
10. L'ESTIMULACIÓ POSTNATAL I L'ENRIQUIMENT AMBIENTAL PODEN REDUIR L'IMPACTE DE L'ESTRÈS I PREVENIR ELS DÈFICITS COGNITIVS I NEURALS ASSOCIATS AMB L'ENVELLIMENT EN RATES

Pilar Ferré¹, Rosa M. Escorihuela¹, Albert Fernández-Teruel¹,
Joan Francesc Núñez¹, Ernesto García¹, Berta González,²
Bernardo Castellano² i Adolf Tobeña¹

10.1. GENÈTICA I DEMÈNCIA D'ALZHEIMER

En aquest segle, l'esperança mitjana de vida dels humans ha augmentat notablement. Així, mentre que pel 1900 era prop de la cinquantena, ara ja supera de llarg els 70 anys als països industrialitzats (Olshansky *et al.*, 1990; Piel, 1993). Els grans avenços biomèdics, amb el desenvolupament de mètodes preventius i les aplicacions tecnològiques que han fet possible el guariment definitiu d'algunes malalties o bé el tractament pal·liatiu en d'altres, juntament amb l'increment de la qualitat de vida, en són la causa. Però com a contrapartida, les demències fan estralls en la gent gran, disminueixen la qualitat de vida i provoquen morts prematures. Arreu, un gran nombre d'individus presenten deterioraments

1. Unitat de Psicologia Mèdica. Departament de Farmacologia i Psiquiatria. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

2. Unitat d'Histologia. Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

de les funcions mentals abans d'hora i la malaltia d'Alzheimer, tota sola, és la responsable d'un 70 % dels casos d'envelliment patològic.

Els malalts amb demència d'Alzheimer perden la memòria i d'altres funcions cognitives, tenen alteracions emocionals i s'immergeixen en un declivi progressiu i incapacitant fins a perdre tota autonomia. Les primeres observacions neuropatològiques indicaren que els cervells dels malalts d'Alzheimer presentaven cúmuls neurals i plaques senils que contenien elements neuronals degenerats (axons, dendrites) juntament amb dipòsits d'unes proteïnes: les β -amiloides (Katzman, 1986). Aquesta troballa dirigí la recerca cap a l'estudi dels mecanismes biològics que intervenen en l'expressió d'aquestes proteïnes β -amiloides.

Així, mentre que una forma de la malaltia d'Alzheimer, d'aparició primerenca, sembla estar relacionada amb un gen situat al cromosoma 14 que encara no ha estat identificat, les investigacions d'una altra forma hereditària i poc comuna, que es manifesta abans dels 60 anys, han dut a la descoberta d'una mutació en el gen de la β -amiloide situat al cromosoma 21. Altres formes més freqüents i d'aparició tardana poden estar relacionades amb gens del cromosoma 19 (Selkoe, 1993).

Molt recentment l'equip d'Allen Roses de la Duke University Medical Center de Carolina del Nord (Corder *et al.*, 1993) ha descobert que l'acumulació anormal i exagerada de proteïnes β -amiloides, juntament amb material neuronal degenerat, està associada amb la presència d'una variant de la proteïna transportadora del colesterol, l'Apolipoproteïna E4 (ApoE4). El gen de l'ApoE4 també és situat al cromosoma 19. Els experiments del grup de Roses indiquen que segons quina sigui la dosi genètica de l'ApoE4, el risc de patir la malaltia d'Alzheimer augmenta molt i l'edat en què apareix pot disminuir des dels 84 fins als 68 anys. Així, en un estudi fet amb 42 famílies que presentaven la varietat tardana de la malaltia (la més comuna), l'equip de la Duke descobrí que el risc de tenir-la era d'un 20 % per als individus sense l'al·lel ApoE4 en cap dels 2 cromosomes, i que augmentava progressivament per als individus heterozigots (amb l'al·lel en 1 cromosoma) i homozigots (en tots 2 cromosomes), fins a un 90 % de possibilitats. Aquestes investigacions han revolucionat la recerca de la malaltia d'Alzheimer i actualment el grup de Carolina del Nord intenta generalitzar aquells resultats a poblacions humanes molt més

grans. Si es confirmen, serà possible diagnosticar precoçment alguns casos de la forma tardana de la malaltia per la presència de l'ApoE4.

10.2. REACTIVITAT EMOCIONAL I ENVELLIMENT CEREBRAL

A més a més dels avenços en el coneixement de la important contribució genètica en l'aparició i desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer i d'altres demències, des de diversos camps de recerca s'ha intentat esbrinar el paper que poden tenir possibles factors addicionals. Així, s'ha treballat en l'àrea de les deficiències alimentàries, de les alteracions metabòliques i endocrines i s'ha estudiat també la influència dels successos estressants al llarg de la vida dels individus (Sapolsky, 1992).

Ací ens centrarem en el darrer aspecte, és a dir, en l'anàlisi de les propietats de l'estrès com a inductor de reaccions hormonals i conductals, que poden ésser lesives per a les neurones del cervell situades en àrees importants per a les capacitats cognitives (Sapolsky, 1992). Primer ens ocuparem de les respostes biològiques provocades pels esdeveniments aversius, i detallarem la seqüència de reaccions hormonals implicades. Després repassarem l'evidència que indica que aquelles reaccions es modifiquen durant el procés d'envelliment. Finalment, presentarem alguns treballs fets amb rates de laboratori, que suggereixen que el manteniment (o l'excessiva duració o cronicitat) d'aquelles reaccions inicials davant l'estrès, pot comportar conseqüències negatives fins al punt de provocar disfuncions prematures de les cèl·lules cerebrals.

Tot i que treballarem amb dades de diversos grups, en alguns punts d'aquest apartat inclourem també resultats obtinguts al nostre laboratori, per il·lustrar la validesa dels models animals que es presentaran.

10.2.1. *Les reaccions d'emergència*

Quan els organismes perceben algun esdeveniment que amenaça el seu equilibri, enguagen ràpidament una sèrie de reaccions que tenen l'objectiu de mobilitzar les reserves energètiques vers els

teixits que les poden necessitar, alhora que paralitzen altres processos fins que la situació crítica es normalitza.

Pel que fa al sistema endocrí, es posen en marxa una sèrie de reaccions en cadena, que impliquen la síntesi i l'alliberament de diverses hormones en diferents àrees cerebrals (l'hipotàlem i la hipòfisi, essencialment) i en algunes regions perifèriques, com les glàndules adrenals. La seqüència principal consisteix en l'activació de l'anomenat *eix hipotalàmic-hipofisiari-adrenal* (eix HPA, vegeu la figura 1) que, molt breument, funciona de la manera següent: la sensació d'alerta inicial fa que l'hipotàlem sintetitzi l'hormona alliberadora de corticotropina (CRF), la qual genera l'alliberament de l'hormona adrenocorticotròpica (ACTH) des de la hipòfisi al torrent sanguini. Quan l'ACTH arriba a les glàndules adrenals situades damunt dels ronyons (les tercers protagonistes de la cadena), inicien la secreció dels *corticosteroides* o *glucocorticoides*. Els més característics són la corticosterona en rates de laboratori i el cortisol en micos i humans.

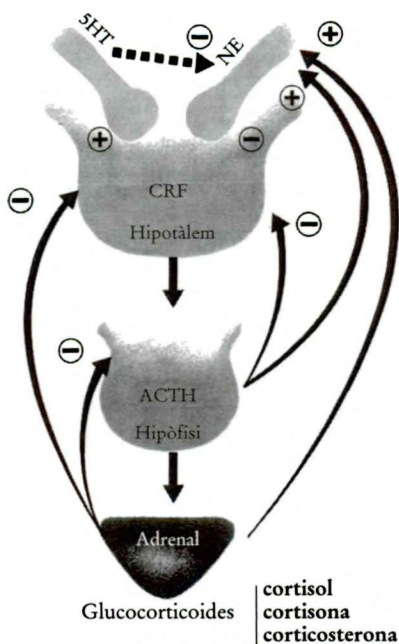


FIGURA 1. Eix hipotalàmic-hipofisiari-adrenal.

La funció dels corticosteroides consisteix a fer convergir els sistemes fisiològics vers una colla de reaccions que, en últim terme, han de facilitar la fugida ràpida o la lluita agressiva contra l'agent amenaçador. Per tal d'obtenir el màxim rendiment, es mobilitzen les reserves energètiques (els dipòsits de sucres i greixos), s'incrementen les capacitats cardiovasculars i pulmonars (augmenta la freqüència cardíaca i la vasodilatació dels bronquis), al mateix temps que es produeix la immunosupressió i s'aturen els processos digestius i les reaccions anabòliques, com la síntesi d'hormones del creixement i sexuals.

Un cop al torrent sanguini, els corticosteroides són transportats als òrgans perifèrics i al cervell, on actuaran sobre diverses estructures. Una d'elles, l'hipocamp, és especialment rellevant per als processos neurals que fan possible l'aprenentatge i la memòria. En aquesta regió hi ha una gran densitat de receptors per als glucocorticoides, que s'encarreguen de regular —mitjançant un sistema de retroalimentació negativa— els nivells d'aquelles hormones en sang. Així, una altra funció dels glucocorticoides seria —mitjançant els receptors situats en l'hipocamp i també al mateix hipotàlem— bloquejar les reaccions que han dut al seu alliberament (s'aturaria, per tant, l'alliberament de CRF i ACTH) (De Kloet i Reul, 1987). Aquest sistema de retroalimentació negativa constitueix un mecanisme molt important per a controlar l'activitat de l'eix.

Un exemple de reaccions en situacions d'emergència el tenim en les respostes fisiològiques desencadenades quan les rates de laboratori s'enfronten a situacions de conflicte experimental. Una de les situacions on vam estudiar aquesta resposta és l'aprenentatge d'evitació activa en dos sentits. En aquesta tasca, l'animal ha d'aprendre a evitar un xoc elèctric saltant a l'altre compartiment d'una gàbia llançadora (figura 2A). L'arribada imminent del xoc és anunciada per una llum i un to, de manera que la resposta correcta que permetrà evitar el xoc consisteix a canviar de compartiment mentre els indicadors emeten el senyal. En els primers assaigs l'ansietat té un paper fonamental. Així ho indica el fet que els fàrmacs ansiolítics i ansiogènics poden millorar o empitjorar, respectivament, l'execució inicial dels animals. A la taula I es mostren aqueixos efectes, que faciliten o empitjoren l'execució, sobre el nombre d'evitacions, d'algunes benzodiazepines ansiolítiques (l'alprazolam, diazepam i adinazolam) i de substàncies ansiogèniques que actuen també sobre els receptors benzodiazepínic, com el FG 7142 o el Ro 15-4513 (Fernández-Teruel *et al.*, 1991).

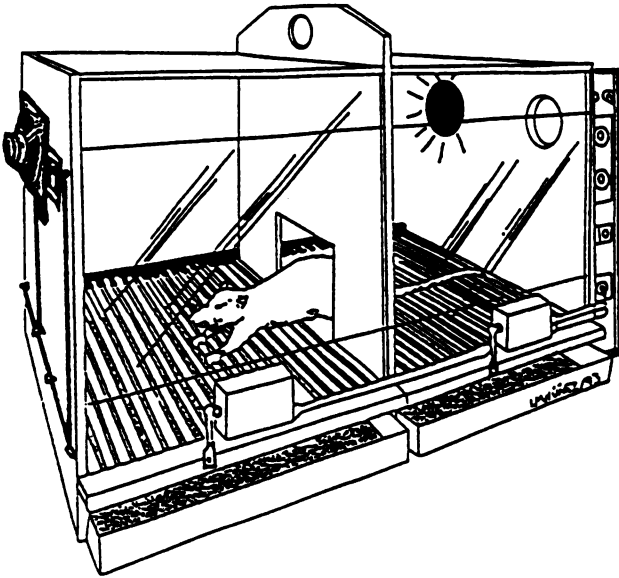


FIGURA 2A. Gàbia d'evitació activa en dos sentits (tret d'Escorihuela *et al.*, 1994a).

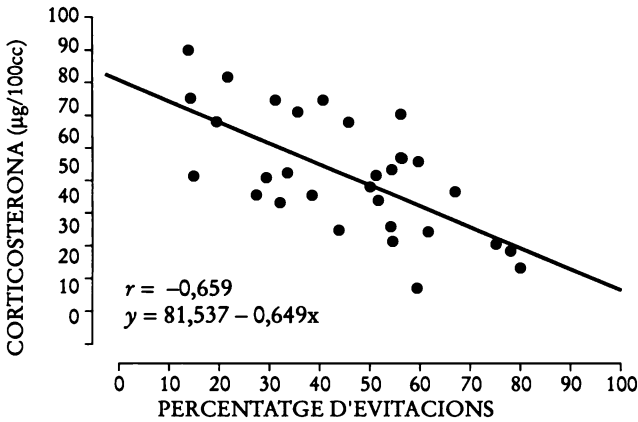


FIGURA 2B. Relació inversa entre els nivells plasmàtics de corticosterona (eix Y) i el percentatge d'evitacions en una sessió de 40 assaigs (tret de Boix *et al.*, 1992).

TAULA I

Validació psicofarmacològica de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits com un model d'ansietat. Efecte de substàncies ansiolítiques i ansiogèniques (tret de Fernández-Teruel *et al.*, 1991)

	<i>Dosi mg/kg</i>	<i>Evitacions totals</i> $\bar{X} \pm ES$
ANSIOLÍTICS		
Vehicle	—	4,9 ± 1,1
Pentobarbital	1,25	4,4 ± 1,7
Pentobarbital	2,5	6,6 ± 3,0
Pentobarbital	5,0	12,4 ± 2,6*
Vehicle	—	14,7 ± 2,9
Alprazolam	1,0	21,8 ± 4,7
Alprazolam	1,25	25,2 ± 4,3*
Alprazolam	1,5	23,1 ± 2,3
Diazepam	2,0	14,3 ± 4,4
Diazepam	4,0	31,2 ± 1,3*
Vehicle	—	14,4 ± 2,7
Adinazolam	1,0	14,0 ± 2,7
Adinazolam	2,0	19,8 ± 4,1
Adinazolam	4,0	19,3 ± 3,4
Adinazolam	6,0	27,9 ± 1,6*
ANSIOGÈNICS		
Vehicle	—	16,5 ± 3,7
Ro 15-4513	2,0	16,8 ± 4,5
Ro 15-4513	5,0	13,4 ± 3,4
Ro 15-4513	10,0	3,2 ± 1,0*
Vehicle	—	23,8 ± 3,0
FG 7142	5,0	6,6 ± 1,5*
FG 7142	10,0	4,0 ± 1,4*
FG 7142	15,0	8,7 ± 3,5*

* $p < 0,05$ (Prova de Duncan)

Doncs bé, utilitzant aquest mateix model vam observar que el conflicte experimental provocava importants increments en els nivells plasmàtics de corticosterona. Increments que correlacionaven

negativament amb el rediment, de manera que en les rates que havien fet menys respostes d'evitació en una sessió completa de 40 assaigs, els nivells de corticosterona eren més elevats, mentre que les rates que havien evitat més xocs (que havien resolt millor, per tant, el conflicte) mostraren nivells hormonals inferiors (figura 2B) (Boix *et al.*, 1992).

Resultats paral·lels en humans havien estat descrits per Holger Ursin, Eivind Baade i Seymour Levine (1978), en estudiar els augments de cortisol en un grup de 72 soldats durant els 11 primers salts d'un procediment d'entrenament per a saltar en paracaigudes (figura 3). Les mesures es prenen immediatament abans i 20 minuts després del salt (indicades per les barres esquerra i dreta, respectivament, en cada salt en la figura 3). Tal com passà amb les rates durant l'adquisició de l'evitació activa, les pujades de cortisol disminuïren a mesura que els soldats perdien la por a saltar, és a dir, amb la resolució correcta de la tasca. De manera que, al cinquè salt, ja no hi havia diferència amb els nivells de cortisol basals.

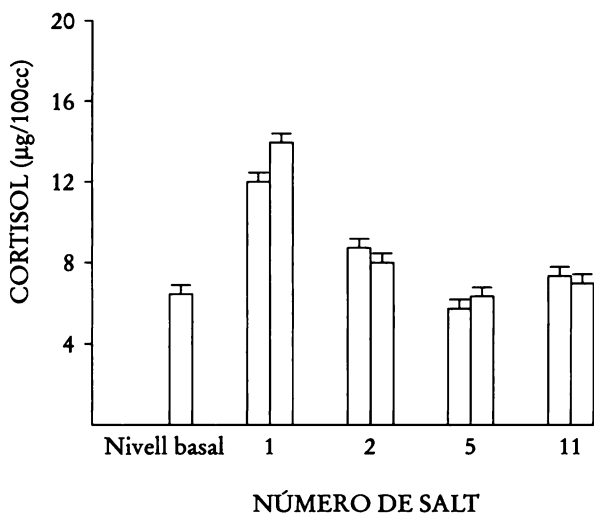


FIGURA 3. Nivells plasmàtics de cortisol en soldats paracaigudistes. Al cinquè salt ja no s'observa diferència amb el nivell basal (tret d'Ursin *et al.*, 1978).

Aquest conjunt de reaccions, que constitueixen una resposta adaptativa en situacions d'emergència, pot arribar a ser lesiu si l'eix hipotalàmic-hipofisiari-adrenal és activat massa sovint i amb molta

intensitat. Per exemple, les llagues d'estómac que pateixen persones sotmeses a pressures psicològiques importants podrien ser conseqüència de les alteracions dels processos digestius provocades per aquelles reaccions fisiològiques (Wolf i Wolff, 1947; Ader, 1979). Altres exemples són la hipertensió induïda per l'estrès o el risc més gran d'emmalaltir que té l'organisme per la vulnerabilitat immunològica (immunosupressió) que pot acompanyar la prolongació dels estats d'ansietat severa (Sapolsky, 1991). Així doncs, resulta que si bé la resposta hormonal en situacions d'emergència és vital per a l'afrontament de perills passatgers, pot provocar, també, disfuncions greus si és activada en excés o si l'organisme és incapaç de suspendre-la en el moment adequat. Per tant, davant del risc que comporta una exposició continuada a nivells elevats de glucocorticoides, s'entén la importància del mecanisme de retroalimentació negativa, pel qual s'inhibeix l'ulterior alliberament de CRF i ACTH, un cop l'organisme percep que la situació amenaçadora ha desaparegut.

10.2.2. *Envelliment i fisiologia de l'emergència*

Els animals vells són més espantadissos i porucs que els joves. És a dir, situacions que en l'individu jove no generen sensacions de perill, en el vell poden ésser percebudes com a molt crítiques. Amb l'envelliment augmenten, per tant, les oportunitats de patir situacions aversives i de sentir-se amenaçat. Amb la qual cosa, també ho fa el nombre de respostes fisiològiques d'emergència.

Les investigacions fetes amb rosegadors vells demostren que, si bé el funcionament bàsic de l'eix HPA no canvia, sí que hi ha modificacions importants en els nivells basals de corticosterona (en absència d'estrès), en la durada de les reaccions hormonals i en el nombre de receptors per als glucocorticoides a l'hipocamp.

Pel que fa als nivells basals, en un treball de revisió recent, Robert Sapolsky (1992) agrupà els experiments on es mesuraven els nivells de corticosterona de rates joves i velles (vegeu la figura 4) durant el dia i la nit (ja que, en condicions basals, la secreció d'aquesta substància presenta oscil·lacions dia-nit) i comprovà que, en la majoria de casos, els nivells d'hormona eren 4 vegades superiors en les rates velles (representades per les barres ratllades a la figura). Això, si l'estudi s'havia fet de dia. Si l'experiment s'havia fet de nit, la diferència es doblava.

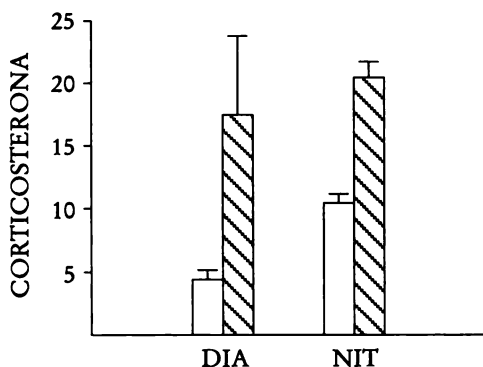


FIGURA 4. Mitjana \pm ES dels nivells de corticosterona en rates joves (barres blanques) i velles (barres ratllades). En les rates velles, aquest nivell basal és superior, tant durant el dia com a la nit (tret de Sapolsky, 1992).

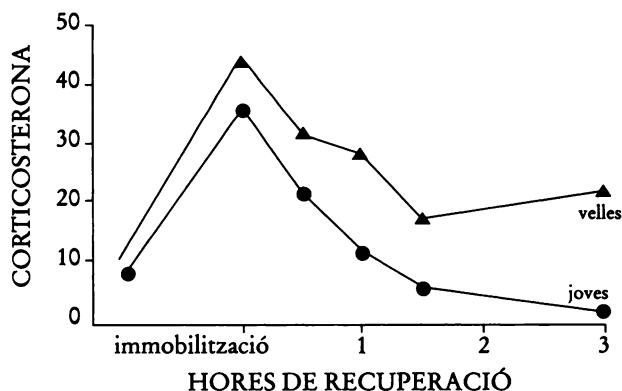


FIGURA 5. Variacions en els nivells de corticosterona plasmàtica produïdes per la immobilització, en rates joves i velles. Tres hores després de la immobilització els animals velles presenten nivells molt més elevats que els joves (tret de Sapolsky, 1992).

Quant a la durada de la reacció de l'eix HPA, es determinà mesurant les concentracions plasmàtiques de les hormones, en diversos moments després d'un episodi estressant. Sapolsky *et al.*, (1992) intentaren esbrinar si hi havia diferències entre rates joves i velles en aquella reacció. Per això, van immobilitzar-les durant 60 minuts (procediment habitual per produir estrès en animals de laboratori) i a continuació van mesurar la corticosterona a inter-

vals de 60 minuts. En la figura 5 es veu com les rates velles mantenen nivells alts en circulació 3 hores després d'haver acabat la immobilització, mentre que les rates joves havien retornat als nivells basals (immediatament anteriors a l'inici de l'estrès) al cap d'1 hora i mitja.

Pel que fa al tercer aspecte que, com hem dit al principi, es modifica amb l'edat —el nombre de receptors per als glucocorticoides—, s'ha vist que, en els animals vells, es produeix una pèrdua en diverses àrees de l'hipocamp (figura 6), que en alguns casos arriba a ser del 50 % (Sapolsky, 1992). A més a més, sembla que aquesta disminució en el nombre de receptors és selectiva per a l'hipocamp, i no apareix en altres zones com l'amígdala, l'hipotàlem o el còrtex.

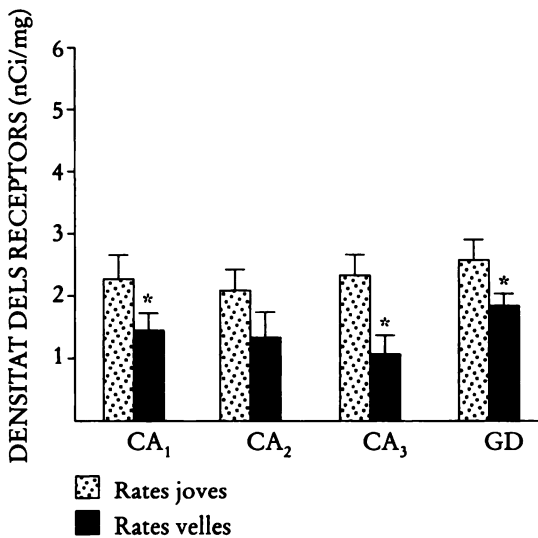


FIGURA 6. Densitat dels receptors de glucocorticoides en l'hipocam de rates joves i velles distribuïda en diverses regions: capes CA₁, CA₂, CA₃ i gir dentat (tret de Sapolsky, 1992).

Quan a la resposta endocrina, els organismes vells es caracteritzen, doncs, per una major vulnerabilitat a veure amenaçat el seu equilibri, per una major concentració de corticosteroides en situació basal, per una major dificultat per a acabar amb la reacció d'e-

mergència un cop ha desaparegut l'estímul amenaçador i per un menor nombre de receptors hipocampals per als glucocorticoides.

10.2.3. *Els glucocorticoides poden lesionar les neurones*

Cada cop sembla més clar que l'exposició perllongada als corticosteroides té efectes nocius que condueixen a la mort neuronal i a l'augment de reactivitat glial a l'hipocamp, 2 processos característics de l'envelliment. A més a més, en aqueixes condicions disminueix la capacitat de les neurones hipocampals per a resistir agents tòxics o manipulacions traumàtiques que produeixen degeneració neural, com la hipòxia-isquèmia o les convulsions exitotòxiques (Sapolsky *et al.*, 1986). Això ha portat a pensar que els nivells alts perllongats d'aquestes substàncies podrien accelerar la pèrdua neuronal durant l'envelliment i augmentar la severitat dels dèficits neurològics induïts per agents tòxics.

Sapolsky (1990) intentà avaluar quins eren els efectes dels nivells elevats de corticosteroides, administrats externament, en l'hipocamp de micos. Per comprovar-ho, implantà a 4 micos una càpsula que alliberava quantitats molt petites, però constants, de cortisol en un dels hipocamps i una càpsula de control a l'hipocamp contralateral (en 2 dels micos, la càpsula de cortisol s'introduí en l'hipocamp dret i en els altres 2, en l'esquerre). Un any després, els hipocamps que havien rebut cortisol tenien les capes cel·lulars desorganitzades i s'hi detectaren neurones atrofiades amb arbres dendrítics molt poc brancuts.

En altres treballs dedicats a l'hipocamp, a més a més d'avaluar els efectes lesius dels corticosteroides utilitzant mesures morfològiques, s'ha intentat comprovar si també hi ha canvis en els marcadors electrofisiològics de l'envelliment. Un d'aquests estudis el feren Steven Kerr i els seus col·laboradors (1991), i avaluaren l'activitat elèctrica, és a dir, la resposta funcional, de les neurones hipocampals, en rates velles i joves que prèviament havien estat sotmeses a llargs períodes d'estrès. Així, els animals van passar per un entrenament de 6 mesos en l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (la qual, com hem vist anteriorment, pot comportar un important nivell d'ansietat per als animals), procediment que incrementava els nivells de corticosterona en plasma. Els resultats indicaren que la funció neural hipocampal en els animals velles, i

també en els animals joves sotmesos a estrès, era inferior a la detectada en les rates joves no sotmeses a l'estrès. Però també demostren que els llargs períodes d'estrès provocaven mort neuronal incrementada en les rates velles i no així en les rates joves. A la figura 7, pot observar-se una disminució en la densitat de neurones piramidals a l'hipocamp de rates velles: xifres de mort neuronal incrementades per l'estrès que només apareixen en aquestes rates. Els autors conclogueren que, si bé el funcionament de les neurones ja pot quedar malmès a causa d'episodis greus soferts en etapes juvenils, en edats més avançades aqueixos episodis poden provocar la mort de cèl·lules nervioses. La qual cosa indica que els individus vells es mostren més sensibles que els joves a les accions neurodegeneratives de l'estrès crònic.

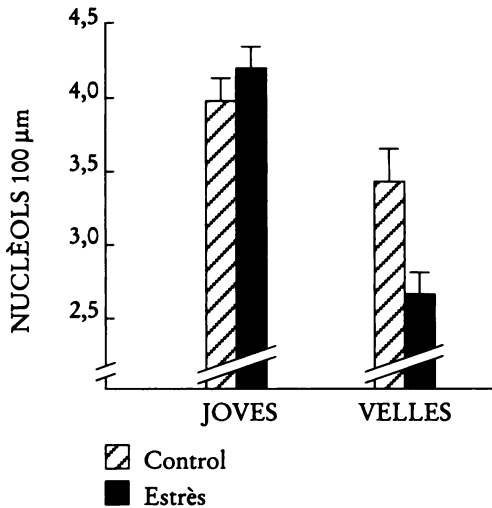


FIGURA 7. Densitat de les neurones piramidals a l'hipocamp en animals joves i vells, de control i sotmesos a estrès crònic. Únicament en les rates velles s'observa una mort neuronal incrementada (Kerr *et al.*, 1991).

10.3. ESTUDIS EXPERIMENTALS SOBRE EL DETERIORAMENT DE LES CAPACITATS COGNITIVES

A més a més de l'estudi de les alteracions morfològiques i fisiològiques durant l'envelliment, hi ha una altra sèrie de treballs

que han intentat abordar el problema des del punt de vista conductal. Amb aqueixa finalitat s'han elaborat models que s'han centrat, bàsicament, en l'estudi del deteriorament de les capacitats cognitives.

Una de les estratègies que s'ha emprat ha estat el desenvolupament de paradigmes per avaluar l'orientació-desorientació espacial. Un exemple de procediment d'aquest tipus el constitueix un treball (Beatty, 1988) en què es comparava l'execució de dones joves i velles: els subjectes havien de planejar i executar la ruta més eficient (mesurada per la longitud de la trajectòria recorreguda) per reunir una colla de productes que s'havien especificat prèviament. La prova es feia en dues situacions diferents: *a*) en un supermercat habitual, i *b*) en un supermercat nou, que se'ls deixava explorar durant un període curt de temps. Les trajectòries de les dones joves foren semblants en els dos tipus de supermercats, és a dir, resultaren ser igualment eficients en els dos escenaris. En canvi, les trajectòries de les dones velles foren més llargues en el supermercat nou que en l'habitual, és a dir, els costà més d'orientar-se en un territori pràcticament desconegut.

En els animals de laboratori, els paradigmes més utilitzats han estat els laberints on han d'aprendre i recordar quin és el camí correcte (prèviament fixat per l'experimentador), per arribar a aconseguir una recompensa (menjar o beguda) o l'acabament d'un xoc (Rawlins i Deacon, 1993). L'interès per a avaluar la capacitat d'aprenentatge dels animals vells (sobretot en tasques espacials deriva de troballes que han fet pensar en l'hipocamp com una àrea molt implicada en l'orientació espacial dels animals (O'Keefe i Nadel, 1978). Així, s'ha desenvolupat un model, el *Morris water test*, que consisteix en una piscina rodona plena d'aigua on l'animal, per escapar, ha de trobar una plataforma que està submergida. Per a aconseguir-ho, s'ha d'ajudar de senyals contextuais externs a l'aparell: elements espacials ben perceptibles com finestres, portes i fotografies penjades a les parets (Stewart i Morris, 1993). En un treball realitzat per Rapp *et al.* (1987) comprovaren que, quan els animals eren entrenats per aprendre a localitzar una plataforma que no estava submergida, no hi havia diferències entre els joves i els velles, però si es submergia la plataforma i es col·locava en un lloc diferent de la piscina, els animals vells tenien més dificultat per a aprendre a localitzar la plataforma en la nova posició.

10.4. PREVENCIÓ DEL DECLIVI COGNITIU I NEURAL: ESTIMULACIÓ POSTNATAL I ENRIQUIMENT AMBIENTAL

Un cop comprovat que en la malaltia d'Alzheimer hi havia alteracions de diversos sistemes de neurotransmissió cerebral, s'engegà una recerca intensíssima de tractaments curatius i preventius de tipus essencialment farmacològic. D'altra banda, una altra línia d'atac ha evidenciat la capacitat de determinats tractaments d'estimulació precoç per prevenir l'aparició de dèficits cognitius i degeneració neural associats a l'edat. D'aquests tractaments (l'enriquiment ambiental i l'estimulació postnatal) i dels seus efectes beneficiosos, ens n'ocuparem seguidament.

10.4.1. *L'enriquiment ambiental*

Ja en el segle XIX van aparèixer una sèrie de treballs que avaluaren els efectes de l'experiència en l'organització cerebral, encara que les primeres dades publicades sobre els efectes neuroanatòmics de l'enriquiment ambiental daten del 1962 (Rosenzweig *et al.*, 1962). En aqueixos treballs el procediment bàsic consistia a situar grups d'animals (8-12 si eren rates, 15-20 si eren ratolins) en gàbies grans durant un període que variava de setmanes a mesos (figura 8). En les gàbies hi havia objectes en diferents llocs (joguines, estructures metàl·liques que formaven escales, etc.) que es canviaven diàriament, o dia sí, dia no. A partir d'aquests primers estudis, se n'han fet molts altres, i s'han introduït canvis en la durada del procediment d'enriquiment, el tipus d'estimulació, el nombre d'animals col·locats a la gàbia, etc. Però en tots ells els resultats han indicat, bàsicament, que l'enriquiment ambiental produeix modificacions morfològiques i neuroanatòmiques, en diverses àrees de l'SNC. Així, hi ha un augment en el pes de l'escorça cerebral (l'efecte es constata sobretot en l'escorça occipital) i un increment en el nombre de cèl·lules glijals. També hi ha un augment en el nombre i grandària de les branques dendrítiques en algunes àrees visuals. S'observa, també, una major densitat d'espines dendrítiques. En les sinapsis, s'ha detectat un augment en la grandària de les espines i del nombre total i l'àrea de contactes sinàptics, sobretot en l'hipocamp i el cerebel (Rosenzweig *et al.*, 1972).

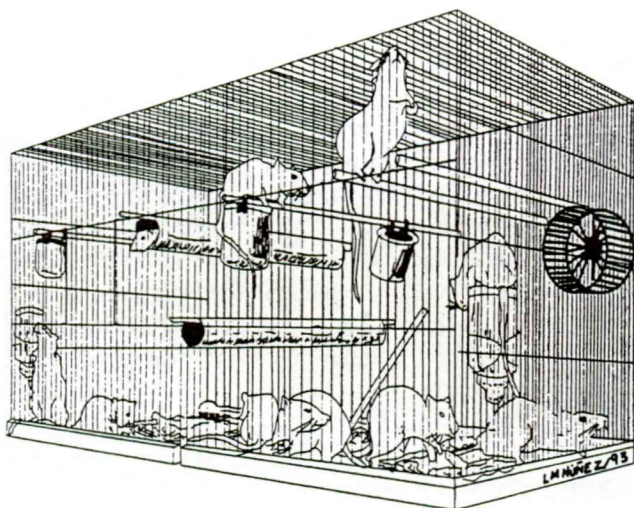


FIGURA 8. Gàbia d'enriquiment ambiental (treta d'Escorihuela *et al.*, 1994a).

Recentment s'ha descrit que el nombre de receptors per als glucocorticoides a l'hipocamp augmenta amb l'enriquiment, cosa que va acompanyada d'una disminució del nivell de corticosteroides circulants (Sapolsky, 1993). Aquest resultat podria explicar l'efecte beneficiós del tractament pel que fa a la prevenció dels dèficits lligats a l'envelliment, ja que s'atenua l'efecte nociu d'una exposició perllongada a aquelles hormones.

Pel que fa als efectes d'aquell tractament en paràmetres conductuals, alguns resultats han mostrat que els animals enriquits són superiors en tasques d'aprenentatge espacial (Renner i Rosenzweig, 1987). A més a més, aquesta millora es manté a llarg termini, de manera que encara s'ha observat 300 dies després d'haver finalitzat el període d'enriquiment (Denenberg *et al.*, 1968). D'altra banda, algunes dades obtingudes al nostre laboratori (Escorihuela *et al.*, 1994) ens han fet pensar que l'enriquiment tindria efectes en l'emotivitat dels animals. Així, en una «taula de forats» (figura 9A), que és una situació experimental on es mesura l'activitat exploratòria dels animals, s'observà que el grup d'animals enriquits passà més temps explorant els forats que els no tractats (taula II). En una altra prova que s'usa per avaluar l'ansietat dels animals, el *laberint elevat en creu* (figura 9B), el

grup enriquit mostrà més activitat en els braços oberts de l'aparell (mesura usada tradicionalment com a índex de l'emotivitat els animals, taula II). També es veié que aquests mateixos subjectes realitzaren un major nombre d'evitacions (i resoleren per tant amb més èxit el conflicte) en la tasca d'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (taula II). Aquests resultats, junt amb els efectes neuroanatòmics de l'enriquiment, ens feren pensar que en les accions a llarg termini d'aquest tractament podria intervenir-hi una reducció de l'emotivitat.

TAULA II

Efectes de l'enriquiment ambiental en la conducta de les rates en tasques relacionades amb l'exploració i l'emotivitat

	<i>LABERINT ELEVAT EN CREU</i>	<i>TAULA DE FORATS</i>	<i>ADQUISICIÓ DE L'EVITACIÓ ACTIVA</i>
	<i>Entrades en braços oberts</i>	<i>Temps d'exploració</i>	<i>Nombre d'evitacions</i>
Grup de control	4,1 ± 0,5	6,6 ± 1,4	47,9 ± 5,3
Grup enriquit	5,9 ± 1,1	16,4 ± 4,3*	61,4 ± 3,2*

* $p < 0,05$ c/ Grup de control

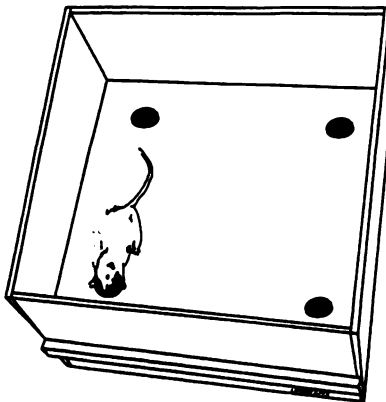


FIGURA 9A. Taula de forats (treta d'Escorihuela *et al.*, 1994a).

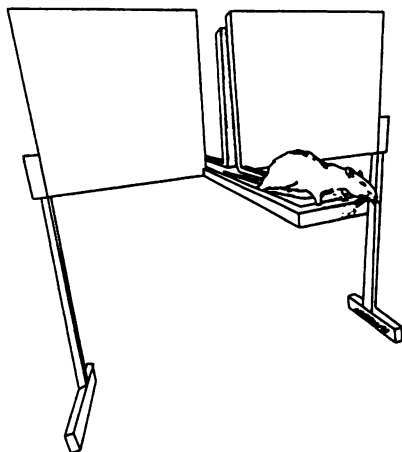


FIGURA 9B. Laberint elevat en creu (tred d'Escorihuela *et al.*, 1994a).

10.4.2. L'estimulació postnatal

Un altre tractament que ha mostrat efectes beneficiosos a llarg termini ha estat l'estimulació tàctil i cinèsica (estimulació postnatal). De fet, ha constituït un tractament d'elecció (combinada amb estímuls visuals, auditius o socials; Kramer i Pierpont, 1976; Scarr-Salapatch i Williams, 1973) per a prevenir possibles dificultats en l'aprenentatge i alteracions conductals en infants prematurs. Malgrat usar procediments diferents (alguns autors s'han centrat en l'administració, diverses vegades al dia, de carícies a la cara, extremitats i esquena dels infants, Solkoff *et al.*, 1969; mentre que d'altres han introduït, a més a més, flexions de cames i braços, Field *et al.*, 1986), els resultats dels diversos treballs han indicat que els infants estimulats són més actius, que guanyen pes més de pressa (Solkoff *et al.*, 1969; Field *et al.*, 1986), que estan més temps desperts i que mostren índexs més alts d'habitució i orientació, així com de maduració motora i conductal que no pas els no manipulats (Field *et al.*, 1986). A més a més, s'ha vist que aquests efectes persisteixen, com a mínim, durant els primers 8 mesos de vida (Field *et al.*, 1986).

El 1988 un equip d'investigadors de la McGill University de Mont-real (Meaney *et al.*, 1988), administrà tractaments d'estimulació tàctil i cinèsica a rates de laboratori durant el període d'alletament (estimulació postnatal). Aquesta manipulació retardava la mort de les

neurones hipocampals i l'aparició de dèficits d'aprenentatge i de memòria en rates velles, en un dels tests espacials usats per avaluar aquests paràmetres (el *Morris water test*). Els animals vells trigaven més temps i recorrien més distància que els animals joves abans de trobar regularment la plataforma de seguretat. En canvi, els animals vells que havien rebut estimulació tàctil i cinèsica durant l'alletament, es comportaven com les rates joves (figura 10). D'altra banda, les rates velles mostraven hipersecreció i una pèrdua de receptors de glucocorticoides i de neurones a l'hipocamp, mentre que, en els animals estimulats, no hi havia hipersecreció de glucocorticoides i s'observava una disminució de mort neuronal a l'hipocamp. Els autors hipotetitzaren que aquests efectes de l'estimulació postnatal provindrien d'una menor exposició als glucocorticoides al llarg de tota la vida dels animals.

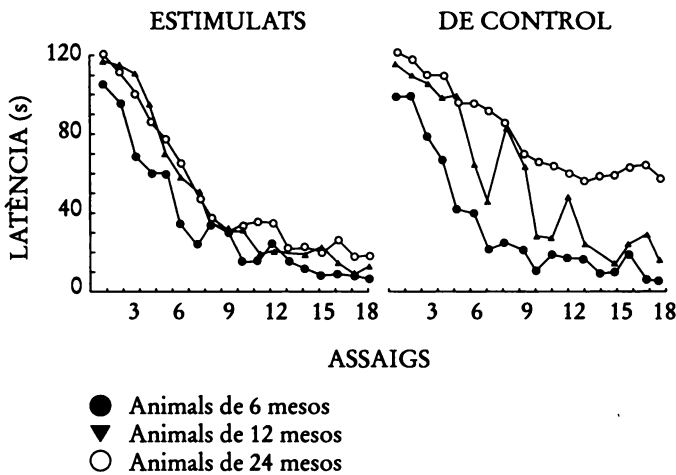


FIGURA 10. Latència (en segons) en trobar la plataforma en grups d'animals de control i estimulats postnatalment. Hi ha una diferència entre l'execució dels animals estimulats i no estimulats de 24 mesos ($p < 0,05$, test de Duncan).

De fet, aquests mateixos autors i d'altres també, han descrit els efectes del tractament d'estimulació en l'eix HPA. D'una banda, els animals estimulats mostren nivells basals de corticosterona més baixos que els no tractats (figura 4, Meaney *et al.*, 1987). I, a més a més, el retorn a la línia basal després dels increments produïts per estrès (ex.: immobilització) és més ràpid en els animals estimulats (figura 5,

Meaney *et al.*, 1991), la qual cosa indica que es recuperen més aviat. Aquests efectes són just el contrari del que passa en l'envelliment: en les rates velles les concentracions de corticosterona basals són més elevades i hi ha una hipersecreció de corticosterona durant la fase de recuperació (quan l'estrès ja ha finalitzat). És a dir, que els animals vells triguen molt més temps a tornar a l'estat basal (Sapolsky, 1992).

L'eficàcia superior dels animals estimulats precoçment per a retornar l'eix HPA al seu funcionament basal després d'un estrès, pot ésser mitjançada per una major sensibilitat de les neurones de l'hipocamp als glucocorticoides circulants i per un major nombre de receptors per als glucocorticoides en aquella àrea. De fet, s'ha comprovat que l'estimulació postnatal produeix un increment en el nombre d'aquells receptors (Sarrieau *et al.*, 1988; Meaney *et al.*, 1989). La importància d'aquests resultats rau en el fet que la disminució en el nombre de receptors per als glucocorticoides comporta un augment de corticoides circulants, unes conductes i reaccions fisiològiques menys adaptatives en situacions estressants i una major probabilitat d'aparició de dèficits neuroanatòmics (mort neuronal incrementada a l'hipocamp) i de dèficits cognitius (d'aprenentatge i memòria) que s'agreuarien amb l'edat. Per tant, un augment en el nombre d'aquells receptors induiria als efectes contraris: el nivell de corticoides circulants seria més baix, i es retardaria l'aparició de problemes d'aprenentatge, dèficits de memòria i mort neuronal a l'hipocamp (Meaney *et al.*, 1987, 1988, 1989, 1991).

Meaney *et al.* (1988) hipotetitzaren que el mecanisme explicatiu dels efectes de l'estimulació postnatal podria ser la reducció permanent de la reactivitat emocional, amb una menor exposició, al llarg de tota la vida de l'animal, a nivells elevats de corticosteroides. És per això que, al nostre laboratori, ens ha interessat estudiar aquesta qüestió, és a dir, mesurar en treballs longitudinals si els animals que han rebut una estimulació postnatal són menys reactius que aquells que no l'han rebuda. Per comprovar-ho, hem estudiat la conducta d'aquests animals en diverses situacions experimentals on s'avalua la reactivitat emocional espontània, la por a la novetat i la capacitat per a resoldre tasques que impliquen un elevat grau de conflicte.

En els dos apartats que segueixen presentarem treballs realitzats en la darrera època al nostre laboratori, amb l'objectiu d'esbrinar si el tractament d'estimulació postnatal té efectes en la reactivitat emocional a llarg termini i si la combinació d'aquesta manipulació amb l'enriquiment ambiental produeix efectes additius. És a dir, si

les millores aconseguides amb cadascun dels tractaments es potencien en ser administrats conjuntament, ja que tots dos mostren, en alguns casos, efectes paral·lels en l'emotivitat que podrien anar lligats a l'expressió dels receptors de glucocorticoides a l'hipocamp.

10.5. ESTUDIS RECENTS D'INTERVENCIÓ PRIMERENCA

10.5.1. *L'estimulació postnatal en tests d'emotivitat*

El procediment d'estimulació postnatal consistí a agafar les cries i, després de manipular-les molt suaument, col·locar-les en gàbies individuals, on restaven durant 15 minuts, per ésser retornades després amb la seva mare. Aquesta intervenció s'efectuà, cada dia, a la mateixa hora, durant els 22 primers dies de vida dels animals (període d'alletament).

Quan tenien 1 mes de vida, es va fer un primer estudi dels efectes del tractament en un test de *reacció a la manipulació*, on s'avaluà la reactivitat emocional a partir de l'observació de si mostraven resistència a ésser agafats i si intentaven fugir quan l'experimentador els tenia atrapats. Els resultats indicaren que els subjectes estimulats durant els primers dies de vida mostraren una menor reactivitat emocional. Així, cap animal del grup estimulat es resistí a ser afagat, respecte d'un 80 % en el grup no tractat. Un cop agafats, solament el 5 % dels estimulats feien intents de fugida, respecte del 40 % dels no estimulats. Cal destacar que aquests efectes s'han observat en mascles i en femelles i es mantenen en els animals adults.

Una altra situació on l'estimulació postnatal té efectes clarament reductors de la reactivitat emocional és la *hiponeofàgia alimentària*. Es tracta d'un model basat en la inhibició o disminució de la conducta d'ingesta provocada per la por a la novetat. El procediment consisteix a acostumar els animals a menjar durant 1 sola hora, cada dia, al llarg de 15 dies, de manera que es redueix el seu pes al 80 % aproximadament. El dia de la prova, se'ls presenta el seu menjar habitual en una situació nova o també se'ls pot donar menjar nou (p. ex.: xocolata, poma, galetes, etc. Shepard *et al.*, 1982; Bodnoff *et al.*, 1987), per tal d'inhibir encara més la conducta d'ingesta. Aquesta inhibició de la ingesta pot ser revertida amb tractaments que redueixen l'ansietat, com els fàrmacs ansiolítics (She-

pard *et al.*, 1982; Soubrié *et al.*, 1975); al nostre laboratori, per exemple, hem observat que el clorodiazepòxid mostra un efecte dosiddependent quan és administrat 30 minuts abans del test. En els animals estimulats precoçment s'observà el mateix fenomen, és a dir, mostraren menys inhibició alimentària que el grup de control, ja que passaren més temps menjant, ingeriren més quantitat d'aliment i trigaren menys temps a menjar que els subjectes no tractats (figura 11), la qual cosa indica que hi ha una disminució en la por a la novetat.

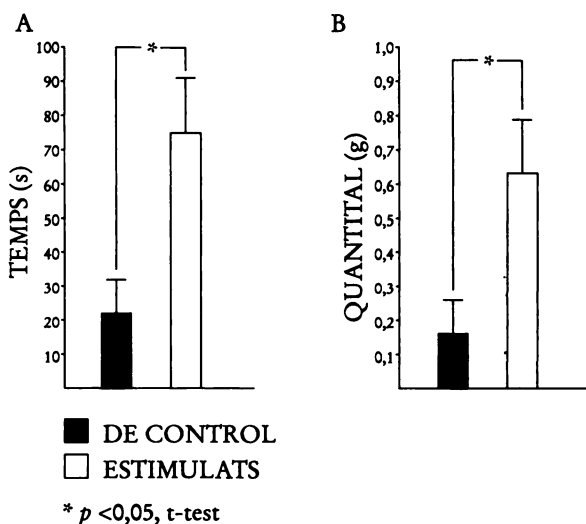
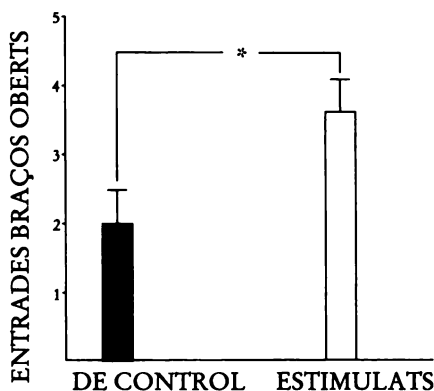


FIGURA 11. A. Temps que els animals passen menjant al test d'hiponeofàgia alimentària; B. Quantitat de menjar ingerida en el mateix test.

Hem obtingut efectes concordants en el *laberint elevat en creu* (Pellow *et al.*, 1985), que és una prova àmpliament utilitzada per mesurar l'ansietat en els rosegadors. L'aparell consta de 2 braços oberts i 2 de tancats, i està aixecat del terra (figura 9B); conté, per tant, 3 elements ansiògens que són l'espai obert, l'alçada i la novetat. És per això que els animals, quan són col·locats en aquesta situació, tendeixen a passar la major part del temps als braços tancats. Els fàrmacs ansiolítics, com les benzodiazepines clàssiques i també els fàrmacs d'acció serotoninèrgica, com la cetanserina i la buspirona, (Chopin i Briley, 1987) augmenten, de manera selectiva, el temps passat en els braços oberts, mentre que els ansiogènics

els disminueixen (Pellow i File, 1986), cosa que indica que el test és sensible a manipulacions de l'estat emotiu dels animals. En aquest model, els nostres resultats indicaren que, efectivament, els animals estimulats mostraven més activitat (més entrades) als braços oberts (figura 12), la qual cosa suggereix novament una reducció en l'emotivitat.



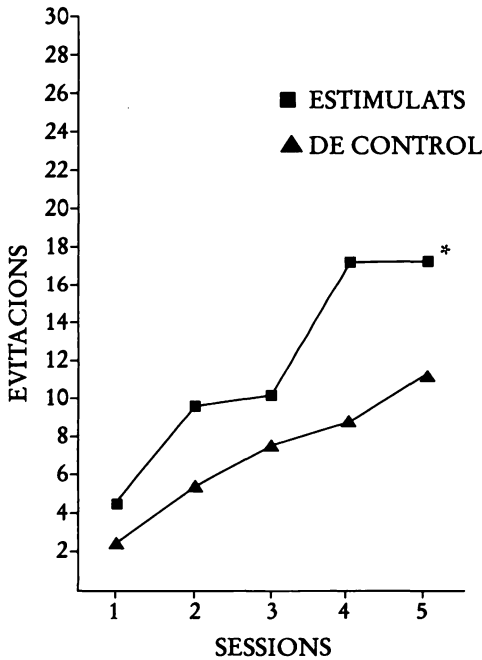
* $p < 0,05$, t-test

FIGURA 12. Nombre d'entrades efectuades als braços oberts del laberint elevat en creu en animals estimulats i no estimulats.

Finalment, estudiarem els efectes de l'estimulació postnatal en l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, tasca que (com s'ha comentat abans) representa un elevat grau de conflicte entre la tendència a l'evitació passiva i l'activa (ja que els animals han d'anar al compartiment on han rebut el xoc abans si volen evitar el proper). Es feren 5 sessions de 30 assaigs cadascuna. En aquesta situació, es tornà a constatar la superioritat del grup estimulat precoçment (figura 13), com indica el major nombre d'evitacions fetes al llarg de les 5 sessions. Així, d'un total de 150 assaigs, els animals estimulats van fer un nombre mitjà de 63,5 evitacions (que representa el 42,3 %), mentre que els no tractats solament arribaren a les 36,3 (24,2 %). A més a més, els efectes de l'estimulació postnatal eren ja detectables en els primers assaigs de l'adquisició, que són justament aquells que comporten un grau més elevat d'ansietat.

Tots aquests resultats indicaren que l'adaptació, en una etapa

molt primerenca del desenvolupament, a un estrès de mitjana intensitat (estimulació postnatal) produïa una reducció en la reactivitat emocional i una major capacitat per a enfrontar-se a les situacions estressants futures: situacions que impliquen novetat o conflicte (de difícil resolució per als animals), no solament en la infantesa, sinó de manera perdurable al llarg de tota la vida (Daly, 1973; Fernández-Teruel *et al.*, 1992; Meaney, 1988).



* S'observa una execució superior del grup estimulat ($p < 0,05$) al llarg de totes les sessions.

FIGURA 13. Nombre d'evitacions realitzades pels animals de control i estimulats al llarg de 5 sessions d'adquisició de l'evitació activa en dos sentits, de 30 assaigs cadascuna.

10.5.2. Efectes del tractament precoç combinat en proves d'aprenentatge i en la histologia hipocampal en rates romanes emotives

En un intent de veure si els efectes beneficiosos que havíem observat en el tractament d'estimulació postnatal, tant pel que fa a la

reducció de la reactivitat emocional com a la prevenció de dèficits cognitius i neurals associats a l'envelliment, podien ésser additius amb els de l'enriquiment ambiental, ens plantejarem estudiar l'efecte conjunt.

Una de les tasques triades per posar-ho a prova (atès el nostre interès per a estudiar si els dos tractaments sumaven els seus efectes positius en situacions de conflicte) fou l'adquisició d'evitació activa en dos sentits. Poguérem observar que els subjectes estimulats durant el període d'alletament i enriquits fins als 4 mesos d'edat (representats pels triangles en la figura 14), se'n sortien molt millor en el conflicte d'evitació activa en dos sentits. De fet, en la segona sessió d'aprenentatge, aquest grup de rates feu aproximadament 14 evitacions (cada sessió constava de 20 assaigs), mentre que el grup de control (representat pels punts negres en la figura 14) tot just aconseguí evitar 5 xocs, la qual cosa representa gairebé un 200 % de millora (Escorihuela *et al.*, 1994).

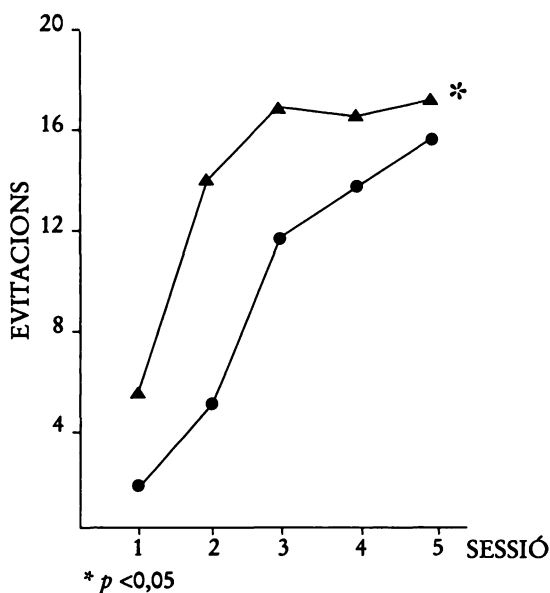


FIGURA 14. Nombre d'evitacions fetes per les rates de control (punts) i estimulades (triangles) en 5 sessions consecutives de 20 assaigs d'evitació activa en dos sentits (tret d'Escorihuela *et al.*, 1994a). Els animals estimulats presenten una execució superior al llarg de totes les sessions.

En una altra sèrie experimental ens interessà avaluar l'efecte dels 2 tractaments en el deteriorament de les capacitats cognitives en animals vells. Per fer-ho, emprarem el *Morris water test* i decidírem treballar amb uns animals particulars, la soca de rates *roman low avoidance* (RLA), seleccionada genèticament per una conducta relacionada amb l'emotivitat, com és la manca d'adquisició de l'evitació activa en dos sentits. Aquests animals són porucs i mostren una elevada reactivitat emocional en mesures conductuals i en paràmetres hormonals de reacció a l'estrès en un ampli ventall de situacions experimentals. Això els converteix en subjectes molt valuosos a l'hora d'estudiar la potència d'algunes manipulacions ambientals en la modulació de trets determinats genèticament.

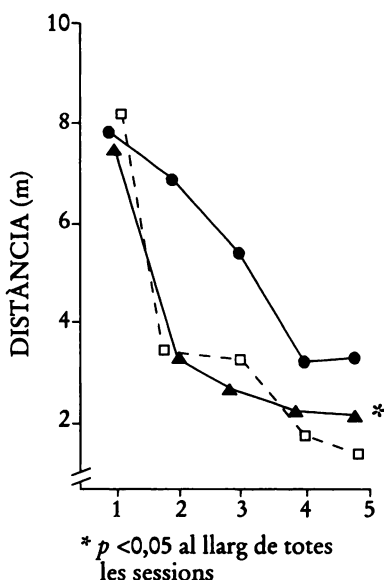


FIGURA 15. Distància recorreguda per rates joves de 5 mesos (quadrats), velles de 24 mesos (punts) i velles estimulades i enriquides (triangles) de la soca RLA/Verh fins a trobar la plataforma al *Morris water test*, durant 5 sessions consecutives de 4 assaigs cadascuna. S'observa com els animals estimulats i enriquits no es diferencien dels joves, i en canvi si són diferents dels velles de control.

Els resultats del treball indicaren que els animals senils de 24 mesos d'edat (les rates de laboratori viuen poc més de 2 anys, per regla general), que havien estat sotmesos a estimulació tàctil i cinèsica

i a un ambient enriquit, en edats primerenques, (representats pels triangles en la figura 15), s'orientaven amb la mateixa facilitat que les rates joves (representades pels quadrats) en aquella tasca aquàtica d'orientació especial (*Morris water test*). Així, els animals vells de control recorrien, al llarg de tot l'entrenament, distàncies més llargues fins a trobar la plataforma, mentre que en els animals vells estimulats, la distància era pràcticament la mateixa que en els joves.

El més interessant de tot plegat és que els estudis histològics preliminars indiquen que aquells tractaments d'estimulació i/o enriquiment primerencs, a més de mantenir les capacitats cognitives gairebé intactes en les rates velles, podrien haver retardat la mort de les cèl·lules cerebrals. Tant és així que, mentre en les preparacions de rates velles de control hi ha una evidència clara d'atrofia neuronal i de desorganització de les capes cel·lulars, les preparacions de les rates velles tractades mostren un aspecte molt semblant al dels animals joves: les capes neuronals de l'hipocamp estan perfectament estructurades, s'hi veuen poques neurones atrofiades i les que hi ha en funcionament, mostren citoplasmes ben arrodonits (González *et al.*, 1994).

Si totes aquestes troballes es confirmen, potser haurem trobat procediments per retardar els rellotges cel·lulars que posen en marxa els mecanismes implicats en la degeneració del teixit nerviós i, per tant, en l'envelliment. Aqueixa és, però, la feina que resta oberta.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- ADER, R. «Experimentally induced gastric lesions: Results and implications of studies in animals». *Advances in Psychosomatic Medicine*, 6 (1971), p. 1-39.
- BEATTY, W. «Preservation and loss of spatial memory in aged rats and humans: Implications for the analysis of memory dysfunction in dementia». *Neurobiology of Aging*, 9 (1988), p. 557-561.
- BODNOFF, S. R. [et al.]. «Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioral habituation to novelty». *Behavioral Neuroscience*, 103 (1989), p. 209-212.
- BOIX, F. [et al.]. «Two-way active avoidance as an animal model of anxiety: Negative correlation between plasma-corticosterone levels and avoidance performance». *Pharmacological Research*, 25 (1992), p. 5-6. [Suplement 2]

- CORDER, E. H. [et al.]. «Gene dose of apolipoprotein E type allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families». *Science*, 261 (1993), p. 921-923.
- CHOPIN, P.; BRILEY, M. «Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission». *TIPS*, 8 (1987), p. 383-388.
- DALY, M. «Early stimulation: a critical review of present interpretations». *British Journal of Psychology*, 64 (1973), p. 435-460.
- DE KLOET, E. R.; REUL, J. M. H. M. «Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems». *Psychoneuroendocrinology*, 12 (1987), p. 83-105.
- DENENBERG, V. H.; WOODCOCK, J. M.; ROSENZWEIG, M. R. «Long-term effects of preweaning and postweaning free-environment experience on rats problem-solving behavior». *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66 (1968), p. 533-535.
- ESCORIHUELA, R. M.; TOBEÑA, A.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. «Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats». *Behavioural Brain Research*, 61 (1994 a), p. 169-173.
- ESCORIHUELA, R. M.; TOBEÑA, A.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. *L'estimulació infantil*. Bellaterra: Servei de Publicacions de la UAB. 1994b.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A. [et al.]. «The early acquisition of two-way (shuttlebox) avoidance as an anxiety-mediated behavior: Psychopharmacological validation». *Brain Research Bulletin*, 26 (1991), p. 173-176.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A. [et al.]. «Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles». *Neuroscience Letters*, 137 (1992), p. 185-188.
- FIELD, T. F. «Interventions for premature infants». *Journal of Pediatrics*, 109 (1986), p. 183-191.
- GONZÁLEZ, B. [et al.]. «Enrichment and early handling protect against age-related deficits. A behavioral and histological study in RHA/Verh and RLA/Verh rats». A: INSTITUTO JUAN MARCH DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES. *Deterioration, stability and regeneration of the brain during normal aging*.

- Madrid: Edición Peninsular, 1994. (Serie Universitaria) [En premsa]
- KATZMAN, R. «Alzheimer's Disease». *New England Journal of Medicine*, 314 (1986), p. 964-973.
- KERR, D. S. [et al.]. «Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging». *The Journal of Neuroscience*, 11 (1991), p. 1316-1324.
- KRAMER, L. I.; PIERPONT, M. E. «Rocking waterbeds and auditory stimulation to enhance growth of pretern infants». *Journal of Pediatrics*, 88 (1976), p. 297-299.
- LEVINE, S. [et al.]. «Physiological and behavioral effects of infantile stimulation». *Physiology and Behavior*, 2 (1967), p. 55-59.
- MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H.; SAPOLSKY, R. «Thyroid hormones influence the development of hippocampal glucocorticoid receptors in the rat: A mechanism for the effects of postnatal handling on the development of the adrenocortical stress response». *Neuroendocrinology*, 45 (1987), p. 278-283.
- MEANEY, M. J. [et al.]. «Effects of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus». *Science*, 239 (1988), p. 766-768.
- MEANEY, M. J. [et al.]. «Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat». *Neuroendocrinology*, 50 (1989), p. 597-604.
- MEANEY, M. J. [et al.]. «Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats». *Neurobiology of Aging*, 12 (1991), p. 31-38.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. *The hippocampus as a cognitive map*. Londres: Oxford University Press, 1978.
- OLSHANSKY, S. J.; CARNES, B. A.; CASSEL, C. «In search of Methuselah: Estimating the upper limits to human longevity». *Science*, 250 (1990), p. 634-640.
- PELLOW, S. [et al.]. «Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat». *Journal of Neuroscience Methods*, 14 (1985), p. 149-167.
- PELLOW, S.; FILE, S. «Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat». *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24 (1986), p. 525.

- PIEL, J. «Medicine: A powerful healing technology seeks institutions and regulations that bring it to those who need it». *Scientific American*, Special Issue Medicine (1993), p. 4-10.
- RAPP, P. R.; ROSENBERG, R. A.; GALLAGER, M. «An evaluation of spatial information processing in aged rats». *Behavioral Neuroscience*, 101 (1987), p. 3-12.
- RAWLINS, J. N. P.; DEACON, R. M. J. «Further developments on maze procedures». A: SAHGAL, A. [ed.]. *Behavioural Neuroscience: A practical approach*. Nova York: Oxford University Press, 1993, p. 95-106.
- RENNER, M. J.; ROSENZWEIG, M. R. *Enriched and impoverished environments: Effects on brain and behavior*. Nova York: Springer-Verlag, 1987.
- ROSENZWEIG, M. R. [et al.]. «Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension». *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55 (1962), p. 429-437.
- SAPOLSKY, R. «Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels». *Journal of Neuroscience*, 6 (1986), p. 2240-2247.
- SAPOLSKY, R. [et al.]. «Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates». *Journal of Neuroscience*, 10 (1990), p. 2897-2902.
- SAPOLSKY, R. *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*. Massachussets: The Mit Press, 1992.
- SAPOLSKY, R. «Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus». *Behavioural Brain Reserarch*, 57 (1993), p. 175-182.
- SARRIEU, A.; SHARMA, S.; MEANEY, M. J. «Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors». *Developmental Brain Research*, 43 (1988), p. 158-162.
- SCARR-SALAPATCK, S.; WILLIAMS, M. L. «The effects of early stimulation on low birthweight infants». *Child Development*, 33 (1973), p. 94-101.
- SELKOE, D. J. «Amyloid protein and Alzheimer disease». *Scientific American*, (1993), p. 54-61.
- SHEPHARD, R. A.; BROADHURST, P. L. «Effects of diazepam and of serotonin agonists on hyponeophagia in rats». *Neuropharmacology*, 21 (1982), p. 337-340.

- SOLKOFF, N. [et al.]. «Effects of handling on the subsequent development of premature infants». *Developmental Psychology*, 1 (1969), p. 765-768.
- SOUBRIE, P. [et al.]. «Effects des anxiolytiques sur la prise de nourriture de rats et de souris placés en situation nouvelle ou familière». *Psychopharmacologia*, 45 (1975), p. 203-210.
- STEWART, C. A.; MORRIS, R. G. M. «The watermaze». A: SAHGAL, A. [ed.]. *Behavioural Neuroscience: A practical approach*. Vol. I. Nova York: Oxford University Press, 1993, p. 107-121.
- URSIN, H.; BAADE, A.; LEVINE, S. *Psychobiology of stress: A study of coping men*. Londres: Academic Press, 1978.
- WOLF, S.; WOLFF, H. G. *Human gastric function: An experimental study of a man and his stomach*. Oxford: Nova York, 1947.