a NEST(9,32), mayoritariamente a través de la *stria terminalis*(17,33).

La inhibición de la descarga que se produjo tras la respuesta excitatoria en aproximadamente el 21% de las células que eran activadas (fenómeno denominado OD+/-), podría representar un mecanismo que limitaría la excitación que se produce en las células tras la estimulación amigdalina. Este fenómeno, que ha sido previamente descrito en el NEST tras la estimulación de la *estria terminalis* por Yajeya y col (1989) podría generarse por varios mecanismos: a) activación de interneuronas inhibitorias, b) posthiperpolarización temprana y disfacilitación tardía?? que siguen a cada potencial de acción, d) algún tipo de mecanismo inhibitor postsináptico mediante colaterales recurrentes.

En cuanto a las latencias de respuesta, la excitación se produjo en el NEST con una media de latencia larga (33.9 ± 8.8 ms), lo cual indica que estaba mediada por una vía polisináptica (1,5,67). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las latencias de activación eran muy heterogéneas, existiendo bastantes neuronas (alrededor del 60% de las células excitadas) que presentaban latencias cortas (<10 ms) y que, por tanto, serían excitadas mediante una proyección monosináptica desde el núcleo medial de la amígdala (Yajeya y col., 1989). En cuanto a la respuesta inhibitoria, ésta se produjo con una latencia homogéneamente más rápida (9.4 ± 2.8 ms), indicando que probablemente estaba mediada por una proyección monosináptica desde el n. medial de la amígdala (1,50).

- Una vez caracterizada la respuesta de las células del NEST a la estimulación de la AME en los animales control, sólo nos queda por comentar que la cría en aislamiento social no provocó alteraciones significativas en el patrón de dicha

respuesta, del mismo modo que tampoco se encontraron diferencias en la actividad espontánea de las células del NEST entre los grupos estudiados (como se ha discutido anteriormente), o en las latencias de respuesta.

La observación realizada en tres de las unidades registradas en estos animales aislados, de un incremento espectacular de la duración de la excitación tras estimulación amigdalina puede ser objeto de un breve comentario, si bien su carácter excepcional aconseja no extendernos demasiado en este punto. De Kloet y col (revisión, 1991-10 de elcisolpap; ¡¡BUSCAR Y AÑADIR EL PAPER ORIGINAL DE INTRACELULAR!!) han descrito que los corticosteroides pueden reducir la excitabilidad de células del sistema límbico, concretamente del hipocampo. Se podría proponer, por tanto, que los bajos niveles circulantes de B en los animales aislados podrían ejercer un menor efecto de retroalimentación negativa sobre la excitabilidad de las células del NEST, a través de los receptores para GC descritos en ellas (Neurosci Lett 77, 25-30: ¡¡Buscar en CAJAL!!; añadir ref. De Kloet del Congreso ENEA 93.Lisboa). La estimulación eléctrica de la amígdala medial, al igual que el estrés, provoca una excitación en las células del NEST medial (como se deduce de nuestros resultados en animales control y de datos previos en la bibliografía) que, a su vez, provoca un aumento en la concentración plasmática de B (14,28). Estos datos han llevado a proponer al NEST como un núcleo que participa en la regulación de la secreción adrenocortical en respuesta a los estímulos estresantes. Sin embargo, el hecho de que en animales aislados este núcleo no vea alterada su actividad eléctrica parece indicar que la hipofuncionalidad que presenta el eje HHA de estos animales no tendría su origen en alteraciones de la actividad basal del NEST, ni de su excitabilidad ante estímulos procedentes del n. medial de la amígdala.

2.b. AREA PREOPTICA.

En nuestro estudio, los registros se realizaron en las regiones rostral y medio-laterales del APO, siguiendo los criterios citoarquitectónicos de Bleier y col (1979-en morfmapo.met), Millhouse (1969-Ibidem) y Simerly y col. (1984-228). Se ha demostrado que la estimulación eléctrica de estas zonas provoca un incremento de secreción adrenocortical (Redgate y Fahringer, 1973-49 elcisolpap; Saphier y Feldman, 1986-54 elcisolpap), lo que ha llevado a sugerir que su implicación en el control de la actividad HHA.

- En animales control, la estimulación de la AME provocó excitación en un elevado número de células preópticas (62%), mientras que el porcentaje de células que resultaron inhibidas (14%) o no respondieron a la estimulación (24%) fué menor.

La respuesta fué diferente en el APM (OD+=85.7%; OD-=4.8%; NR=9.5%) que en el APL (OD+=44.8%; OD-=20.7%; NR=34.5%):

Como puede apreciarse, el porcentaje de células que no respondían a la estimulación de la AME fué menor en el APM que en el APL (donde esta población de células era bastante elevada), lo cual está de acuerdo con los datos obtenidos por Adamec (1989-1 de elcisolpap). Este fenómeno podría reflejar la existencia de una mayor proyección desde la AME al APM que al APL, cuyas aferencias amigdalinas parecen proceder mayoritariamente del cortex periamigdalino a través de la vía amigdalofugal ventral en la rata (Powell y col, 1965-47 de elcisolpap; Cowan y col, 1965: en 239 de tesis; Leonard y Scott, 1971: en 239 de tesis; De Olmos, 1972-239 tesis). No obstante, se conoce la existencia de conexiones entre AME y APL, que se establecen, en parte, a través de las conexiones recíprocas entre APM y APL(8; **Simerly y Swanson, 1988-229**).

Por otra parte, si nos fijamos en las células que respondieron a la estimulación amigdalina, los porcentajes de excitación e inhibición fueron también diferentes en el APM y APL, de modo que el cociente excitación/inhibición es mucho mayor en el APM (17.85) que en el APL (2.16). Estos resultados indican que la vía amígdala-área preóptica es mayoritariamente excitatoria, pero de forma mucho más patente en el caso del APM. La existencia de esta aferencia amigdalina mayoritariamente excitatoria sobre las células del APM es acorde con lo descrito por otros autores (8, 44,50; Fenske y col, 1975-207) y parece mediada principalmente a través de la estría terminal (12,27,48).

La latencia media de excitación era elevada en las células del APO (APL=37.5±13.4ms; APM=79.1±40.07ms), lo cual sugiere la intervención de una vía oligo o polisináptica. Esta interpretación aparece abundantemente recogida en la bibliografía sobre el tema (1, 44; **Gray y col., 1989-206**; Magnuson y Gray, 1988-29 de la 205 de tesis; **Gardner y Phillips, 1977-203**), aunque las latencias de respuesta que se describen en los trabajos cubren un amplio rango. Esta heterogeneidad de latencias de excitación era aún mayor en el

APO que la ya comentada en el NEST (sobre todo para las células del APM), existiendo un menor porcentaje de células con latencias cortas de excitación (<20 ms, alrededor del 30% de las células excitadas). Estas células podrían ser excitadas mediante una proyección monosináptica desde el AME, probablemente vía la estria terminal (Perkins y col, 1977), pero parece que esta proyección es menor que en el caso de las células del NEST.

En cambio, la inhibición de la descarga de las células del APO por estimulación de la AME se produjo con latencias menores y más homogéneas (APL=10.8±5.4 ms; APM=8.0 ms), lo cual sugiere, como ya vimos en el NEST, la existencia de una vía inhibitoria monosináptica rápida que podría estar mediada por aferencias directas desde la amígdala medial (50).

- Por otra parte, el aislamiento social disminuyó el número de células del APM que eran excitadas por la estimulación del AME (controles:85.7%; aislados:36%) e incrementó el número de células que resultaban inhibidas (controles:4.8%; aislados:38%) o no respondían (controles:9.5%; aislados:26%). En cambio, en el APL se produjeron ligeras modificaciones que no fueron estadísticamente significativas. El hecho de que el aislamiento social tenga un efecto más drástico sobre la respuesta de las células del APM quizás podría deberse a una alteración de las aferencias con origen en el AME que, como ya se ha dicho, son más abundantes sobre el APM. Por otra parte, las latencias de respuesta no variaron en los animales aislados.

Teniendo en cuenta todo lo dicho en este apartado puede concluirse, por lo tanto, que las aferencias amigdalinas a las células del APM eran mayoritariamente excitatorias, y el aumento de actividad que se provoca en las células preópticas se puede relacionar con el incremento de actividad que tiene lugar en el sistema HHA en respuesta a los estímulos estresantes (17,56). Por tanto, se puede proponer que la reducción de la excitación que se produce en el APM de los animales aislados al estimular la AME, junto con el aumento de inhibición y del porcentaje de células que no responden, determinaría una menor secreción adrenocortical en estos animales. Esto parece coherente si tenemos en cuenta los resultados presentados en otros apartados de la tesis, de los que se deducía que los animales aislados presentaban una

menor activación del eje HHA en respuesta al estrés por inmovilización; esta hiposensibilidad de la actividad HHA al estrés podría estar relacionada con una reducción de la excitabilidad de las células del APM ante los estímulos, como hemos constatado en el caso concreto de los estímulos procedentes de la amígdala medial. Hay que tener en cuenta que el APM presenta proyecciones que sinaptan sobre las neuronas parvocelulares del NPV (8,53,54,58,62, **Simerly y Swanson, 1988-229**), siendo dicha proyección predominantemente excitatoria sobre la actividad eléctrica del NPV (54,55). Así, la estimulación del n. medial de la amígdala, al producir una menor excitación de las células del APM, podría provocar, a su vez, una disminución del efecto excitatorio sobre el NPV, reduciendo consecuentemente la actividad adrenocortical (49), al menos en respuesta a los estímulos mediados por la amígdala medial.

2.c. NUCLEO PARAVENTRICULAR.

- En los animales control todas las células que presentaban un patrón de actividad espontánea no-fásica fueron excitadas por la estimulación de la AME (100%), lo que sugiere que la proyección amigdalina estudiada era excitatoria, de acuerdo con estudios previos(56). Aunque no podamos asegurar las proyecciones de las unidades registradas, existen evidencias para sugerir que las células estudiadas en el NPV podían ser neuronas parvocelulares que proyectaban a la eminencia media, ateniéndonos a los siguientes criterios: a) la posición del electrodo de registro en la división parvocelular medial del NPV, según los criterios citoarquitectónicos de Sawchenko y Swanson (1983-290); b) el patrón de descarga espontánea continua y no-fásica (45,53,63, Pittman y col, 1980-196); y c) el hecho de que la mayoría de ellas eran excitadas tras la estimulación de la AME en animales control(56; Ferreyra y col. 1983-216).

Al igual que en los centros anteriores, el tiempo medio de latencia al que se produjeron las respuestas excitatorias en el NPV provocadas por la estimulación de la AME fué bastante heterogéneo (55.83 ± 32.58). De las 6 células aisladas, cuatro presentaron una latencia de excitación pequeña (< 20 ms) y podría considerarse que son unidades activadas mediante una proyección excitatoria monosináptica, teniendo en cuenta que se han descrito proyecciones directas de la amígdala medial

al NPV(11,45,56,58). Las largas latencias de excitación encontradas en las otras dos células sugieren que es también posible la existencia de una vía oligosináptica desde AME, en parte mediante la vía de proyección que estamos estudiando, que hace relé en el NEST y/o en el APO, áreas que a su vez proyectan al NPV (17; Gray y col, 1989-206).

- El aislamiento social redujo el número de células del NPV con actividad no-fásica que aumentaban su frecuencia de descarga en respuesta a la estimulación de la AME (controles: 100%; aislados:42.9%) y aumentó el número de las que eran inhibidas (28.5%) o no respondían (28.6%). En cambio, las latencias de respuesta no fueron diferentes en ratas control y aisladas.

Como ya se ha comentado anteriormente, la estimulación de la AME, al igual que los estímulos estresantes neurogénicos, provoca un incremento en la frecuencia de descarga de las células parvocelulares del NPV que secretan CRH en la rata originando, a su vez, un incremento de secreción adrenocortical (39,56). Por tanto, la menor respuesta excitatoria que se produce en las células del NPV de los animales aislados tras la estimulación de la AME, originaría una menor respuesta adrenocortical a los estímulos procedentes de la amígdala medial. Si tenemos en cuenta que la AME participa en la respuesta del sistema HHA al estrés por inmovilización (Van de Kar y col., 1991-205), parece lógico sugerir que la disminución de esta respuesta observada en los animales aislados podría tener su origen, en parte, en la menor excitabilidad de las células del NPV ante los estímulos procedentes de la AME. Esta menor excitabilidad podría estar también relacionada con un descenso de la entrada excitatoria al NPV procedente del APM, ya que en este centro se han encontrado también alteraciones en la respuesta a la estimulación de la AME que apuntan en el mismo sentido.

Por tanto, el aislamiento social parece haber provocado alteraciones en la respuesta del animal a los estímulos mediados por la amígdala medial, alteraciones que tienen su origen en vías específicas implicadas en el control de la actividad HHA, en concreto desde el AME a APM y a NPV, resultando menos sensibles a la situación de aislamiento social las proyecciones de AME a NEST y APL. Las alteraciones consistían en una disminución de la respuesta excitatoria a

la estimulación de la AME, junto con un incremento de inhibición y del porcentaje de células que no respondían a dicha estimulación. Estos resultados sugieren una disminución en la EFECTIVIDAD DE LA VÍA ESTUDIADA en los animales aislados, de manera que se puede sugerir que se produciría una disminución de la respuesta del eje HHA, al menos ante los estímulos estresantes mediados por la AME, como es el caso del estrés por inmovilización (Van de Kar y col., 1991-205).

¿Qué posibles mecanismos subyacen a las alteraciones de respuesta del APM y NPV a la estimulación del n. medial de la amígdala?:

* La primera posibilidad es que se haya reducido la actividad o funcionalidad de las vías excitatorias y/o se haya aumentado la de las vías inhibitorias desde AME a POA (concretamente a APM) y NPV, sin que, por el contrario, se hayan alterado las proyecciones al NEST. Es decir, el aislamiento social podría determinar la alteración específica de algunas de las proyecciones estudiadas. Teniendo en cuenta las proyecciones del n. medial de la amígdala esquematizadas en la figura 5, y según los criterios de Cowan y col (1965-210), Heimer y Nauta (1969, en Hamilton, 1976) y De Olmos (1972-239), los resultados podrían explicarse si se hubieran producido alteraciones en la radiación hipotalámica existente en la división supracomisural del componente dorsal de la estria terminal, que proyecta específicamente desde los núcleos cortical y medial de la amígdala a la región preóptica medial e hipotálamo, pero no al NEST. Sin embargo, no se habrían afectado la división retrocomisural del componente dorsal de la estria terminal, que conecta dichos núcleos amigdalinos con el NEST y región preóptica; tampoco parece haberse afectado la efectividad del componente ventral de la ST, formado por fibras originadas en los n. medial y basolateral de la amígdala que terminan postcomisuralmente en el NEST y en la región preóptica.

Esta interpretación de nuestros resultados estaría de acuerdo con algunos estudios de aislamiento social que demuestran la existencia de alteraciones en las aferencias amigdalinas sobre neuronas del APM a través de la stria terminalis (Sánchez-Toscano y col, 1991), que quizás tienen su origen en

alteraciones de las propias neuronas amigdalinas. En este sentido, se ha comprobado que existe degeneración en neuronas amigdalinas de perros aislados (Zhavaniia, 1989). En cuanto a los resultados negativos de nuestro estudio, existen evidencias de que el aislamiento social desde una época temprana, concretamente en monos, tampoco produce alteraciones en el NEST (34), aunque este estudio se refiera a alteraciones de tipo neuroquímico. Todas estas evidencias nos permiten sugerir que el aislamiento social temprano podría producir cambios selectivos de neurotransmisión en regiones cerebrales específicas, sin afectar otras.

Los efectos del aislamiento social sobre las vías estudiadas por nosotros podrían haberse producido mediante alteraciones de los sistemas de neurotransmisores o de neuropéptidos presentes en la estría terminal. Así, el incremento de efectividad de las vías inhibitorias que se produce en las ratas aisladas podría deberse, por ejemplo, a un incremento de la proyección inhibitoria directa (monosináptica) desde el AME, mediada por sistemas como el encefalinérgico (**Sawada y Yamamoto, 1981-198**), GABA-érgico (Le Gal-La Salle y col., 1978-209), o somatostatinérgico (McDonald, 1987-214).

Por otra parte, la disminución de efectividad de la vía excitatoria estudiada podría tener su origen en la reducción de los sistemas de neurotransmisores o neuropéptidos excitatorios, como por ejemplo el glutamato (**Sawada y Yamamoto, 1981-198**) o la neurotensina (Sawada y col., 1980-220; Woodhams y col., 1983-2224). Si bien esta hipótesis sería válida para explicar la disminución de respuestas excitatorias monosinápticas, hay que tener en cuenta que existían bastantes células en APM y NPV que parecían excitarse a través de una vía oligo o polisináptica, de modo que en este caso no podemos averiguar qué sistemas pueden haberse alterado desde la AME hasta APM o NPV.

Si se produjera un incremento de las aferencias amigdalinas inhibitorias a APM y NPV esto podría, además, modular la actividad de las vías excitatorias amigdalinas sobre las mismas zonas. Este efecto modulador de la excitación se ha descrito, concretamente para la somatostatina, cuya aplicación reduce el incremento de descarga inducido por el sistema glutamatérgico procedente del AME sobre las células preópticas (50-paperelcisol). La situación podría complicarse aún más si consideramos la posibilidad de que se incrementen

también otras aferencias inhibitorias de origen no-amigdalino sobre las células estudiadas.

Teniendo en cuenta que el aislamiento social se produce desde un período temprano de la vida de los animales, las alteraciones que se producen en las proyecciones del n. medial de la amígdala a APM y APL podrían tener su origen en alteraciones de la normal maduración o desarrollo de los sistemas neurotransmisores implicados, quizás debido, en parte, a las elevaciones en los niveles plasmáticos de B que experimentan los animales de esta edad ante la situación de aislamiento (29,60,65). En este sentido, ya hemos comentado anteriormente el trabajo de Vázquez y Akil (1992-94), en el que se hace referencia a la inmadurez de las vías nerviosas extrahipotalámicas que convergen sobre las neuronas del NPV hipotalámico que sintetizan y liberan CRH y AVP, alrededor del período del destete. Algunas de estas vías parecen alcanzar el patrón adulto de operacionalidad alrededor de la cuarta-quinta semana de vida postnatal en la rata(43-45 de 94 tesis).

* Sin excluir los anteriormente expuestos, podría haber otros mecanismos determinantes de las alteraciones encontradas en los animales aislados. Concretamente, vamos a comentar dos de ellos:

1) La posible alteración de la sensibilidad de sistemas receptores de neurotransmisores en las células estudiadas. En este sentido, por ejemplo, los bajos niveles basales de B de los animales aislados podrían provocar un incremento de sensibilidad del sistema receptor de NA, como ha sido observado tras ADX por **Mobley y Sulser (1980-199)**, mientras que la elevación de los niveles basales de B, como sucede en estrés crónico, reduce la sensibilidad de dicho sistema (Stone, 1979- en 199 tesis). Teniendo en cuenta que la NA inhibe la descarga inducida por estimulación de aferencias amigdalinas excitatorias sobre las células preópticas (44), cuyas aferencias noradrenérgicas parecen proceder mayoritariamente del FTM (Ungerstedt, 1971-en 44-papereleisol), el incremento de sensibilidad del receptor de NA en estas células podría reducir la respuesta excitatoria de las mismas por estimulación de AME en los animales aislados.

2) Alteraciones en los mecanismos de retroalimentación negativa por glucocorticoides. Las acciones supresoras de los corticosteroides sobre la actividad adrenocortical, además de producirse a nivel del NPV a través de receptores para estas hormonas esteroideas (Ceccatelli y col, 1989-134; Cintra y col. 1987-195; McGimsey y col., 1991-106; Uht y col., 1988-183), se ejercen también sobre la actividad funcional de aferencias extrahipotalámicas al NPV (Herman y col., 1989:26 de manuscrito ADX; Saphier, 1987:41 de manuscrito ADX). En este sentido, se han encontrado receptores de corticosteroides en el sistema límbico, incluyendo áreas como el n. medial de la amígdala (Cintra y col., 1987-195; Warembourg, 1975-191) y el NEST (Cintra y col., 1987-195; De Kloet y col., 1993-175), mientras que en el APO se han descrito neuronas que son sensibles a glucocorticoides (42) y la integridad de este área parece necesaria para una retroalimentación negativa adecuada de los corticosteorides (Feldman y Conforti, 1980-187). Teniendo en cuenta el efecto supresor de los corticosteroides sobre la actividad de los núcleos en los que hemos realizado los registros electrofisiológicos, los niveles basales disminuidos de B en los animales aislados podrían haber favorecido el incremento de la respuesta excitatoria de las células a la estimulación amigdalina, en lugar de la disminución observada en el NPV y APM. Esta contradicción sólo podría explicarse si se incrementara el efecto de retroalimentación negativa de los corticosteroides en estos núcleos tras el aislamiento social mediante, por ejemplo, un incremento de los receptores de corticosteroides (o de su afinidad), como se ha comprobado que sucede tras ADX en sistema límbico e hipotálamo (Spencer y col, 1991-107). O bien, sería posible si consideramos la combinación con otro tipo de alteraciones. Así, por ejemplo, existen evidencias que demuestran que la depleción de aferencias excitatorias sobre células que contienen CRH en el NPV, incrementa el efecto supresivo que tienen los glucocorticoides sobre la secreción de B en plasma en respuesta a ciertos tipos de estrés (Feldman y Weidenfeld 1991-181).

Nosotros nos inclinamos a pensar que las alteraciones encontradas en el estudio electrofisiológico en los animales aislados no son principalmente debidas a los niveles disminuidos de B circulante. Y para ello nos apoyamos en resultados obtenidos por nuestro equipo en un estudio

electrofisiológico en el NEST y APO paralelo al expuesto en esta tesis, con animales adrenalectomizados (datos sin publicar):

Por una parte, la ADX bilateral no alteró la actividad espontánea de las células registradas en NEST y APO, en contraste con la disminución de actividad basal detectada por nosotros concretamente en el APL de animales aislados. Por lo tanto, en este último caso debería existir un tipo de mecanismo distinto a la disminución de los niveles basales de B. En cuanto a las alteraciones que provocó en la respuesta de las células a la estimulación de la AME, la ADX incrementó el número de células del NEST que eran excitadas y redujo la cantidad de células que resultaban inhibidas, sin alterar el porcentaje de células que no respondían a la estimulación. En cambio, la ADX no alteró la respuesta de las células preópticas a la estimulación de la AME, sugiriendo que dicha respuesta es glucocorticoide-independiente. Estos resultados son opuestos a los obtenidos tras aislamiento social, por una parte porque en los animales aislados las alteraciones de respuesta se produjeron en el APO, pero no en el NEST y, por otra parte, porque la ADX provocó un incremento de excitación y una disminución de inhibición, justo lo contrario que el aislamiento social. A la vista de todo ello, no parece que los efectos del aislamiento en los núcleos estudiados tengan su origen en los bajos niveles circulantes de B, los cuales, si produjeran algún tipo de modulación, podría ser enmascarada o superada por la gran potencia de la activación trans-sináptica de las vías nerviosas que estamos estudiando.

COMENTARIOS GLOBALES. (figura 6)

Como resumen de este apartado de discusión, y ateniéndonos a las conclusiones que se pueden extraer de un modo razonablemente claro, vamos a realizar una serie de comentarios a la vista de la figura 6.

Ya hemos comentado anteriormente que el aislamiento prematuro y prolongado en ratas inducía hipoadrenocorticismo en la época adulta, tanto en situación basal como en respuesta al estrés. Los cambios electrofisiológicos discutidos mostraban que la hipofuncionalidad de la vía extrahipotalámica estudiada se producía fundamentalmente tras activación de la vía y no en situación basal (como se ve en la figura 6), lo cual parece indicar que las alteraciones son diferentes en ambas situaciones. Se mantiene así la tónica general encontrada hasta ahora en nuestros resultados de otros apartados (¡¡DECIR CUÁLES!!), en los cuales los efectos del aislamiento social eran más drásticos sobre la respuesta de los animales a estímulos estresantes que en situación basal. Estos resultados podrían deberse a que la secreción basal de CRH está regulada por una vía nerviosa diferente de la secreción inducida por estrés (Keller-Wood y Dallman (1984-51), resultando menos alterada por el aislamiento social.

//////////La amígdala parece participar en ambos tipos de control: basal (Matheson y col, 1971 en 204-tesis; 49 de paper elcisol) o en respuesta al estrés como la inmovilización (Van de Kar y col., 1991-205; ACE: Beaulieu y col, 1987-204), como se ve en la figura 6.(¿Hacer un esquema de vía hipotética de control basal de la secreción de B? El control basal de la actividad HHA parece mediada via estructuras interconectadas por medio de la vía amigdalofugal ventral así como proyecciones hipocampales multisinápticas al área preóptica (Herman y col, 1990, 30 de manuscrito-isol).//////////

Ya había sido propuesto con anterioridad que las alteraciones de los lazos afectivos y de la experiencia social, como sucede, por ejemplo, en el caso del aislamiento de la madre y demás compañeros de camada, provocan una disfunción hipotalámica que podría tener su origen en la alteración de la actividad límbica, especialmente de la amígdala y de sus vías al hipotálamo, incluyendo la estría terminal y la vía ventral amigdalofugal (Reite y Capitano, 1985: Social

separation and social attachment; libro: "The psychobiology of attachment and separation". pg.243). Esta hipótesis parece confirmarse a la vista de nuestros resultados electrofisiológicos y de otros trabajos que relacionan las alteraciones de comportamiento, expresión emocional y respuestas a estímulos externos que se producen tras el aislamiento social con una actividad anormal en el sistema límbico y áreas de relé sensorial(26), así como con cambios ultraestructurales en la amígdala, hipocampo y cortex cerebral, que indican neurodegeneración en estos centros (68). Nuestros resultados, además, parecen apoyarse con los encontrados en otras situaciones en las que se las alteraciones de la actividad HHA basal y en respuesta al estrés, como es el caso de razas de ratas emocionalmente diferentes, parecen deberse a modificaciones de la neurosecreción de CRH originadas en alteraciones de los sistemas neurotransmisores límbicos que convergen en las células del NPV (66).

4.5.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LOS EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOBRE EL CAMPO DENDRÍTICO DE NEURONAS DEL AREA PREÓPTICA.-

1.- Ambito del trabajo.-

En el apartado anterior de la discusión hemos comentado ciertos efectos del aislamiento social sobre la actividad espontánea y la respuesta a la estimulación de la amígdala de neuronas del APO y del NPV. En estas regiones cerebrales se observó una disminución en la efectividad de las vías excitatorias, así como un incremento en la efectividad de los sistemas inhibitorios desde el AME, además de un incremento del número de células que no respondían a la estimulación amigdalina. Por tanto, se proponía que en los animales aislados se reduciría la respuesta en el APO y en el NPV frente a los estímulos que proceden de la amígdala medial, lo cual podría estar relacionado con la hiposensibilidad encontrada en el sistema HHA en situaciones de estrés agudo. Los cambios mencionados podrían estar relacionados con modificaciones en la sinaptología de las células registradas, lo cual sería indicativo, a su vez, de alteraciones más amplias en los circuitos implicados. Para comprobarlo,

realizamos los estudios detallados previamente en Material y Métodos referentes a dos tipos neuronales dentro del APO: a) por una parte, desarrollamos el estudio de la densidad de espinas dendríticas en neuronas del área preóptica medial estriar, ya que éstas reciben aferencias amigdalinas bien caracterizadas anatómicamente sobre sus dendritas "orientadas" (Raisman y Field, 1973). Y por otra parte, b) realizamos la cuantificación de una serie de parámetros indicativos del campo receptivo de neuronas del APL, pertenecientes a un tipo previamente definido por nosotros, con el fin de comprobar si los efectos producidos por el aislamiento social, de haberse producido, respondían o no a un patrón general de alteración dentro del área preóptica. Es interesante recordar aquí que tanto el APM, como el APL parecen estar implicadas en la regulación de la actividad del eje HHA a través de sus eferencias al NPV, tal y como se ha comentado ampliamente en capítulos anteriores (8,53,58,62:elcisol-manusc.; Simerly y Swanson, 1988-229). El conocimiento de la plasticidad sináptica de las neuronas de este área supondría, según nuestros planteamientos, un avance en el conocimiento de los cambios en el eje HHA ante la situación de aislamiento tras el destete prematuro objeto de nuestro estudio.

Como se había comentado extensamente en Introducción, la conclusión que puede sacarse a la vista de una extensa bibliografía al respecto, es que la pobreza o riqueza de estímulos del entorno ambiental del animal influye, de alguna manera, en la complejidad de recepción e integración de sus centros nerviosos, lo cual se basa en cambios de los circuitos existentes en ellos. Estos cambios son detectables a través del estudio cuantitativo de una serie de parámetros neuronales indicativos del campo receptivo neuronal, tales como longitudes dendríticas, órdenes de ramificación, densidades dendríticas, número de espinas dendríticas, etc., los cuales se han mostrado muy plásticos frente a diferentes situaciones experimentales.

Por lo tanto, nuestra pretensión de estudiar la plasticidad neuronal en aislamiento social del APO como elemento indicativo de posibles reajustes en la sinaptología de la misma, parecía justificada. Sin embargo, la interpretación de nuestros resultados ha sido particularmente difícil ya que los datos obtenidos no concordaban, en principio, con la hipótesis previamente establecida sobre criterios

convencionales. Ello hizo que nos planteáramos mecanismos de plasticidad algo diferentes a los clásicamente establecidos, así como hipótesis alternativas sobre la naturaleza de la situación experimental estudiada.

2.- Importancia de los procesos de desarrollo cerebral en los efectos del aislamiento social

Un aspecto importante a comentar antes de pasar a discutir nuestros resultados, es el efecto que pueden tener el destete prematuro (a los 15 días de edad) y el aislamiento prolongado posterior (durante 2 meses) en los procesos de desarrollo y maduración de las neuronas del área preóptica de rata.

En primer lugar, los quince días es una edad en la que el cerebro de la rata se encuentra inmerso en un importante desarrollo sinaptogénico que comprende aproximadamente las tres primeras semanas de vida (Aghajanian y Bloom, 1967; Dobbing, 1974). Los cambios detectados en este período afectan a todos los parámetros relacionados con la conectividad, tanto a nivel de microscopía óptica, como a nivel ultraestructural. En lo referente a las espinas y arborización dendrítica, la mayoría de los trabajos se han centrado en la corteza cerebral, constatándose de un modo general para la rata una importante sinaptogénesis en los 25 primeros días (Eayrs y Goodhead, 1959; Schade y col, 1964), seguido de un período de maduración más suave que dura aproximadamente hasta el cuarto mes de vida, durante el cual se llega a una estabilización transitoria del incremento de estructuras receptoras (Sánchez-Toscano, 1980; Sala, 1981; Rihn y Claiborne, 1990-226). El nacimiento tampoco marca el final del desarrollo sinaptogénico en el hipotálamo de rata, de modo que la maduración de las estructuras y de la organización sináptica continúa de forma intensa hasta la segunda semana de vida postnatal (633,634 de Page, 1988). Concretamente en relación con la sinaptogénesis en el área preóptica, y más concretamente en el APM, se ha descrito que existen sinapsis maduras en el APM de ratas recién nacidas, aunque son escasas en número (Reier y col, 1977-291). La cantidad de sinapsis se incrementa fuertemente entre los 5-15 días de edad, y sigue aumentando hasta los 25 días, momento en que parece estabilizarse en los niveles del adulto. Concretamente las sinapsis sobre espinas dendríticas se desarrollan de forma mayoritaria entre los 10-25 días de edad. La cronología de estos fenómenos sinaptogénicos en el

APO nos hace sugerir que el aislamiento social desde el día 15 postnatal puede haber afectado la maduración definitiva de los contactos sinápticos sobre las neuronas preópticas, produciendo con ello alteraciones tanto el número como el tipo de sinapsis sobre las células.

De los trabajos de plasticidad neuronal se extrae la conclusión de que son los períodos de máxima sinaptogénesis los que se muestran más "plásticos" y susceptibles de experimentar cambios frente a situaciones anómalas. En nuestro experimento, el destete prematuro a los 15 días de edad, seguido del aislamiento social, supone un cambio drástico de las condiciones ambientales en las que se desenvuelve el animal, lo cual tiene como consecuencia las alteraciones funcionales y comportamentales encontradas, que tendrán su base estructural en procesos sinaptológicos posiblemente alterados durante el período comprendido entre el día 15 y el 75 de vida. Los cambios ambientales a los que nos referimos abarcan desde el empobrecimiento de estímulos sensoriales, hasta la privación materna, con todo lo que ésta conlleva, así como la carencia de experiencias sociales con los compañeros de camada. Todo ello, en un momento especialmente sensible o "crítico" de la vida del animal (justo antes del destete) en el cual las repercusiones de estas alteraciones pueden ser sinaptológicamente importantes. También hay que considerar que no todas las neuronas de un centro nervioso tienen un mismo ritmo de formación de sinapsis. En este sentido, se toma como regla general que las neuronas de axón largo con papel efector se diferencian y maduran antes que las interneuronas, además de que éstas están más influidas por el entorno aferente (Jacobson, 1974; Jacobson, 1978). Las neuronas objeto de nuestro estudio han sido consideradas de un modo general como posibles interneuronas (Valverde, 1965), lo cual apoya la idea de que pueden ser especialmente plásticas en el establecimiento de sus contactos sinápticos.

Por último, la edad de estudio escogida (75 días) constituye una edad adecuada para nuestros propósitos, ya que las ratas son animales adultos, de modo que el tiempo transcurrido desde el momento del aislamiento es adecuado para estudiar fenómenos de plasticidad neuronal pero, a la vez, los animales no están sujetos todavía a procesos de envejecimiento (Machado Salas y col, 1977; Vaughan, 1977; Ruiz-Marcos y col, 1992).

3.- Efecto del aislamiento social sobre la densidad de espinas dendríticas de neuronas del área preóptica medial estrial (APM-ST).-

Dentro del área preóptica medial existen varias condensaciones celulares o núcleos, entre los que se encuentra la denominada "parte estrial del área preóptica" (APM-ST), estudiada en detalle por Raisman y Field (1973). En secciones teñidas mediante el método rápido de Golgi estos autores describen que los axones de la estría terminal (procedentes de la amígdala) cursan verticalmente en dirección ventral en esta región, lo cual coincide con lo observado por Valverde (1965). Las neuronas estudiadas por nosotros en el APM-ST (descritas en Resultados) corresponden al tipo descrito por Raisman y Field (1973-241), presentando somas de tamaño pequeño o mediano, y dendritas varicosas características con pocas espinas, orientadas en el plano horizontal en dirección latero-medial desde los somas, de modo que hacen intersección en ángulo recto con los axones de la estría terminal, estableciendo los correspondientes contactos sinápticos con ellos.

Aunque los límites entre el APM-ST y la región ventral del NEST no son claros, los tipos neuronales son claramente diferenciables por su distinta morfología: las células del NEST tienen somas sustancialmente mayores (Ju y Swanson, 1989-193), y sus troncos dendríticos están más ramificados y extendidos en todas direcciones, presentando abundantes espinas dendríticas, tal y como había sido descrito por Valverde (1965).

Desde el punto de vista cuantitativo, en los animales criados en aislamiento social hemos encontrado un incremento en la densidad de espinas dendríticas en las dendritas "orientadas" de neuronas del APM-ST, que representa un 23% más que en los animales control.

Teniendo en cuenta que la densidad de espinas dendríticas es un índice de conectividad neuronal, el aumento que observamos en los animales aislados reflejaría un incremento en el número de contactos sinápticos de tipo axo-espinoso que presentan las neuronas del APM-ST, indicativo de un mayor número de aferencias. Además, este incremento supone no sólo mayor recepción de información, sino también un mayor grado de complejidad en la integración de esta información aferente, si consideramos el papel funcional de las espinas

dendríticas según las interpretaciones de Diamond y col (1970), Coss y Perkel (1985), Pongracz (1985) y Jaslove (1992).

- Posible intervención de la estría terminal en los cambios detectados.- Nuestros resultados son especialmente interesantes, si tenemos en cuenta que las espinas dendríticas de las neuronas del APM-ST son receptoras de aferencias amigdalinas a través de la estría terminal y que la conectividad entre estos axones estriales y las espinas dendríticas de las neuronas estudiadas, constituye aproximadamente el 34% del total de las sinapsis axo-espinosas en este área (Raisman y Field, 1973). Se podría sugerir, por tanto, que el aumento de densidad de espinas dendríticas tras el aislamiento social está condicionada, en parte, por cambios funcionales y/o estructurales en la estría terminal, los cuales supondrían, de un modo u otro, un incremento del input aferente amigdalino a las neuronas del APM-ST.

Esta idea está basada en la interpretación más convencional de este tipo de resultados, consistente en que el número y forma de las espinas dendríticas se ven influidos por la presencia y estado funcional de los axones aferentes, de modo que un incremento de las estructuras postsinápticas debe corresponderse con un incremento en número y/o actividad de estructuras presinápticas. Se trataría, por lo tanto, de un caso de inducción directa (Globus y Scheibel, 1966). Esta inducción directa fué puesta de manifiesto experimentalmente en trabajos en los que se provocaba una degeneración en una vía nerviosa, o bien un descenso de actividad en ella. Los ejemplos más ilustrativos son los estudios realizados en neuronas de la corteza visual en rata o ratón, mediante dos tipos de manipulación: enucleación o cría de animal en oscuridad. La enucleación monocular tras el nacimiento determinaba un descenso de espinas dendríticas en los tallos apicales de las neuronas piramidales de la capa V, a nivel de la capa III-IV, principal receptora de aferencias específicas visuales (Globus y Scheibel, 1967; Valverde, 1967; Valverde y Ruiz-Marcos, 1967; Ryugo y col, 1975; Sánchez-Toscano, 1980). Los resultados tras la cría en oscuridad o sutura de párpados eran similares en este aspecto tanto en rata (Filková, 1967, 1968), como en gato (Cragg, 1975). Por otra parte, y apoyando la misma idea, se ha demostrado

que una sobreestimulación experimental de las vías sensoriales provoca un incremento de espinas dendríticas en las correspondientes neuronas corticales receptoras (Rutledge y col, 1975).

Según este mecanismo de inducción directa también podrían ser explicados, en líneas generales, los resultados encontrados en la bibliografía relativa a los efectos de enriquecimiento o empobrecimiento ambiental sensorial sobre el desarrollo de sinapsis de un área cortical concreta.

Frente al razonamiento anterior, o mejor, además del razonamiento anterior, hay un hecho a tener en cuenta y es la constatación de que la mayor parte de las sinapsis que se establecen sobre las dendritas orientadas del APM-ST (el 88%) no lo hacen sobre las espinas, sino sobre los troncos dendríticos (Raisman y Field, 1973). Esto plantea la posibilidad de que el incremento de espinas dendríticas encontrado por nosotros en los animales aislados no sea debido a un fenómeno de inducción directa, sino al fenómeno denominado inducción heterotópica por Hámori (1973). Este autor postula la hipótesis de que el desarrollo y mantenimiento de las espinas de los tallos apicales de las neuronas piramidales de corteza pueden depender de la estimulación de la ramificación dendrítica basal de estas neuronas. El mismo fenómeno ha sido comprobado en las espinas de las dendritas de las células de Purkinje del cerebelo, en relación con la presencia de fibras trepadoras que no establecen contacto directo con ellas. En la misma línea de razonamiento se encuentran otros estudios que detectan una respuesta neuronal integrada o "como un todo" frente a sus aferencias (Bradley y Berry, 1978; Berry y col, 1978). Aunque posible, en nuestro caso es difícil constatar una inducción de este tipo, dada la pobreza de estructuras dendríticas de las neuronas estudiadas y la dificultad de detectar un proceso global en sus estructuras. No obstante, el alto porcentaje de conectividad no-espinosa en estas neuronas, lleva a pensar en la validez de esta posibilidad. Es decir, las espinas dendríticas podrían haber sido inducidas (y más tarde mantenidas) mediante el incremento de aferencias específicas estriales sin que establezcan necesariamente sinapsis directa sobre ellas, sino sobre otras regiones de la neurona.

- Posible origen no-estrial de los cambios encontrados.-

Aunque las neuronas elegidas para el estudio tienen relativamente bien caracterizadas sus aferencias estriales sobre las espinas dendríticas, hay que considerar que existe también un gran porcentaje de aferencias de origen no-amigdalino que realizan sinapsis sobre estas estructuras de las neuronas del APM-ST (66%) según Raisman y Field (1973-241). Por lo tanto, existe también la posibilidad de que el fenómeno de incremento de espinas dendríticas encontrado en las neuronas del APM-ST de animales aislados venga mediado por otros sistemas aferentes que, como el fascículo telencefálico medial (FTM), se sabe que inervan estas regiones (Lindvall y Björklund, 1974-246). Aunque no se conoce exactamente el origen de los terminales axónicos de origen no-amigdalino sobre las neuronas del APM-ST (Raisman y Field, 1973-241), parece que el APM en general recibe numerosas colaterales del FTM descendente, especialmente del componente septal, además de contribuir al neuropilo del FTM enviando colaterales axónicas que terminan sobre neuronas de paso (Millhouse, 1969-248). Se han descrito aferencias al APM con origen en: septum medial y lateral (Swanson y Cowan, 1979; Berk y Finkelstein, 1981-245), subículo ventral (Berk y Finkelstein, 1981-245), NEST, NPV (Conrad y Pfaff, 1976), sustancia gris central del mesencéfalo, n. arcuato, n. ventromedial y núcleos del rafe (Chiba y Murata, 1985; Berk y Finkelstein, 1981-245). Además, existen algunas evidencias morfológicas y electrofisiológicas de la existencia de proyecciones corticales al APM, en concreto desde el córtex cingulado e hipocampo (Kazakov y col, 1992-254).

El carácter disperso de todas estas aferencias hace pensar, de un modo intuitivo, que su incidencia en la fisiología y morfología de las neuronas preópticas mediales debe ser comparativamente menor que el componente estrial, el cual se pone de manifiesto de un modo evidente. Apoyando esta idea están nuestros propios resultados electrofisiológicos y los trabajos reseñados en su momento, que demuestran una gran conectividad entre la amígdala y el APM. No obstante, más adelante trataremos con mayor profundidad el posible papel del FTM.

Un punto muy importante en este punto de la discusión, es el de establecer la relación existente entre nuestros resultados electrofisiológicos con los morfométricos.

En base a datos ultraestructurales parece que la mayoría de sinapsis sobre espinas dendríticas son de tipo I (Gray, 1959) o asimétrico (Colonnier, 1968-292), constituyendo mecanismos sinápticos principalmente excitatorios (27,28 de Raisman y Field, 1973). Aunque este criterio ultraestructural no parece determinante, si consideramos que las espinas dendríticas contabilizadas por nosotros en las neuronas del APM-ST son excitatorias (Raisman y Field, 1973), el incremento de densidad encontrado en los animales aislados significaría que se ha producido una potenciación de las aferencias (estriales y/o no-estriales), lo que llevaría a una mayor excitación de las neuronas y posiblemente del área en su conjunto. Esta interpretación es difícil de conciliar con los resultados electrofisiológicos, que indicaban (como ya hemos comentado) una reducción en la eficacia de las vías excitatorias amigdalinas al área preóptica medial. Nuestra hipótesis previa, que consistía en suponer la existencia de un descenso en la densidad de espinas dendríticas, tuvo que desestimarse, obligándonos a plantear otras interpretaciones alternativas:

1) La primera de ellas sería pensar que este tipo neuronal podría jugar un papel de interneurona inhibitoria que recibe aferencias amigdalinas excitatorias y posteriormente modula la actividad de las neuronas del APM registradas electrofisiológicamente. Sin embargo, las cortas latencias de inhibición hacen pensar en una respuesta monosináptica mediada por la estría terminal y, por tanto, en una inhibición directa sin intervención de interneuronas.

2) Otra posible explicación sería que las aferencias nerviosas incrementadas en las neuronas de los animales aislados fueran esencialmente inhibitorias. En este sentido, se ha sugerido la posibilidad de que existan sinapsis axo-espinosas de naturaleza inhibitoria, concretamente en el n. ventromedial hipotalámico (Field, 1972-242), basándose en la presencia de sinapsis simétricas sobre las espinas dendríticas así como en evidencias electrofisiológicas de una acción inhibitoria. Dicho criterio podía ser extendido a las neuronas del área preóptica, donde el mismo trabajo encuentra de un modo general que el 15% de las sinapsis axo-espinosas son de tipo simétrico. En este caso, quizás el incremento de espinas dendríticas que hemos encontrado en las neuronas del APM-ST de los animales aislados podría reflejar un incremento de aferencias inhibitorias de origen amigdalino (y/o no-amigdalino), que se puede estar produciendo también en las

sinapsis axo-dendríticas. El efecto sería, en este caso, directo y justificaría los resultados electrofisiológicos. En cualquier caso, sólo podemos hacer especulaciones al respecto, ya que habría que comprobar ultraestructuralmente el tipo de sinapsis axo-espinosa en animales aislados, así como el grado de funcionalidad de estas sinapsis, etc. Igualmente, sería interesante estudiar el papel de la estria terminal en el efecto encontrado. En este sentido, conviene recordar que en ratas aisladas se produce un incremento de células del APM que no responden a la estimulación de la amígdala medial, lo cual puede significar una pérdida de aferencias estriales, en favor de otro tipo de aferencias sobre las neuronas.

4.- Efecto del aislamiento social sobre el campo receptivo de las neuronas rostrales multipolares del área preóptica lateral (APL).-

A la vista de los resultados electrofisiológicos, las alteraciones observadas en el APO parecían ocurrir principalmente en el APM, aunque en el APL existían también resultados que apuntaban en el mismo sentido. Nos planteamos, pues, estudiar en el APL los efectos del aislamiento social sobre el campo receptivo neuronal, con el fin de comprobar si las alteraciones encontradas en el APM-ST respondían o no a un fenómeno generalizado dentro del área preóptica, que afectara a poblaciones neuronales con distinta conectividad.

4.1.- Descripción del APL: conectividad y tipos neuronales.-

Como hemos comentado anteriormente, el área preóptica puede dividirse en una parte medial, densa en células y una división lateral (**Bleier y Byne, 1985-234**) a través de la cual pasa el largo sistema de fibras que constituyen el FTM que interconecta una gran variedad de estructuras telencefálicas con el hipotálamo y el tegmento mesencefálico (**Valverde, 1965-249**) (Ver esquema número X, anexo...). El APL es, por tanto, una zona interesante de estudio debido a la recepción de un importante contingente de fibras procedente, vía FTM, de la amígdala, septum, cortex frontal, tálamo, así como por su implicación en el control de funciones endocrinas. La diversidad de origen de sus aferencias determina que las neuronas del APL presenten una conectividad difusa, lo cual plantea problemas tanto metodológicos como de

interpretación de resultados. Por estos motivos, en nuestro estudio decidimos realizar la cuantificación global de todo el campo receptivo (espinas dendríticas y campo dendrítico) de neuronas que por su homogeneidad de características morfológicas y localización constituyeran una población bien definida.

El tipo neuronal estudiado por nosotros se localizaba en el APL rostral, de acuerdo con los criterios de Bleier y col. (1979-233), Millhouse (1969-248) y Valverde (1965-249). Las características de las neuronas del APL han sido descritas escasamente y principalmente en trabajos descriptivos globales del FTM. Así, Millhouse (1969-248), por ejemplo, describió un tipo neuronal que denominó neuronas "de paso" por recibir aferencias de colaterales de las fibras del FTM y que se caracterizaban por sus dendritas largas y pobremente ramificadas, orientadas perpendicularmente a las fibras del FTM. Las células descritas por Valverde (1965-249) en el área preóptica tienen axones que se extienden sólo una corta distancia, somas de tamaño medio y forma ovoide, escasas dendritas que se ramifican en todas direcciones, y sobre las que hacen sinapsis los axones de la estría terminal.

La descripción realizada por McMullen y Almlí (1981-250) es especialmente interesante, ya que se centra en los tipos neuronales que existen, concretamente, en el APL-AHL. Estos autores encuentran 3 tipos neuronales distintos basándose criterios de forma y tamaño del soma, así como de la morfología dendrítica:

- Neuronas Clase I, de soma fusiforme, multipolares con 2-5 dendritas escasamente ramificadas y moderadamente espinosas. Presentan gran extensión dendrítica y se orientan perpendicularmente a las fibras longitudinales del FTM.
- Neuronas Clase II, de somas grandes, multipolares con 2-5 dendritas bastante ramificadas y espinosas, y dominio dendrítico extenso.
- Neuronas Clase III, de somas pequeños, 2-3 dendritas escasamente ramificadas y arborización dendrítica de escasa extensión. Presentan tanto dendritas espinosas como no espinosas.

Nosotros hemos encontrado estos tres tipos neuronales en las preparaciones de Golgi, siendo nuestras observaciones sobre ellos coincidentes, en líneas generales, con la descripción realizada por McMullen y Almlí (1981-250). No obstante, la expresión más clara de sus características la encontrábamos

a nivel del AHL, mientras que en el APL mostraban una mayor variabilidad y además, un gradiente de variación morfológica rostro-caudal.

Para nuestros propósitos de estudiar cuantitativamente variaciones en un tipo neuronal es imprescindible, como ya hemos dicho, que haya poca variabilidad en los parámetros estudiados, es decir, que sea homogéneo, fácilmente diferenciable y no dependa de su localización, lo cual no se cumplía en los tipos anteriormente mencionados.

En este sentido, encontramos en regiones rostrales del APL una población neuronal bien definida que reunía mejor los requisitos antes mencionados pero que no había sido, al menos expresamente, descrita con anterioridad. Esta población de neuronas multipolares rostrales del APL estudiada por nosotros comparte las características morfológicas del tipo neuronal isodendrítico (Ramón-Moliner, 1975), también denominado reticular (Leontovich y Zhukova, 1963-251). Las neuronas de tipo isodendrítico se caracterizan por tener un soma de tamaño medio y ser multipolares, con pocas dendritas que suelen ser largas, de trayecto rectilíneo y escasamente ramificadas; las aferencias que reciben son fibras largas y pobremente ramificadas de procedencia diversa que emiten colaterales sobre las dendritas. Debido a esta estructura de su arborización dendrítica, y a la diversidad de aferencias que reciben, cada neurona isodendrítica tiene una gran capacidad de captación de impulsos de distinta procedencia, los cuales son sometidos a un proceso de integración relativamente sencillo.

Las neuronas multipolares rostrales del APL son, a nuestro juicio, claramente diferenciables de los tipos descritos en APL/AHL de rata por McMullen y Almlí (1981-250), tanto por el tamaño del soma (intermedio entre las de Clase II y III), como por su campo dendrítico de menor extensión y carente de orientación predominante. Para compararlas brevemente con otros tipos neuronales bien establecidos desde el punto de vista cuantitativo, como son las neuronas piramidales de la corteza cerebral y las neuronas magnocelulares del NSO, y a título ilustrativo, mencionaremos que:

1) Se trata de neuronas escasamente espinosas, ya que la densidad de espinas dendríticas es de 243 e/mm (en el APM-ST la densidad era de 217 e/mm, bastante parecido, por tanto), que es inferior a la encontrada en las neuronas piramidales de la corteza visual de rata (1430 e/mm en dendritas del

tallo apical y 820 en dendritas basales) según Feldman y Dowd (1974,1975). Sin embargo, son neuronas con mayor densidad de espinas que las neuronas magnocelulares hipotalámicas descritas en el n. supraóptico (NSO), que presentan una densidad de 45 e/mm (**Caminero y col, 1992-264**) o las del n. ventromedial (NVM), cuya densidad es de 50-60 e/mm (Frankfurt y McEwen, 1991-265). Dado que la densidad de espinas dendríticas supone un índice de conectividad neuronal, las neuronas piramidales de corteza recibirían más aferencias axo-espinosas en un segmento dendrítico de la misma longitud que las isodendríticas del APL o del APM-ST, y éstas más que las del NSO o NVM.

2) En cuanto a la frecuencia relativa de ramas de los distintos órdenes, y siguiendo el criterio centrífugo explicado en Material y Métodos, en el tipo neuronal estudiado en el APL predominaban las ramas de orden 2, seguidas por las de órdenes 3 y 4, situación parecida a la de otro tipo neuronal descrito en APO (Cherry y col., 1992-266). En neuronas bipolares y multipolares del NSO, en cambio, predomina el orden 1 (**Caminero y col, 1992-264**), lo cual indica que en el NSO las neuronas están menos ramificadas que nuestras neuronas del APL. Este resultado sugiere, por tanto, que en éstas existe mayor complejidad de integración de aferencias en las neuronas del NSO, lo cual coincide con lo comentado en relación a las espinas dendríticas.

3) Por otra parte, nuestras neuronas del APL presentan su máximo de densidad dendrítica en torno al soma neuronal a una distancia entre 30 y 100 μm del soma, mientras que las neuronas del NSO utilizadas como referencia tienen una densidad menor y más igualmente repartida, entre 20 y 240 μm de distancia al soma, de forma parecida al tipo neuronal preóptico descrito por Cherry y col. (1992-266). Estos datos de nuevo parecen apoyar la idea de que, dentro del tipo neuronal isodendrítico, las pequeñas neuronas multipolares rostrales del APL presentan un cierto nivel de especialización e integración de la información mayor que otras del APO y mucho menor, por supuesto, que el tipo piramidal de la corteza cerebral.

Por otra parte, por su pequeño tamaño y su estructura dendrítica se parecen al tipo descrito por Valverde (1965-249) de un modo general en estas áreas como interneuronas. Sin embargo, no podemos constatar este aspecto al no apreciarse bien el axón en nuestras preparaciones de Golgi.

La localización de estas neuronas del APL dentro del FTM permite pensar que puedan jugar un importante papel en circuitos implicados en esta vía, funcionando como neuronas que interconectan centros telencefálicos, entre ellos los límbicos, con núcleos hipotalámicos y del tronco cerebral.

4.2.- Efectos del aislamiento social.

La cría de los animales en aislamiento social desde etapas tempranas de su vida provocó un incremento de la densidad de espinas dendríticas (un 100%, es decir, aumenta al doble) en las neuronas multipolares del área preóptica lateral rostral (APL). Dicho aumento podría reflejar un incremento en el número de contactos sinápticos tras el aislamiento, similar a lo encontrado en las neuronas del APM-ST, aunque en éstas el incremento fué bastante menor (un 23.24%).

La interpretación de este resultado es similar a lo anteriormente comentado para el APM-ST, esto es, que el incremento de la densidad de espinas dendríticas normalmente indica que se ha producido un incremento en el número de contactos sinápticos axo-espinosos y, por tanto, de las aferencias.

Las neuronas del APL de los animales aislados presentaron, además, un incremento significativo de la ramificación dendrítica, lo cual es indicativo de una sinaptología incrementada también en los troncos dendríticos de las neuronas estudiadas dentro del APL tras la situación de aislamiento social.

Igualmente, existe una tendencia al incremento de las longitudes y las densidades en torno al soma (entre 60-100 μm de distancia) que, aunque no alcanza la significación estadística, sí apoya la tendencia al incremento de campo receptivo en las neuronas estudiadas. En resumen, varía ligeramente el patrón de ramificación, la cual es más abundante en los animales aislados, aunque la ley de distribución de densidades no cambia. Puede decirse que las diferencias radicarían tanto en la cantidad de información aferente como en su forma de procesamiento por parte de las neuronas del APL.

Tanto el incremento de espinas como de ramificación dendrítica encontrados apuntan de forma coherente hacia la existencia de un incremento generalizado de la sinaptología neuronal en el APO y, por tanto, de las aferencias.

No obstante, el comportamiento de las neuronas estudiadas en

el APL rostral muestra algunos matices importantes. En primer lugar, el incremento de campo dendrítico parece moderado en comparación con el fuerte aumento que se produce en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas del APL, lo cual pone de manifiesto que las espinas dendríticas son mucho más sensibles frente a los cambios que tienen lugar durante la situación de aislamiento social. El hecho de que los cambios en las aferencias incidan más directamente sobre el número de espinas que sobre el campo dendrítico en su conjunto ha sido puesto de manifiesto previamente, tanto en neuronas corticales (Sánchez-Toscano, 1980; Heutzman y Rabinowicz, 1982), como en células de Purkinje del cerebelo (Hollingworth y Berry, 1975). Valverde (1971) puntualizó, al respecto, que frente a la enucleación pueden diferenciarse dos poblaciones distintas de espinas dendríticas en los tallos apicales de las neuronas piramidales: una fijada estrictamente bajo control intrínseco de la célula y otra dependiente de la estimulación ambiental mediante un mecanismo de inducción. Si consideramos que el carácter intrínseco o genético de una estructura implica mayor estabilidad e independencia del medio, hay que hacer notar que el campo dendrítico presentaría un fuerte componente de este tipo. Esto queda claramente reflejado en trabajos sobre mutantes (Caviness y Sidman, 1972, 1973; Devor y col, 1975) o en cultivo de tejidos (Bunge, 1973; ¡¡BUSCAR MÁS!!).

El distinto comportamiento de espinas y troncos dendríticos tiene su posible explicación en el mecanismo de expresión de ambos componentes del campo dendrítico. Según evidencias ultraestructurales, las espinas dendríticas se pueden encontrar en distintos estadios de desarrollo, siendo observables al microscopio óptico como espinas de tipo "clásico" cuando están plenamente desarrolladas y son funcionalmente maduras (Freire, 1978-263). Es importante señalar que la transición entre los distintos estados de desarrollo es dependiente de la actividad de las aferencias en el entorno dendrítico. De acuerdo con estos datos, es fácil pensar en una gran plasticidad de estas estructuras postsinápticas, cuyos cambios numéricos muchas situaciones experimentales reflejan simplemente grados de desarrollo de las mismas, interpretables como procesos de formación ateniéndonos a lo observable mediante el método de Golgi. El desarrollo de árboles dendríticos es también el resultado de una interacción de factores genéticos y del entorno

neuronal (Berry y col, 1978; Changeaux y Mikashiva, 1978) pero su expresión implica, lógicamente, procesos más complejos y lentos, ya que afectan a la totalidad de la estructura dendrítica.

En resumen, el desarrollo de las espinas ya "esbozadas" supone un menor gasto energético para la neurona que la emisión de ramas dendríticas, lo cual explicaría que los cambios producidos por el aislamiento social sean más drásticos en las primeras estructuras.

Aunque en menor grado que la densidad de espinas dendríticas, el campo dendrítico se ve también influido por su conjunto particular de aferencias, pudiéndose establecer una relación entre sus características en una población neuronal concreta y la actividad funcional del centro nervioso al que pertenece (Rutledge y col., 1974-45 de trabajo hibernación Fernando; Sánchez-Toscano y col., 1977-46 de Ibidem; Scheibel, 1979-49 ibidem). En este sentido, se ha visto que la privación sensorial y la cría en ambientes pobres en estímulos provocan, al igual que en el caso de las espinas dendríticas, una disminución en la ramificación dendrítica en neuronas corticales de rata (Greenough y Volkmar, 1973; Globus y Scheibel, 1967). Esto se ha comprobado también en el caso del aislamiento social, incluso cuando se lleva a cabo en animales adultos (Green y col., 1983-261; 21-de 261 tesis). El mayor grado de ramificación dendrítica en los animales criados socialmente parece deberse a un mecanismo de crecimiento dendrítico nuevo en este grupo, más que a un fenómeno de retracción dendrítica en los animales aislados (Uylings y col, 1978-21 de 261-tesis). Parece, por tanto, que la complejidad del ambiente puede aumentar el grado de ramificación dendrítica y conectividad neuronal en poblaciones bien caracterizadas de la corteza cerebral en rata.

En estudios de aislamiento social desde el nacimiento realizados por Struble y Riesen (1978-258) en monos, también se encuentra una menor ramificación dendrítica en neuronas piramidales de ciertas áreas corticales (somatosensorial y motora), pero no de otras (cortex visual y prefrontal). El carácter específico de estos efectos del aislamiento social en monos ha sido también comprobado en el cerebelo, donde las células de Purkinje presentan somas más pequeños y una menor ramificación dendrítica, mientras que otras células cerebelosas como, por ejemplo, las células grano no presentan

variaciones (Floeter y Greenough, 1979-260). Estos autores proponen que el aislamiento social produce fenómenos específicos de plasticidad en ciertas áreas cerebrales, argumentando en contra de algún tipo de efecto generalizado sobre el crecimiento cerebral.

En estos casos que estamos comentando, el descenso de la ramificación dendrítica en neuronas corticales y cerebelosas de animales criados en aislamiento sería consecuencia tanto de la privación social como de la privación de estímulos sensoriales y de una mayor pobreza de asociación e integración senso-motora, idea ya propuesta por Prescott (1970).

Hasta ahora, los trabajos expuestos se centraban en centros nerviosos de conectividad relativamente bien establecida, como son la corteza cerebral y cerebelosa, donde además las células objeto de estudio eran importantes elementos rectores de sus correspondientes circuitos, con un claro papel efector (células piramidales y células de Purkinje). Su relación con la recepción de información, o bien con la elaboración de respuestas es relativamente clara y los resultados comentados son, en general, acordes con lo que cabría esperar en una situación de privación como es el aislamiento.

No ocurre lo mismo con el incremento de espinas dendríticas y campo receptivo constatado en nuestro trabajo en neuronas del APO, que sugieren la posibilidad de un comportamiento distinto en distintos circuitos nerviosos tras una situación de cría en aislamiento. En este punto, es interesante comentar el trabajo de Juraska y col (1985-262), que encuentra que el aislamiento social de ratas de 23 días de edad durante un mes induce un incremento en la densidad dendrítica alrededor del soma en células granulares del giro dentado hipocámpal. Los autores no hacen referencia a la densidad de espinas dendríticas, ni aportan una interpretación fisiológica de los resultados, pero es patente la similitud de sus resultados con los nuestros y la contraposición con la tendencia obtenida en otras regiones cerebrales. Es posible, e incluso lógico, que en el cerebro los diferentes grandes sistemas respondan diferencialmente frente a una situación anómala y que en nuestro caso concreto de aislamiento social, los circuitos límbico-hipotalámicos y neocorticales se comporten de forma diferente.

Pasando a un terreno más concreto, en cuanto a la

interpretación del incremento de campo dendrítico de las neuronas multipolares del APL rostral en animales aislados y en lo referente a la posible inducción del mismo, los razonamientos son parecidos a los ya comentados para el APM, poniendo, sin embargo, de manifiesto, las siguientes diferencias:

1) Al tratarse de un incremento global del campo dendrítico, tanto de espinas como de ramificación, parece más fácilmente asumible una inducción de tipo heterotópico determinante de un efecto generalizado.

2) No hay tanto problema en la delimitación concreta de las estructuras receptoras afectadas, pues parece tratarse de un efecto en conjunto. Las aferencias alteradas pueden incidir tanto sobre espinas como sobre troncos dendríticos o sobre ambos elementos. Además, facilita el asentimiento de que tales aferencias tengan carácter excitador o inhibitorio, ya que las sinapsis sobre troncos dendríticos pueden ser tanto simétricas como asimétricas.

Hay que recordar, sin embargo, que las longitudes de los árboles dendríticos no varían significativamente en nuestro experimento. Esto significa que aunque se da una mayor complejidad del campo receptor al aumentar la ramificación, su volumen no varía, por lo que no se puede pensar en que tenga lugar una extensión de la arborización dendrítica que permita un mayor alcance de estas células para la captación de aferencias distintas a la que tiene lugar en los animales control. En este sentido, las variaciones son menores que las encontradas en otros trabajos de este tipo.

A la hora de analizar los sistemas aferentes a las neuronas del APL que pueden haber resultado afectados por el aislamiento social, nos encontramos con un problema añadido: la conectividad difusa de este área. El APL es una zona de paso del FTM, vía común formada por fibras ascendentes y descendentes que conectan telencéfalo y mesencéfalo. Como ya se ha dicho, el FTM constituye un sistema efector común de fibras de regiones telencefálicas como el cortex piriforme, tubérculo olfatorio, cortex frontal, amígdala, septum... que se dirigen hasta niveles mesencefálicos (Valverde, 1965-249; **Ban 1966-238**; ANADIR MÁS REFERENCIAS CLÁSICAS: ¿¿Millhouse, 1969-248??). A su vez, se ha descrito un sistema ascendente de fibras en el FTM con origen en el tegmento mesencefálico (Cowan, Guillery y Powell, 1964; **Ban 1966-238**), que apoya la

existencia de un circuito cerrado "sistema límbico-mesencéfalo" ya sugerido por Nauta (1958). Por tanto, el APL constituye una extensión de neuropilo a lo largo de la cual existe una interacción continua entre sistemas olfatorios, límbicos, corticales, talámicos, hipotalámicos y mesencefálicos...De esta estructura, por tanto, emerge un programa coordinado de respuestas endocrinas y nerviosas que conforman el estado emocional particular de un animal.

Concretamente, la importancia del FTM en el correcto funcionamiento del eje LHHA ha sido repetidamente puesta de manifiesto en trabajos como los de Feldman y Conforti (1985,1987) y Feldman y col (1983-318), de tal manera que una lesión en el mismo a niveles anteriores del hipotálamo, concretamente en el APO, determina un descenso en la secreción adrenocortical en respuesta a la estimulación de diversas estructuras límbicas (incluyendo la amígdala) o del córtex prefrontal. Estos efectos no se producen, o son menos claros cuando la lesión del FTM se realiza en el hipotálamo posterior (Feldman y Conforti, 1985; Feldman y ?????,1993 **!!!!COMPROBAR Y AÑADIR!!!**), lo cual apoya que las proyecciones límbicas a través de diversas vías (como las amigdalinas a través de estría terminal, vía amigdalofugal ventral y FTM) están directamente implicadas y tienen una gran importancia en las respuestas a situaciones estresantes. Dentro de la gran diversidad de aferencias al APL, esta zona recibe también proyecciones de origen amigdalino mayoritariamente a través de la vía amigdalofugal ventral (**De Olmos, 1972-239**), cuyas fibras cursan caudalmente y se incorporan al FTM. Intentando coordinar nuestros resultados histológicos con los electrofisiológicos, en este sentido, hay considerar que quizás exista un incremento del input amigdalino al APL, como consecuencia del aislamiento social, que determine el incremento de conectividad detectado en las neuronas del APL. Pero esta participación amigdalina sería minoritaria en comparación con la importancia de las aferencias de origen amigdalino sobre las neuronas del APM-ST, que cursan principalmente vía stria terminalis.

Como puede verse, esta interpretación conjunta plantea, en líneas generales, los mismos problemas tratados con anterioridad para las neuronas del APM-ST ya que existe también una aparente contradicción entre ellos: una menor actividad basal en ciertas neuronas del APL y un incremento de inhibición por estimulación de la AME, frente a una mayor

riqueza de campo receptivo neuronal tras el aislamiento social.

No obstante, analizando comparativamente los resultados de los experimentos electrofisiológicos en el APM y en el APL, se observan diferencias que merece la pena señalar:

1) - En primer lugar, la estimulación de la amígdala medial en animales control produce menor % de respuesta en las neuronas del APL que en las del APM, apoyando el hecho anatómico de que existen proporcionalmente menos aferencias amigdalinas sobre estas neuronas (citas de apartado electrofisiología).

- Por otra parte, basándonos en los % de respuesta excitatoria e inhibitoria a dicha estimulación amigdalina, en animales control la proporción: aferencias excitatorias/inhibitorias relacionadas con la amígdala (mono o polisinápticamente) es mayor en las neuronas del APM (17.85) que en el APL (2.16). Esta diferencia indica que la vía amígdala-área preóptica es mayoritariamente excitatoria, pero de forma mucho más patente en el caso del APM.

2) - El aislamiento social provocó cambios en la actividad basal de ciertas neuronas del APL, mientras que no produjo modificaciones en el APM. Estos cambios consistieron en que las células del APL que no respondían a la estimulación amigdalina (NR) presentaban una descarga más lenta en animales aislados que en los control. Evidentemente, aferencias no-amigdalinas están influyendo en la actividad basal de estas neuronas NR del APL, disminuyéndola, y sugiriendo que el incremento de aferencias (postulado al detectarse el incremento de conectividad) puede tener carácter inhibitorio y funcionar en situación basal.

- Por otra parte, la respuesta de las células del APL a la estimulación de la amígdala medial sufrió sólo ligeras modificaciones debidas al aislamiento social, que no alcanzaron la significación estadística. Los efectos del aislamiento social fueron más drásticos sobre la respuesta de las células registradas en el APM. De nuevo, estos resultados parecen deberse al diferente "peso" de las aferencias de origen amigdalino en ambas regiones, de modo que en el APL parecen estar más diluidas entre la gran diversidad de aferencias que presentan.

Ya que el aislamiento provoca un incremento de espinas dendríticas más drástico en las neuronas del APL que en las del APM, parece más consistente la hipótesis de que se han

incrementado, sobre todo las aferencias no-amigdalinas sobre las neuronas estudiadas en el APL.

3) El aislamiento social provoca un incremento de inhibición por estimulación de la AME tanto en APM como en APL, aunque menor en la última, indicando que, en caso de haberse incrementado las aferencias amigdalinas sobre las células de estos núcleos, se trataría de aferencias inhibitorias.

En resumen, podría sugerirse como hipótesis que en el APL se incrementan las aferencias inhibitorias no-amigdalinas (provocando una disminución de la actividad basal de estas neuronas) y que también se incrementarían, aunque ligeramente, las aferencias inhibitorias amigdalinas (que funcionarían tras la estimulación de la amígdala medial).

El incremento de aferencias inhibitorias que puede haberse producido sobre las neuronas del APL debido al aislamiento social, podría determinar el incremento de sinapsis axo-dendríticas y/o axo-espinosas, lo cual determinaría, directa o heterotópicamente, el incremento en el conjunto del campo dendrítico.

5.- Respuesta sinaptogénica global en el área preóptica. Posibles mecanismos.-

La homogeneidad de los efectos del aislamiento social en las neuronas del APM-ST y del APL, esto es, el incremento de campo receptivo observado en ambas poblaciones neuronales sugiere la posibilidad de que se haya producido una respuesta de carácter global en las neuronas preópticas, ya que no parece deberse al incremento de una misma vía aferente. Si el aislamiento social tiene un efecto generalizado sobre el área preóptica, el incremento del campo receptivo de las neuronas podría explicarse de una forma más o menos convencional (como hemos venido haciendo hasta el momento) o bien mediante algún otro mecanismo alternativo propuesto de una forma más o menos explícita en la bibliografía.

Así, se podría proponer que el incremento de campo receptivo observado en neuronas del APM-ST y APL en animales aislados es un proceso que permite mantener la actividad basal de estas regiones en unos niveles normales, es decir, equivalentes a los de los animales control. Aunque se trataría de un fenómeno de adaptación a la situación de aislamiento para mantener la homeostasis en el sistema, de alguna manera la respuesta a los estímulos (bien sea un agente estresante, bien sea la estimulación de la amígdala

medial) no llegaría a ser del todo normal y estas neuronas no estarían preparadas para responder con la misma intensidad que en los animales control.

Es decir, la respuesta sináptica podría tener un carácter "compensatorio" o "reactivo", posibilitando un funcionamiento hasta cierto punto normal en un eje funcional importante para la vida del individuo.

Los fenómenos compensatorios de explicación más sencilla son los de "compensación intermodal", que consisten en mecanismos de reorganización del sistema nervioso para compensar la pérdida de una función sensorial, mediante potenciación de otras modalidades sensoriales. Estos fenómenos incluyen procesos de plasticidad neuronal como el incremento de espinas dendríticas en neuronas piramidales de cortex auditivo tras la eliminación temprana del ojo o las vibrisas (Ryugo y col 1975) o como el incremento del volumen y el número de células del n. coclear en ratas que no reciben input visual desde el nacimiento (Dyson y col., 1991-256). La explicación de estos casos puede establecerse en base a la existencia de una competencia de los terminales axónicos por sinaptar sobre determinados campos receptivos (Hubel y Wiesel, año y trabajo??). Cuando un tipo de aferencia está en minoría es reemplazada, incluso con mayor eficacia, por aferencias de otro origen.

Este tipo de explicación aplicada a nuestros resultados no cambia sustancialmente el tipo de interpretación que hemos manejado hasta ahora y es muy difícil, en nuestro caso, de corroborar debido a lo incierto del origen y tipo de aferencias.

Otras veces la explicación es más compleja dado que la reactividad se da en las mismas estructuras afectadas de un modo directo. La existencia de este tipo de fenómenos compensatorios ha sido descrita ya por Altman (1966) y Sprague (1966), que afirman que la corteza visual puede "reaccionar" frente a la deprivación lumínica o frente a lesiones debido a la existencia de desequilibrios homeostáticos corticales que provocan una desorganización en la morfogénesis sináptica, que podría derivar en un incremento de sinapsis y actividad nerviosa.

Esta idea se ha concretado en estudios "invitro" (Mattson y Kater, 1989-294) en los que se ponía de manifiesto la importancia de un equilibrio entre la información excitatoria e inhibitoria a la hora de determinar la arquitectura

dendrítica en neuronas embrionarias del hipocampo. En este caso, la sobreestimulación con el neurotransmisor excitador glutamato determinaba un menor desarrollo de campo dendrítico, así como efectos degenerativos sobre el mismo. Por tanto, aunque el glutamato es un neurotransmisor excitador, su exceso implica disminución de las capacidades receptivas de las neuronas hipocampales. También en neuronas del hipocampo, Watanabe y col (1992-295) han encontrado que tras estrés crónico tiene lugar una disminución de la longitud y ramificación de las dendritas apicales. Estos autores especulan acerca de la posibilidad de que sea precisamente el incremento de neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato en esa región en respuesta al estrés (¡¡¡REFERENCIAS EN WATANABE Y COL, 1992-295, SOBRE LIBERACIÓN DE GLU EN ESA VÍA EN RESPUESTA AL ESTRES AGUDO) el elemento responsable de la reacción constatada en dichas neuronas hipocampales, de modo semejante al anteriormente comentado.¡¡¡¡COMENTARIO DE NUESTROS RESULTADOS: LA MENOR EXCITACIÓN Y MAYOR INHIBICIÓN PODRÍAN HABER RESULTADO EN UNA REACCIÓN COMPENSATORIA DEL CAMPO DENDRÍTICO, INCREMENTANDO!!! La idea que se puede entresacar de todo lo anterior es que el comportamiento de las estructuras postsinápticas frente a una llegada alterada de aferencias no tiene por qué ser igual en todos los tipos celulares ni coincidente siempre con las hipótesis de inducción tradicionales. Las neuronas, dependiendo del tipo, localización y papel del circuito en el que están implicadas, responden de un modo diferencial. Esta hipótesis es ilustrada de un modo muy interesante por una serie de estudios realizados en situaciones naturales de la vida del animal en las que se han encontrado procesos aparentemente reactivos o compensatorios. Así, por ejemplo, durante la hibernación se produce un descenso drástico global de la actividad eléctrica cerebral, de carácter transitorio (ver revisión de Heller, 1979-224) que se hace especialmente patente en zonas que, como la corteza cerebral, están sometidas a aferencias sensoriales lógicamente muy disminuidas durante esta situación. No obstante, a nivel del hipotálamo, y concretamente en las neuronas magnocelulares del NSO, se ha detectado un importante incremento en el número de espinas dendríticas y en el campo dendrítico (Sánchez-Toscano y col, 1989). Igualmente, en esta situación las células de Purkinje del cerebelo muestran un enorme incremento en el número de sus espinas dendríticas, las

cuales, además, se hacen mayores y cambian su morfología (Boycott y Guillery, 1959; Boycott Y Wassle, 1974; Boycott, 1982). Más interesante todavía es el hallazgo de que en la corteza cerebral del erizo de tierra la hibernación determina un descenso significativo de espinas dendríticas en los tallos apicales de las neuronas piramidales de la capa V, a nivel de la capa IV, mientras que otras neuronas aumentan su campo receptivo a ese mismo nivel (Sánchez-Toscano,-----; Martín---congreso!!!!BUSCAR!!!).

La interpretación de estos fenómenos puede hacerse mediante una visión clásica, proponiendo un incremento de aferencias de diferente origen y naturaleza, pero también cabe pensar, en la posibilidad de que frente a una situación pobre en actividad neuronal las neuronas mencionadas del NSO, cerebelo o corteza aumentan su campo receptivo para "escuchar mejor" (o captar mejor los pocos estímulos existentes) y mantener así un nivel de actividad aceptable, bien de forma efectiva o a modo de "reserva". De acuerdo con esta idea, podríamos pensar que en nuestras ratas aisladas las neuronas del APO mantienen su actividad basal, de un modo casi general (ya que existen algunas neuronas del APL en que disminuye la actividad espontánea) mediante un campo receptivo incrementado. Este incremento, sin embargo, no sería suficiente para responder frente a los estímulos mediados por la amígdala medial.

La explicación de esta respuesta peculiar y específica de cada tipo neuronal frente a cada tipo de circunstancia biológica (que no sería, en principio, aplicable a situaciones excesivamente traumáticas -como son las lesiones- habría que buscarla a nivel de mecanismos moleculares que sensibilicen a las células para llevar a cabo sus funciones del modo más adaptativo posible.

El modelo de aislamiento social prematuro y prolongado que se ha utilizado en esta tesis representa claramente una situación compleja, tras la cual las ratas socialmente privadas no realizan ajustes neuroendocrinos apropiados ante ciertos estímulos. Estas alteraciones podrían ser la suma de múltiples factores que están afectando a los animales, entre los cuales hay que considerar la escasa experiencia de los animales con señales sutiles que proceden de la madre y cuyo significado cambiante puede modular el desarrollo temprano del eje HHA (3,40). Las limitaciones del ambiente social, o la restricción somatosensorial que experimentan los animales aislados también participarían en las alteraciones encontradas en las ratas aisladas del presente estudio, como se ha sugerido para explicar el comportamiento anormal de monos aislados(61).

Es evidente que sería necesaria la realización de estudios complementarios para suministrar más información relativa a las alteraciones encontradas, que completarían el cuadro de las vías nerviosas alteradas, el papel de los corticosteroides y de otros factores que intervienen en la modulación de la actividad neuroendocrina de los animales aislados, etc.

5. CONCLUSIONES

1) La deprivación social provocó una disminución de los niveles circulantes de corticosterona tanto en situación basal como en respuesta al estrés, en comparación con el grupo control, indicando la existencia de una actividad adrenocortical disminuida en ambas situaciones fisiológicas.

El incremento del peso del timo en los animales aislados es coherente con la disminución de concentración basal de corticosterona en plasma, confirmando con ello la existencia de una hipofuncionalidad de la actividad adrenocortical tras el aislamiento social.

Sin embargo, el peso de las glándulas adrenales no se vió alterado por la situación experimental, indicando que las alteraciones producidas fueron de carácter moderado.

Del mismo modo, el peso de los testículos no varió en los animales aislados, sugiriendo que la función gonadal posiblemente no estaba alterada.

2) El aislamiento social prematuro y prolongado en rata provocó que el incremento de células inmunorreactivas para la ACTH que tiene lugar en la *pars distalis* de la adenohipófisis en respuesta a 15 minutos de estrés por inmovilización fuera menor que en la situación control. Sin embargo, no provocó alteraciones en la inmunotinción en situación basal.

Las ratas aisladas mostraron un marcado aumento de inmunorreactividad para la CRH en las fibras nerviosas localizadas en la ZEEM, en comparación con las ratas control, tanto en situación basal como tras 15 min. de estrés por inmovilización.

No se apreciaron cambios en el inmunomarcaje para CRH, AVP ni OT a nivel del NPV tras el aislamiento social.

Tampoco se detectaron diferencias en la inmunotinción para fibras vasopresinérgicas ni oxitocinérgicas en la EM.

El aislamiento social produce, por tanto, una

hipofuncionalidad en el sistema HHA a distintos niveles del eje, tanto en situación basal como en respuesta al estrés agudo por inmovilización, aunque las alteraciones que se producen en ésta última son más drásticas.

3) Los resultados electrofisiológicos demuestran que el aislamiento social desde una época temprana -previa al destete- provoca en la rata una disminución de la actividad espontánea de poblaciones específicas de células en el NPV y APL, sin provocar alteraciones en el resto de las regiones estudiadas. Además, dicha situación experimental alteró las respuestas neuronales a la estimulación eléctrica del núcleo medial de la amígdala (AMe), reduciendo la frecuencia de neuronas del APO (concretamente, del APM) y NPV que son excitadas y aumentando el porcentaje de células inhibidas o que no responden a dicha estimulación.

Estos resultados electrofisiológicos, junto con las concentraciones plasmáticas reducidas de corticosterona, indican una actividad LHHA reducida tras el aislamiento social. El hecho de que la actividad espontánea de las células de los núcleos estudiados resultara afectada en menor medida que el comportamiento del sistema en respuesta a la estimulación del AMe refuerza la idea de que las alteraciones del eje LHHA son más evidentes frente a los estímulos estresantes que en situación basal.

4) El aislamiento social prematuro y prolongado incrementó la densidad de espinas dendríticas en dendritas orientadas de neuronas del área preóptica medial estriar (APM-ST) y en neuronas multipolares del área preóptica lateral rostral (APL). Dicho aumento de densidad de espinas dendríticas podría reflejar un incremento en el número de contactos sinápticos tras el aislamiento.

Las neuronas del APL de los animales aislados presentaron, además, una mayor ramificación dendrítica que los animales control.

Estas diferencias parecen apuntar conjuntamente a la existencia de una sinaptología incrementada en ciertos

circuitos en los que están implicadas las neuronas de las áreas estudiadas dentro del área preóptica tras la situación de aislamiento social.

La interpretación de estos resultados es especialmente complicada ateniéndonos a los criterios más convencionales sobre la inducción de fenómenos de plasticidad en el campo dendrítico neuronal; por este motivo, en este trabajo hemos propuesto la existencia de procesos de plasticidad alternativos.

Para concluir este trabajo, podríamos señalar de un modo global que la situación de aislamiento social en la que se cría a los animales desde un destete prematuro produce una *hipofuncionalidad* del sistema LHHA que se pone de manifiesto especialmente frente a situaciones de emergencia o de estimulación experimental de dicho eje.

El cuadro de resultados no coincide con los descritos previamente para situaciones de aislamiento o estrés crónico cuando éstos son inducidos en edades adultas. Nosotros proponemos que el determinante fundamental de estas características particulares del modelo de aislamiento estudiado podría radicar en la importancia que los procesos de sinaptogénesis y maduración neuronal pueden tener en etapas tan críticas del desarrollo cerebral, así como del tipo de estímulos -especialmente el ambiente materno y las interacciones sociales con el resto de los compañeros de camada- que intervienen en la maduración del sistema HHA durante este período.

6. REFERENCIAS

- Adell,A., García-Marquez,C., Armario,A., Gelpí,E. (1989-12). Chronic administration of clomipramine prevents the increase in serotonin and adrenaline induced by chronic stress. *Psychopharmacology* 99:22-26.
- Adell,A., García-Marquez,C., Armario,A., Gelpí,E. (1990-11). Effects of chronic stress on serotonin and noradrenaline in the rat brain. *Biogenic Amines* 7:19-26.
- Aguilera,G., Lightman,S.L., Kiss,A. (1993-1). Regulation of hypothalamic-pituitary adrenal axis during water deprivation. *Endocrinology* 132:241-248.
- Alario,P., Gamallo,A., Beato,M.J., Trancho,G. (1987-14). Body weight gain, food intake and adrenal development in chronic noise stressed rats. *Physiol Behav* 40:29-32.
- Alexander,S.L., Irvine,C.H.G., Livesey,J.H., Donald,R.A. (1986-97). Effect of isolation stress on concentrations of arginine vasopressin, alfa-melanocyte-stimulating hormone and ACTH in the pituitary venous effluent of the normal horse. *J Endocr* 116:325-334.
- Allen,J.P., Allen,C.F. (1974-202). Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. *Neuroendocrinology* 15:220-230.
- Angulo,J.A., Ledoux,M., McEwen,B.S. (1991-146). Genomic effects of cold and isolation stress on magnocellular vasopressin mRNA-containing cells in the hypothalamus of the rat. *J Neurochem* 56:2033-2038.
- Armario,A., Martí,J., Gil,M. (1990-10). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15:341-347.
- Armario,A., Ortiz,R., Balasch,J. (1984-304). Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiol Behav* 32:35-37.
- Armario,A., Hidalgo,J., Giralt,M. (1988-38). Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47:263-267.
- Baer,H. (1971-305). Long-term isolation stress and its effects on drug response in rodents. *Lab Animal Sci* 21:341-349.
- Barrett, A.M., Stockham, M.A. (1963-29). The effect of housing conditions and simple experimental procedures upon the corticosterone level in the plasma of rats. *J. Endocrin.* 26, pg. 97-105.
- Barrett,J.A., Silverman,A.J., Rouyu,A., Kelly,D.D. (1989-278). *Soc Neurosci Abstr* 15:135.
- Bartanusz,V., Jezová,D., Bertini,L.T., Tilders,F.J.H., Aubry,M., Kiss,J.Z. (1993-276). Stress-induced increase in vasopressin and corticotropin-releasing factor expression in hypophysiotrophic paraventricular neurons. *Endocrinology* 132:985-902.

- Bartová, A. (1968-32). Functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal system during postnatal development in rats. *General and Comparative Endocrinology* 10:235-239.
- Beaulieu, S., Di Paolo, T., Côte, J., Barden, N. (1987-204). Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology* 45:37-46.
- Benesová, O., Pavlík, A. (1989-42). Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology* 28:89-97.
- Benton, D., Goldsmith, J.F., Gamal-El-Din, L., Brain, P.F., Hucklebridge, F.H. (1978-306). Adrenal activity in isolated mice and mice of different social status. *Physiol Behav* 20:459-464.
- Bouchaud, C., Bosler, O. (1986-80). The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation. *International Review of Cytology* 105:283-327.
- Bowers, B.J., Wehner, J.M. (1992-179). Adrenalectomy and stress modulate GABA_A receptor function in LS and SS mice. *Brain Res* 576:80-88.
- Ema, P., Nieuwenhuys, R. (1988-152). Ultrastructural characterization of exocytotic release sites in different layers of the median eminence of the rat. *Cell Tissue Res* 252:107-114.
- Calogero, A.E., Gallucci, W.T., Gold, P.W., Chrousos, G.P. (1988). Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. *J. Clin. Inv., Inc.* 82:767-774.
- Carter, D.A., Lightman, S.L. (1986-144). Diurnal pattern of stress-evoked neurohypophyseal hormone secretion: sexual dimorphism in rats. *Neurosci Lett* 7:252-255.
- Catalani, A., Marinelli, M., Scaccianoce, S., Nicolai, R., Muscolo, L.A.E., Porcu, A., Angelucci, L. (1992-27). Behavioral and endocrine modification in the rat offspring of mothers drinking corticosterone during lactation. *Proc. 15th Annual Meeting ENA, Munich.* pg. 12.
- Ceccatelli, S., Cintra, A., Hökfelt, T., Fuxe, K., Wikström, A.-C., Gustafsson, J.A. (1989-134). Coexistence of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity with neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Exp Brain Res* 78:33-42.
- Cintra, A., Fuxe, K., Härfstrand, A., Agnati, L.F., Wikström, A.-C., Okret, S., Vale, W., Gustafsson, J.A. (1987-195). Presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in corticotrophin releasing factor and in growth hormone releasing factor immunoreactive neurons of the rat di- and telencephalon. *Neurosci Lett* 77:25-30.
- Cintra, A., Borkolotti, F. (1992-109). Presence of strong glucocorticoid receptor immunoreactivity within hypothalamic and hypophyseal cells containing pro-opiomelanocortin peptides. *Brain Res* 577:127-133.

- Coe, C.L., Wiener, S.G., Rosenberg, L.T., Levine, S. (1985-302). Endocrine and immune responses to separation and maternal loss in nonhuman primates. En: "The psychobiology of attachment and separation", Reite, M. and Field, T. (eds.). Academic Press, Inc, San Diego. Pág. 163-199.
- Cragg, (1972-4), en Salas y col., 1974: Diferencias en la dieta origina variaciones en la sinaptogénesis cortical.
- Czyrak, A., Dooley, D.J., Jones, G.H., Robbins, T.W. (1992-57). Social isolation increases the density of [¹²⁵I]α-conotoxin GVIA binding sites in the rat frontal cortex and caudate nucleus. *Brain Res* 583:189-193.
- Chappell, P.B., Smith, M.A., Kilts, C.D., Bissette, G., Ritchie, J., Anderson, C., Nemeroff, C.B. (1986-147). Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci* 6:2908-2914.
- Childs, G.V. (1991-86). Multipotencial pituitary cells that contain adrenocorticotropin (ACTH) and other pituitary hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2:112-117.
- Childs y Burke, 1987. *Endocrinology* 120:439-444.
- Childs, G.V., Korell, J.L., Niendorf, A., Aguilera, G. (1986-112). Cytochemical studies of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in anterior lobe corticotropes: binding, glucocorticoid regulation, and endocytosis of [biotinyl-Ser]-CRF. *Endocrinology* 119:2129-2142.
- Childs, G.V., Ellison, D.G., Ramaley, J.A., Unabia, G. (1982-71). Storage of anterior lobe adrenocorticotropin in corticotropes and corticotropes and a subpopulation of gonadotropes during the stress-nonresponsive period in the neonatal male rat. *Endocrinology* 110:1676-1692.
- Dallman, M.F., Levin, N., Cascio, C.S., Akana, S.F., Jacobson, L., Kuhn, R.W. (1989-110). Pharmacological evidence that the inhibition of diurnal adrenocorticotropin secretion by corticosteroids is mediated via type I corticosterone-preferring receptors. *Endocrinology* 124:2844-2850.
- De Souza, E.B., Van Loon, G.R. (1985-102). Differential plasma β-endorphin, β-lipotropin, and adrenocorticotropin responses to stress in rats. *Endocrinology* 116:1577-1586.
- De Goeij, D.C.E., Kvetnansky, R., Whithall, M.H., Jezova, D., Berkenbosch, F., Tilders, F.J.H. (1991-118). Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 53:150-159.
- De Goeij, D.C.E., Jezova, D., Tilders, F.J.H. (1992-127). Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 577:165-168.
- De Kloet, E.R., Carey, K.P., Hornsby, C.D., Oitzl, M.S., Joëls, K. (1993-175). Adrenal steroids, stress and the aging brain. *J Endocrinol Invest* 16:51-20799.

- De Goeij, D.C.E., Dijkstra, H., Tilders, F.J.H. (1992-126). Chronic psychosocial stress enhances vasopressin, but not corticotropin-releasing factor, in the external zone of the median eminence of male rats: relationship to subordinate status. *Endocrinology* 131:847.
- Del Abril, A. (1988-194). Efecto de los esteroides gonadales en el desarrollo y diferenciación del núcleo de la estría terminal (NEST) en la rata. *Disertación Doctoral, U.N.E.D., Facultad de Psicología, Madrid.*
- Dierickx, K. (1980-124). Immunocytochemical localization of the vertebrate cyclic nonapeptide neurohypophyseal hormones and neurophysins. *International Review of Cytology* 62:119-185.
- Feldman y col. (1984). ????????? J. Neurosci. Res. 12:87-92.
- Feldman, S., Conforti, N. (1980-187). Adrenocortical responses in dexamethasone-treated rats with septal, preoptic and combined hypothalamic lesions. *Hormone Res* 12:289-295.
- Feldman, S., Conforti, N. (1981-360). Amygdalectomy inhibits adrenocortical responses to somatosensory and olfactory stimulation. *Neuroendocrinology* 32:330-334.
- Feldman, S., Weidenfeld, J. (1991-181). Depletion of hypothalamic norepinephrine and serotonin enhances the dexamethasone negative feedback effect on adrenocortical secretion. *Psychoneuroendocrinology* 16:397-405.
- Fenske, M., Ellendorf, F., Wuttke, W. (1975-207). Response of medial preoptic neurons to electrical stimulation of the mediobasal hypothalamus, amygdala and mesencephalon in normal, serotonin or catecholamine deprived female rats. *Exp Brain Res* 22:34????????
- Ferreyra, H., Kannan, H., Koizumi, K. (1983-210). Influences of the limbic system on hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res* 264:31-45.
- Fink, G., Smith, G.C. (1971-275). Ultrastructural features of the prenatal development of the hypothalamo-pituitary axis in the rat. *J Anat* 106:207A.
- Gaillard, R.-C., Al-Damluji, S. (1987-13). Stress and the pituitary-adrenal axis. En: "Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism" vol 1: "Neuroendocrinology of stress", pg. 319.
- Gaillard, R.-C., Al-Damluji, S. (1987-13). Stress and the pituitary-adrenal axis", in: "Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism" vol 1: "Neuroendocrinology of stress", pg. 319.
- Gamallo, A., Villanua, A., Beato, M.J. (1986-300). Body weight gain and food intake alterations in crowd-reared rats. *Physiol Behav* 36:835-837.
- Gamallo, A., Villanua, A., Trancho, G., Fraile, A. (1986-13). Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav* 36:217-221.
- García-Marguez, C., Armario, A. (1987-95). Chronic stress depresses

exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav* 40:33-38.

Gardner, C.R., Phillips, S.W. (1977-203). The influence of the amygdala on the basal septum and preoptic area of the rat. *Exp Brain Res* 29:249-263.

Garzón, J., Del Río, J. (1981-23). Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: further studies on a new animal model for the detection of antidepressants. *Europ J Pharmacol* 74:287-294.

Garzón, J., Fuentes, J.A., Del Río, J. (1979-21). Antidepressants selectively antagonize the hyperactivity induced in rats by long-term isolation. *Europ J Pharmacol* 59:293-296.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Feer, H. (1981-303). Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol Behav* 27:183-186.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Frischknecht, H.-R., Feer, H., Siegfried, B. (1988-54). Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol Behav* 43:13-16.

Gibbs, D.M. (1986-128). Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. *Psychoneuroendocrinology* 11:131-140.

Gibbs, D.M. (1984-120). Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci* 35:487-491.

Ginsberg, S.D., Hot, P.R., McKinney, W.T., Morrison, J.H. (1993-273). Quantitative analysis of tuberoinfundibular tyrosine hydroxylase and corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in monkeys raised with differential rearing conditions.????????????????????????

Gray, T.S. (1989-206). Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology* 50:433-446.

Greco, A.M., Gambardella, P., Sticchi, R., D'Aponte, D., de Franciscis, P. (1992-305). Circadian Rhythms of hypothalamic norepinephrine and of some circulating substances in individually housed adult rats. *Physiol Behav* 52:1167-1172.

Grino, M., Burgunder, J.M., Eskay, R.L., Eiden, L.E. (1989-105). Onset of glucocorticoid responsiveness of anterior pituitary corticotrophs during development is scheduled by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 124, pg. 2686-2692.

Greco, A.M., Gambardella, P., Sticchi, R., D'aponte, D., Di Renzo, G., Franciscis, P. (1989-15). Effects of individual housing on circadian

rhythms of adult rats. *Physiol. and Behav.* 45:363-366.

Grino, M., Scott Young III, W., Burgunder, J.-M. (1989-93). Ontogeny of expression of the corticotropin-releasing factor gene in hypothalamic paraventricular nucleus and of the proopiomelanocortin gene in rat pituitary. *Endocrinology* 124:60-68.

Guisado, E., Fernández-Tomé, P., Garzón, J., Del Río, J. (1980-22). Increased dopamine receptor binding in the striatum of rats after long-term isolation. *Europ J Pharmacol* 65:463-464.

Haas, D.A., George, S.R. (1988-151). Single or repeated mild stress increases synthesis and release of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Brain Res* 461:230-237.

Halmi, N.S., Moriarty, G.C. (1982-75). Hipófisis. En: "Histología". Weiss, L. y Greep, R.O. (eds). El Ateneo, Madrid.

Harbuz, M.S., Chalmers, J., De Souza, L., Lightman, S.L. (1993-277). Stress-induced activation of CRF and *c-fos* mRNAs in the paraventricular nucleus are not affected by serotonin depletion. *Brain Res* 609:167-173.

Harbuz, M.S., Lightman, S.L. (1992-24). Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinology* 134:327-339.

Hatch, A., Niberg, G.S., Balazs, T., Grice, H.C. (1963-18). Long-term isolation stress in rats. *Science* 142:507.

Hatch, A.M., Niberg, G.S., Zawadzka, Z., Cann, M., Airth, J.M., Grice, H.C. (1965-17). Isolation syndrome in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 7:737-745.

Hauger, R.L., Lorang, M., Irwin, M., Aguilera, G. (1990-113). CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 532:34-40.

Hayward, J.N. (1972). The amygdaloid nuclear complex and mechanisms of release of vasopressin from the neurohypophysis. En: "Neurobiology of Amygdala". Eleftheriou, B.E. (Ed.). Plenum Press, New York. Pg. 685-740.

Hennessey, M.B., Weinberg, J. (1990-16). Adrenocortical activity during conditions of brief social separation in preweaning rats. *Behav Neur Biol.* 54:42-55.

Hofer, M.A. (1973-43). The role of nutrition in the physiological and behavioral effects of early maternal separation on infant rats. *Psychosom Med* 35:350-359.

Holsboer, F. (1988-66). Implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical (LHPA)-function for neurobiology of depression. En: "Biological Measures. Their Theoretical and Diagnostic Value in Psychiatry". Van den Hoofdakker, R.H. (ed). *Acta Psychiatrica Scandinavica* 77 (Suppl. 341):72-111.

Holson, R.R.; Scallet, A.C.; Ali, S.F.; Sullivan, P.; Gough, B. (1988-53). Adrenocortical, β -endorphin and behavioral responses to graded stressors in differentially reared rats. *Physiol Behav* 42:125-130.

Holson, R.R.; Scallet, A.C.; Turner, B.B. (1991-2). Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods". *Physiol Behav* 49:1107-1118.

Höllt, V., Przewlocki, R., Haarmann, I., Almeida, O.F.X., Kley, N., Millan, M.J., Herz, A. (1986-98). Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for pro-opiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 43:277-282.

Husain, M., Manger, W.M., Rock, T.W., Weiss, R.J., Frantz, A.G. (1979-122). Vasopressin release due to manual restraint in the rat: role of body compression and comparison with other stressful stimuli. *Endocrinology* 10:641-644.

Iglesias, I., Jiménez, I., Montero, S., Fuentes, J.A. (1991-47). Stress-induced hypertension: effects of adrenalectomy and corticosterone replacement. *Life Sciences* 49:979-986.

Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M., Demura, H. (1992-116). Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology* 131:240-246.

Irwin, J., Ahluwalia, P., Zacharko, R.M., Anisman, H. (1986-20). Central norepinephrine and plasma corticosterone following acute and chronic stressors: influence of social isolation and handling. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1151-1154.

Jankowska, E., Pucillo, O., Kostowski, W. (1991-49). Chronic oral treatment with diltiazem or verapamil decreases isolation-induced activity impairment in elevated plus maze. *Behavioural Brain Research* 43:155-158.

Jia, L.-G., Canny, G.J., Leong, D.A. (1992-73). Paracrine communication regulates adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 130:534-539.

Jones, G.H., Marsden, C.A., Robbins, T.W. (??-48). Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 102:364-372.

Ju, G., Ma, D., Duan, X.Q. (1992-125). Third ventricular subependymal oxytocin-like immunoreactive neuronal plexus in the rat. *Brain Res bull* 28:887-896.

Ju, G., Swanson, L.W. (1989-193). Studies of the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 280:587-602.

Kalio, N.H., Takahashi, L.K. (1988-111). Altered hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in animal models of depression. En: "The Hypothalamic-

Pituitary-Adrenal Axis: Physiology, Pathophysiology, and Psychiatric Implications". Schatzberg, A.F. y Nemeroff, C.B. (eds). Raven Press, Ltd., Nueva York. Pag. 67-78.

Katsuura, G., Arimura, A., Kovacs, K., Gottschall, P.E. (1990-190). Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 β -induced ACTH release. *Am J Physiol* 258:E163-E171.

Keller-Wood, M.E., Dallman, M.F. (1984-51). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Reviews* 5:1-24.

Kiss, A., Aguilera, G. (1992-274). Participation of α_1 -adrenergic receptors in the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing hormone during stress. *Neuroendocrinology* 56:153-160.

Kiss, J.Z. (1988-135). Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* 20, pg. 699-708.

Klein, F.; Lemaire, V.; Sandi, C.; Vitiello, S.; Van der Logt, J.; Laurent, P.E.; Neveu, P.; Le Moal, M. (1992). Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. *Life Sci* 50:723-731.

Kobayashi, H., Matsui, T., Ishii, S. (Fernando H-105 -81). Functional electron microscopy of the hypothalamic median eminence. pg. 281-381.

Koch, M.D., Arnold, K.J. (1972-60). Effects of early social deprivation on emotionality in rats. *J Comparative and Physiological Psychology* 78:391-399.

Kominowski, D., Muto, S., Weiss, J., Schmitt, E., Taylor, G.T. (1988-68). Structural changes in nuclear chromatin in rat pituitary after chronic stress of low intensity. *Anat Record* 220:125-131.

Kordon, C. (1985-171). Neural mechanisms involved in pituitary control. *Neurochem Int* 7:917-925.

Krishnan, K.R.P., Doraiswamy, P.K., Venkataraman, S., Reed, D., Ritchie, J.C. (1991-2). Current concepts in hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation. En: "Stress, neuropeptides, and systemic disease", McCubbin, J.A., Kaufmann, P.G., Nemeroff, C.B. (eds). Academic Press, San Diego (U.S.A.). Pag. 19-35.

Kuhn, C.M., Pauk, J., Schanberg, S.M. (1990-39). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental Psychobiology* 23:395-410.

Lang, R.E., Heil, J.W.E., Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., Rascher, W. (1983-117). Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316.

Larsen, P.J., Møller, M., Mikkelsen, J.D. (1991-84). Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J Comp*

Neurol 306:462-479.

Lawson, A., Ahima, R., Krozowski, Z., Harlan, R. (1991-182). Postnatal development of corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Dev Brain Res* 62:69-79.

Le Gal-La Salle, G., Paxinos, G., Emsen, P., Ben-Ari, Y. (1978-209). Neurochemical mapping of GABAergic systems in the amygdaloid complex and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 155:397-403.

Levine, A.S.; Billington, C.J. (1991-8): "Stress, peptides and regulation of ingestive behavior". En: "Stress Revisited. 1. Neuroendocrinology of Stress", *Methods Achieve Exp Pathol*. Jasmin, G. and Cantin, M. (eds). Basel, Karger, vol 14, pg. 327-339.

Levin, N., Akana, S.F., Jacobson, L., Kuhn, R.W., Siiteri, P.K., Dallman, M.F. (1987-96). Plasma adrenocorticotropin is more sensitive than transcortin production or thymus weight to inhibition by corticosterone in rats. *Endocrinology* 121:1104-1110.

Levitsky, D.A., Earnes, R.H. (1972-301). Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. *Science* 176:68-71.

Lightman, S.L., Young, W.S. (1989-186). Influence of steroids on the hypothalamic corticotropin-releasing factor and preproenkephalin mRNA responses to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4306-4310.

Lightman, S.L., Young, W.S. (1988-138). Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403:511-523.

Link, H., Dayanithi, G., Föhr, K.J., Gratzl, K. (1992-115). Oxytocin at physiological concentrations evokes adrenocorticotropin (ACTH) release from corticotrophs by increasing intracellular free calcium mobilized mainly from intracellular stores. Oxytocin displays synergistic or additive effects on ACTH-releasing factor or arginine vasopressin-induced ACTH secretion, respectively. *Endocrinology* 130:2183-2191.

McDonald, A.J. (1987-214). Somatostatinergic projections from the amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis and medial preoptic-hypothalamic region. *Neurosci Lett* 75:271-277.

McGimsey, W.C., Cidlowski, J.A., Stumpf, W.E., Sar, M. (1991-106). Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver, and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinology* 129:3064-3072.

Meaney, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S., Sarriveau, A. (1989-55). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* 50:597-604.

Meaney, M.J., Mitchell, J.E., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., Bodnoff, R., Iny, L.J., Sarriveau, A. (1991-62). The effects of neonatal handling on the

development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16:85-103.

Meaney, M.J., Aitken, D.H., Sharma, S., Viau, V. (1992-44). Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.

Merchenthaler, I. (1990). Retrograde labeling of hypophysiotropic neurons by local injection of wheat germ agglutinin (WGA) into the median eminence or peripheral administration of fluoro-gold. *Mol Cell Neurosci* 1:93-106.

Meyerhoff, J.L., Oleshansky, M.A., Kalogeras, K.I., Mougey, E.H., Chrousos, G.P., Granger, L.G. (1990-104). Neuroendocrine responses to emotional stress: possible interactions between circulating factors and anterior pituitary hormone release. En: "Circulating Regulatory Factors and Neuroendocrine Function". Porter, J.C. y Jezová, D. (eds). Plenum Press, Nueva York, pp. 91-111.

Mlaskowski, C., Ong, G.L., Lukic, D., Haldar, J. (1988-121). Immobilization stress affects oxytocin and vasopressin levels in hypothalamic and extrahypothalamic sites. *Brain Res* 458:137-141.

Miller, R.E., Uchi, W.F., Mirsky, I.A. (1971-59). Patterns of eating and drinking in socially-isolated Rhesus monkeys. *Physiol Behav* 7:127-134.

Mobley, P.L., Sulser, F. (1980-199). Adrenal corticoids regulate sensitivity of noradrenaline receptor-coupled adenylate cyclase in brain. *Nature* 286:608-609.

Moga, X.E., Saper, C.B., Gray, T.S. (1989-192). Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 283:315-332.

Moratalia, R., Sánchez-Franco, F., Del Río, J. (1986-137). Long-term hyperalgesia in rats induced by neonatal administration of vasopressin antiserum. *Life Sci.* 38:109-115.

Morgan, M.J., Eison, D.F., Nicholas, D. (1975-62). The effects of isolation rearing on behavioral inhibition in the rat. *Q. J. Exp. Psychol.* 27:615-634.

Morgan, M., Eison, D. (1975-267). Incentive motivation and behavioral inhibition in socially-isolated rats. *Physiol Behav* 15:405-409.

Morinan, A.; Leonard, B.E. (1980-3). Some anatomical and physiological correlates of social isolation in the young rat. *Physiol Behav* 24:637-640.

Nakamura, S., Sakaguchi, T., Aoki, F. (1989-235). Electrophysiological evidence for terminal sprouting of locus coeruleus neurons following repeated mild stress. *Neurosci Lett* 100:147-152.

- Negoro, H., Visessuwan, S., Holland, R.C. (1973-173). Inhibition and excitation of units in paraventricular nucleus after stimulation of the septum, amygdala and neurohypophysis. *Brain Res.* 57:479-483.
- Nitecka, L., Ben-Ari, Y. (1987-211). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J Comp Neurol* 266:45-55.
- Noel, G., Mains, R.E. (1991-89). Plasticity of peptide biosynthesis in corticotropes: independent regulation of different steps in processing. *Endocrinology* 129:1317-1325.
- Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L. (1991-180). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252:1848-1851.
- Orr, J.E., Meyerhoff, J.L., Mougey, E.H., Bunnell, B.N. (1990-35). Hypersensitiveness of the rat neuroendocrine system due to repeated exposure to stress. *Psychoneuroendocrinology* 15,317-328.
- Owens, M.J., Bartolome, J., Schanberg, S.M., Nemeroff, C.B. (1990). Corticotropin-releasing factor concentrations exhibit an apparent diurnal rhythm in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions: differential sensitivity to corticosterone. *Neuroendocrinology* 52:626-631.
- Page, R.E. (1986-76). The pituitary portal system. *Current Topics in Neuroendocrinology* 7:1-47.
- Page, R.E. (1988-77). The anatomy of the hypothalamo-hypophyseal complex. En: "The Physiology of Reproduction". E. Knobil y J. Neill y col. (eds). Raven Press, Ltd., Nueva York. pg.1161-1232.
- Page, R.E., Dovey-Hartman, B.J. (1984-82). Neurochemical contact in the internal zone of the rabbit median eminence. *J Comp Neurol* 226:274-288.
- Palkovits, M., Záborsky, L. (1980-221). Neural connections of the hypothalamus. En P.J. Morgane y J. Pnaksepp (Eds.). "Anatomy of the Hypothalamus. Vol. 1". Marcel Dekker, New York, pg. 379-509.
- Pauli, W.K., Gibbs, F.P. (1983-158). The corticotropin releasing factor (CRF) neurosecretory system in intact, adrenalectomized, and adrenalectomized-dexamethasone treated rats. *Histochemistry* 78:303-316.
- Peterson, M.E., Palkovits, M., Chiueh, C.C., Graves, T.K., Mezey, E., Vale, W., Krieger, I. (1989-170). Biogenic amine and corticotropin-releasing factor concentrations in hypothalamic paraventricular nucleus and biogenic amine levels in the median eminence of normal dogs, chronic dexamethasone-treated dogs, and dogs with naturally-occurring pituitary-dependent hyperadrenocorticism (canine Cushing's disease). *J Neuroendocrinology* 1:169-171.
- Pittman, D.L., Ortenweller, J.E., Natelson, B.H. (1990-31). Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behavioral Neurosci.* 104, :28-36.
- Pittman, O.J., Blume, H.W., Renaud, L.P. (1981-45 de elcisolpaper .

Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res.* 215:15-28.

Pittman, Q.J., Hatton, J.D., Bloom, F.E. (1980-196). Morphine and opioid peptides reduce paraventricular neuronal activity: studies of the rat hypothalamic slice preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5527-5531.

Plaut, S.M., Grotta, L.J. (1971-19). Effects of differential housing on adrenocortical reactivity. *Neuroendocrinology* 7:348-360.

Poulain, D.A., Wakerley, J.E. (1982-197). Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808.

Reite, M.; Capitanio, J.P. (1985-227). On the nature of social separation and social attachment. En: "The Psychobiology of Attachment and Separation". Reite, M. y Field, T. (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York. pg. 223-255.

Richard, P., Moos, F., Freund-Mercier, M.-J. (1991-123). Central effects of oxytocin. *Physiological Reviews* 71:331-370.

Rivier, C., Brownstein, M., Spiess, J., Vale, W. (1982-101). *In vivo* corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin, and corticosterone. *Endocrinology* 110:272-278.

Rivier, C., Vale, W. (1983-129). Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion *in vivo*. *Endocrinology* 113:939-942.

Roberts, G.W., Woodhams, P.L., Polak, J.M., Crow, T.J. (1982-215). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. *Neuroscience* 7:99-131.

Romero, L.M., Flotsky, P.M., Sapolsky, R.M. (1993-272). Patterns of adrenocorticotropin secretagog release with hypoglycemia, novelty, and restraint after colchicine blockade of axonal transport. *Endocrinology* 132:199-204.

Rosenfeld, P., Gutierrez, Y.a., Martin, A.M., Mallett, H.A., Alleva, E., Levine, S. (1991-58). Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiol Behav* 50:661-671.

Saavedra, J.M., Kvetnansky,? Kopin, I.J. (1979-64). Adrenaline, noradrenaline and dopamine levels in specific brain stem areas of acutely immobilized rats. *Brain Res* 160:271-280.

Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Morgan, M.J., Iversen, S.D. (1975-89). The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. *Brain Res* 84:195-205.

Sapolsky, R.M., Armanini, M.P., Packan, D.R., Sutton, S.W., Flotsky, P.M. (1990-108). Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotropic

hormone secretagogue release. *Neuroendocrinology* 51:328-336.

Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S. (1986-45). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews* 7:284-301.

Sasaki, F., Wu, P., Rougeau, D., Unabia, G., Childs, G.V. (1990-87). Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environment stress. *Endocrinology* 127:285-297.

Sato, S.M., Mains, R.E. (1985-69). Posttranslational processing of proadrenocorticotropin/endorphin-derived peptides during postnatal development in the rat pituitary. *Endocrinology* 117:773-786.

Sawada, S., Yamamoto, C. (1981-198). Postsynaptic inhibitory actions of catecholamines and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis. *Exp Brain Res* 41:264-270.

Sawada, S., Takada, S., Yamamoto, C. (1980-220). Electrical activity from thin sections of the bed nucleus of the stria terminalis, and the effects of neurotensin. *Brain Res* 188:578-581.

Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1983-153). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 216:121-144.

Sawchenko, P.E. (1987): *J Neurosci* 7, pg. 1093. (Buscar esta referencia para añadirla).

Sawchenko, P.E. (1991-150). A tale of three peptides: corticotropin-releasing factor-, oxytocin-, and vasopressin-containing pathways mediating integrated hypothalamic responses to stress. En: "Stress, Neuropeptides, and Systemic Disease". McCubbin, J.A., Kaufmann, P.G., Nemeroff, C.B. (eds). Academic Press, Inc., San Diego, California. Pg. 3-17.

Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1989-132). Organization of CRF immunoreactive cells and fibers in the rat brain: immunohistochemical studies. *Critical Reviews in Corticotropin-Releasing Factor*, CRC Press, Inc., pg. 29-51.

Scribner, K.A., Walker, C.-D., Cascio, C.S., Dallman, M.F. (1991-34). Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 129:99-108.

Schwartz, J., Vale, W. (???-70). Dissociation of the adrenocorticotropin secretory responses to corticotropin-releasing factor (CRF) and vasopressin or oxytocin by using a specific cytotoxic analog of CRF. *Endocrinology* 122:1695-1700.

Shioda, H., Akai, H. (1982-100). Pulse-chase studies of the POMC/beta-endorphin system in the pituitary of acutely and chronically stressed rats. *Life Sciences* 31:2185-2188.

- Shipston, M.J., Antoni, F.A. (1992-143). Inactivation of early glucocorticoid feedback by corticotropin-releasing factor *in vitro*. *Endocrinology* 130:2213-2218.
- Silverman, A.-J., Pickard, G.E. (1983-78). The hypothalamus. En: "Chemical Neuroanatomy", Emson, P.C. (ed). Raven Press, Nueva York, pg. 295-336.
- Simerly, R.B., Swanson, L.W. (1988-229). Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270:209-242.
- Sofroniew, M.V. (1985-79). Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. En: "Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol.4: GABA and Neuropeptides in the CNS. Part I". Björklund, A. y Hökfelt, T. (eds). Elsevier Science Publishers B.V. Pg. 93-164.
- Spencer, R.L., Miller, A.H., Stein, M., McEwen, B.S. (1991-107). Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary and immune tissue. *Brain Res* 549:236-246.
- Spinedi, F., Giacomini, M., Jacquier, M.-C., Gaillard, R.C. (1991). Changes in the hypothalamo-corticotrope axis after bilateral adrenalectomy: evidence for a median eminence site of glucocorticoid action. *Neuroendocrinology* 53:160-170.
- Stanton, M.E., Levine, S. (1988-27). Maternal modulation of infant glucocorticoid stress responses: Role of age and maternal deprivation. *Psychobiology* 16:223-228.
- Stanton, M.E., Gutierrez, Y.R., Levine, S. (1988-26). Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. *Behav. Neurosci.* 102:692-700.
- Suomi, S.J. (1991-40). Early stress and adult emotional reactivity in rhesus monkeys. CIBA Foundation, 1991 (buscar bien referencia en OContent).
- Sutton, R.E., Koob, G.F., Le Moal, M., Rivier, J., Vale, W. (1982-141). Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297:331-333.
- Swanson, L.W., Simmons, D.M. (1989-28). Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 285:413-435.
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.W., Rivier, J., Vale, W.W. (1983-131). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.
- Swanson, L.W., Simmons, D.M. (1989). Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 285:413-435.

- Swanson, L.W. (1987-133). The hypothalamus. En: "Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 5: Integrated Systems of the CNS. Part I". A.Björklund, T.Hökfelt y L.W.Swanson (eds). Elsevier Science Publishers B.V., pg. 1-124.
- Szczepanska-Sadowska, E. (1974). Plasma ADH increase and thirst suppression elicited by preoptic heating in the dog. *Am. J. Physiol.* 226:155-161.
- Urban, J.H., Miller, M.A., Dorsa, D.M. (1991-172). Dexamethasone-induced suppression of vasopressin gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala is mediated by changes in testosterone. *Endocrinology* 129:109-116.
- Takahashi, L.K., Turner, J.G., Kalin, N.H. (1991-46). Development of stress-induced responses in preweanling rats. *Developmental Psychobiology* 24:341-360.
- Thoa, N.B., Tizabi, Y., Jacobowitz, D.M. (1977-51). The effect of isolation on catecholamine concentration and turnover in discrete areas of the rat brain. *Brain Res* 131:259-269.
- Thoman, E.B., Levine, S., Arnold, W.J. (1968). Effects of maternal deprivation and incubator rearing on adrenocortical activity in the adult rat. *Develop Psychobiol* 1:21-23.
- Tizabi, Y., Aguilera, G. (1992-157). Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology* 56:611-618.
- Uhl, R.H., McKelvy, J.F., Harrison, R.W., Bohn, M.C. (1988-183). Demonstration of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in glucocorticoid-sensitive vasopressin and corticotropin-releasing factor neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci Res* 19:405-411.
- Urban, J.H., Miller, M.A., Dorsa, D.M. (1991-65). Dexamethasone-induced suppression of vasopressin gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala is mediated by changes in testosterone. *Endocrinology* 129:109-116.
- Van Eekelen, J.A.M., Bohn, M.C., de Kloet, E.R. (1991-185). Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. *Dev Brain Res* 61:33-43.
- Van de Kar, L.D., Richardson-Morton, K.D., Rittenhouse, P.A. (1991-7). Stress: Neuroendocrine and pharmacological mechanisms. En: "Stress Revisited. 1. Neuroendocrinology of Stress", *Methods Achieve Exp Pathol.* Jasmin, G. and Cantin, M. (eds). Basel, Karger, vol 14, pg. 133-173.
- Van de Kar, L.D., Piechowski, R.A., Rittenhouse, P.A., Gray, T.S. (1991-205). Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 54:89-95.

6. Referencias

- Van Oers, J.W.A.M., Tilders, F.J.H. (1991-114). Non-adrenocorticotropin mediated effects of endogenous corticotropin-releasing factor on the adrenocortical activity in the rat. *J Endocrinology* 3:119-121.
- Vandesande, F., Dierickx, K., De Mey, J. (1977-85). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tiss Res* 180:443-452.
- Vázquez, D.M., Akil, H. (1992-94). Development of pituitary pro-opiomelanocortin gene and peptide expression: characterization and effect of repeated intermittent maternal isolation. *Neuroendocrinology* 56:320-330.
- Viveros, M.P., Hernández, R., Martínez, I., González, P. (1988-36). Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Rev Esp Fisiol* 44:315-322.
- Viveros, M.P., Hernández, R. (1989-61). Effects of social isolation and crowding on sexual behaviour in the rat (*R. norvegicus*). *Etologia* 1:1-8.
- Walker, C.-D., Scribner, K.A., Cascio, C.S., Dallman, M.F. (1991-72). The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology* 128:1385-1395.
- Warembourg, X. (1975-191). Radioautographic study of the rat brain after injection of [3 H]corticosterone. *Brain Res* 89:61-70.
- Weller, K.L., Smith, D.A. (1982-208). Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 232:255-270.
- Westlund y col. (1985). Quantification of morphological changes in pituitary corticotropes produced by in vivo CRF stimulation and ADX. *Endocrinology* 116:439.
- Wexler, B. (1980-306). Transplantation of pituitary and adrenal glands of spontaneously hypertensive rats into hypophysectomized or adrenalectomized, normotensive Sprague-Dawley rats. *Br J Exp Pathol* 61:429-439.
- Whitnall, K.H. (1989-119). Stress selectively activates the vasopressin-containing subset of corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 50:702-707.
- Whitnall, K.H. (1988-130). Distributions of pro-vasopressin expressing and pro-vasopressin deficient CRH neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of colchicine-treated normal and adrenalectomized rats. *J Comp Neurol* 275:13-28.
- Wiener, S.G., Lowe, E.L., Levine, S. (1992-50). Pituitary-adrenal response to weaning in infant squirrel monkeys. *Psychobiology* 20:65-70.
- Woodhams, P.L., Roberts, G.W., ; Polak, J.M., Crow, T.J. (1983-272). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the bed nucleus of the stria terminalis, septum and preoptic area. *Neuroscience*

8:677-703.

Wright, I.K., Ismail, H., Upton, N., Marsden, C.A. (1991-217). Effect of isolation rearing on 5-HT agonist-induced responses in the rat. *Psychopharmacology* 105:259-263.

Wu, P., Childs, G.V. (1990-145). Cold and novel environment stress affects AVP mRNA in the paraventricular nucleus, but not the supraoptic nucleus: an *in situ* hybridization study. *Mol Cell Neurosci* 1:233-249.

Wu, P., Childs, G.V. (1991-88). Changes in rat pituitary POMC mRNA exposure to cold or a novel environment, detected by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 39:843-852.

Wynn, P.C., Harwood, J.P., Catt, K.J., Aguilera, G. (1988). Corticotropin-releasing factor (CRF) induces desensitization of the rat pituitary CRF receptor-adenylate cyclase complex. *Endocrinology* 122:351-358.

Yoshimura, F., Nogami, H. (1980-74). Immunohistochemical characterization of pituitary stellate cells in rats. *Endocrinol Japon* 27:43-51.

Young, E.A., Watson, S.J., Akil, H. (1986-96). Pituitary regulation in endogenous depression. *Progress in Brain Res* 65:153-166.

Young, E.A., Akil, H. (1985-103). Corticotropin-releasing factor stimulation of adrenocorticotropin and β -endorphin release: effects of acute and chronic stress. *Endocrinology* 117:23-30.

Zimmerman, E.A., Carmel, P.W., Husain, M.K., Fern, M., Tanenbaum, M., Frantz, A.G. (1973-343). Vasopressin and neurophysin: high concentrations in monkey hypophyseal portal blood. *Science* 182:925-927.