

TESIS DOCTORAL
2016

Neuronal and behavioural effects of
social isolation in old age

M^a Inmaculada Pereda-Pérez

Licenciada en Ciencias Biológicas



Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Director: Dr. César Venero Núñez
Codirectora: Dra. Azucena Valencia Jiménez

TESIS DOCTORAL
2016

Neuronal and behavioural effects of
social isolation in old age

M^a Inmaculada Pereda-Pérez

Licenciada en Ciencias Biológicas



Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Director: Dr. César Venero Núñez
Codirectora: Dra. Azucena Valencia Jiménez

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mis agradecimientos a mi director de tesis, el profesor César Venero, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio. Por su dirección y por tantos años de crecimiento.

A mi codirectora, la profesora Azucena Valencia de quien he aprendido tanto académica, profesional y personalmente. Por su apoyo incondicional. Por tantas cosas que me resulta difícil expresar con palabras.

Al profesor Ángel Núñez, por su amabilidad y su buen hacer; por acogerme en su laboratorio y enseñarme. Al profesor José Antonio Esteban y su grupo, por hacerme siempre hueco en sus actividades, por hacerme sentir una más en su laboratorio.

A los profesores Almeida Osborne y Nuno Sousa por brindarme una gran oportunidad en sus laboratorios de Alemania y Portugal, una excelente estancia que espero recordar siempre. Al Dr. Raúl Delgado por contribuir a ese buen recuerdo.

Al profesor José María Calés, porque en las pequeñas grandes cosas me apoyaste y me hiciste sentir parte de un equipo. Al ED de Neuropsicología del desarrollo por su apoyo, la amabilidad y la deferencia que han tenido conmigo.

A la profesora Beatriz Carrillo por ser una gran compañera, por su constante interés.

A todos mis compañeros de grupo, desde el primero que llegó hasta el último, porque todos ellos han contribuido gratamente en este proyecto. A Heriberto, por el estupendo trabajo que realizó y por su implicación. A Cris, compañera y amiga, con la que empecé y con la que terminé, por su trabajo incansable. A dos grandes compañeros que se convirtieron en amigos y se quedaron, Ancor y Natalia, gracias por vuestro apoyo siempre.

A Raquel, por las charlas enriquecedoras, los descansos y hacerme ver el otro lado de las cosas. Por ser un ejemplo de trabajo. A mis compañeros de despacho y de laboratorio; Daniela gracias por tus buenos consejos. Marcos, gracias por mantenerme actualizada en la informática.

A Luis Troca, Ana, Gonzalo, Luis Carrillo, Rosa y Alberto, por su buen hacer, buen humor y su trabajo. Por hacerme más fácil el día a día.

A mis amigos del colegio, de la carrera, del máster (Poleo's club), en especial a mis grandes compañeras y amigas del CNB de las que siempre tendré muy buenos recuerdos y con las que me inicié.

A mi padre y a mi madre, trabajadores incansables. Sin ellos esto no habría sido posible.

A mi hermana, mi apoyo, mi mejor amiga.

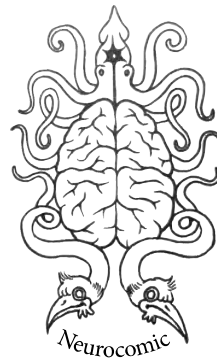
Gracias a todos.

Inma.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resumen | 7 |
| Clave de Abreviaturas | 11 |
| Introducción | 13 |
| 1. El estrés | 15 |
| 1.1. El concepto de estrés | 15 |
| 1.2. La respuesta fisiológica de estrés | 16 |
| 1.3. El estrés y el control del ciclo circadiano | 22 |
| 1.4. Estrés y metabolismo | 24 |
| 1.5. Efectos del estrés en la plasticidad sináptica y la LTP | 25 |
| 1.6. Aprendizaje y glucocorticoides | 29 |
| 2. Efectos del estrés crónico | 31 |
| 2.1. El aislamiento social | 32 |
| 3. El envejecimiento | 37 |
| 3.1. Envejecimiento y aislamiento social | 40 |
| 4. Hipocampo y Amígdala: implicación funcional en la memoria y el aprendizaje | 41 |
| 4.1. El hipocampo | 41 |
| 4.2. La amígdala | 44 |
| 5. Factor de crecimiento de fibroblasto y moléculas de adhesión celular | 46 |
| 5.1. El Sistema del FGF: Posible implicación en neuroprotección y su importancia en los efectos o consecuencias del estrés | 46 |
| 5.2. Moléculas de adhesión celular | 47 |
| Hipótesis y Objetivos | 51 |
| Materiales y Métodos | 57 |
| Capítulo 1. <i>Octodón degus</i> | 59 |
| Capítulo 2. Ratas Wistar | 63 |
| Resultados | 75 |
| Capítulo 1. Aislamiento social crónico en hembras de <i>Octodón degus</i> adultas | 77 |
| Capítulo 2. Aislamiento a corto y largo plazo en ratas Wistar macho envejecidas | 85 |

| | |
|---|------------|
| Estudio 1. Efectos del aislamiento a corto plazo en el ritmo circadiano, el tono simpático, el comportamiento tipo ansioso y tipo depresivo de ratas Wistar macho envejecidas | 87 |
| Estudio 2. Cambios en el comportamiento, en la morfología y en la electrofisiología después del aislamiento social crónico en ratas macho Wistar envejecidas | 103 |
| Estudio 3. El tratamiento crónico con FGL revierte el deterioro en la memoria espacial inducido por el aislamiento a largo plazo | 120 |
| Discusión | 127 |
| Capítulo 1. El aislamiento social crónico en hembras de <i>Octodon degus</i> | 129 |
| Capítulo 2. El aislamiento social a corto y largo plazo en ratas macho Wistar | 133 |
| Conclusiones | 149 |
| Bibliografía | 153 |



Resumen

El aislamiento social en los seres humanos se caracteriza por una menor calidad social que se ve agravada aún más después de la jubilación, disminución en el número de relaciones por la pérdida de amigos cercanos o incluso la viudedad. Por lo tanto, el aislamiento social es particularmente frecuente en las personas de edad avanzada y un problema creciente en los países con una esperanza de vida media más larga. En la actualidad, existe evidencia epidemiológica que indica que el aislamiento social es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades tales como trastornos cardiovasculares, depresión, deterioro cognitivo e incluso aumento de la mortalidad. Mientras que muchos estudios en animales se han investigado los efectos del aislamiento social en el comportamiento durante el periodo pre-destete, sólo en unos pocos estudios se han investigado las consecuencias conductuales y cognitivas del aislamiento social en la edad adulta o en la vejez. La principal hipótesis de este trabajo es que el aislamiento social puede considerarse como una situación estresante que, cuando se produce a finales de la edad adulta o en la vejez, induce cambios en ciertos procesos fisiológicos y neurobiológicos que afectan al comportamiento y exacerban el deterioro cognitivo relacionado con la edad.

En la primera parte de este estudio hemos utilizado hembras adultas de *Octodon degus* para investigar los efectos del aislamiento social a largo plazo sobre la memoria del miedo condicionado al contexto, y la posible modulación de los niveles sinápticos de NCAM y PSA-NCAM en el hipocampo. Después de 6 ½ meses de aislamiento social, las hembras *degus* adultas mostraron una memoria normal del miedo condicionado al tono, pero un déficit en la memoria del miedo contextual, una tarea dependiente del hipocampo. Posteriormente, se observó una reducción de los niveles sinápticos de PSA-NCAM en el hipocampo de las *degus* aisladas en comparación con las agrupadas. Curiosamente, el aislamiento social redujo además el volumen de la subregión de CA1 del hipocampo, sin afectar al volumen de la subregión CA3 del hipocampo o la totalidad de esta región. Por otra parte, se detectó una disminución en el aumento de peso corporal así como una reducción del número de granulocitos en los animales aislados. Nuestros hallazgos indican, por primera vez, que el aislamiento social a largo plazo de las hembras adultas induce la contracción específica de la subregión de CA1 y una disminución en los niveles sinápticos de PSA-NCAM en el hipocampo. Estos efectos pueden estar relacionados con el déficit de la memoria del miedo contextual observada en las hembras *degus* aisladas.

Nuestros estudios con ratas Wistar machos, llevados a cabo en la segunda parte del estudio, indican que el aislamiento social durante el envejecimiento altera progresivamente la actividad simpática, y aumenta la ansiedad y el comportamiento tipo depresivo. Además, las ratas aisladas a largo plazo muestran niveles elevados de corticosterona plasmática y cambios morfológicos, bioquímicos y electrofisiológicos en el hipocampo que pueden conducir a la alteración de la memoria espacial observada en estos animales. Tras el aislamiento social a largo plazo, la administración sistémica de un péptido sintético que imita algunas de las acciones de la molécula de adhesión celular neuronal fue capaz de revertir el deterioro de la memoria espacial inducida por el aislamiento, lo que indica que este tratamiento farmacológico puede ser de relevancia terapéutica.

Abstract

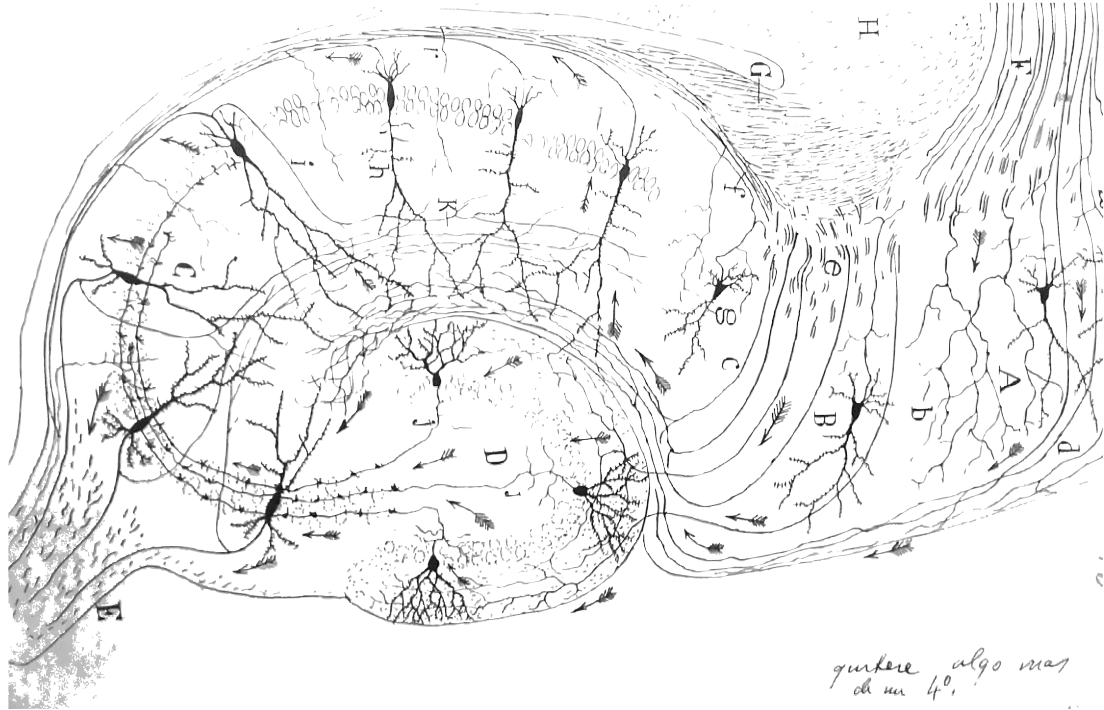
Social isolation in humans is marked by fewer quality social relationships and is aggravated after retirement, widowhood and the loss of close friends. Thus, social isolation is particularly prevalent in elderly people and is becoming an increasing problem in countries with a longer average lifespan. At present, there is epidemiological evidence indicating that social isolation is a risk factor for the development of various diseases such as cardiovascular disorders, depression, cognitive decline and even increased mortality. While many animal studies have investigated the effects of social isolation during the pre-weaning and juvenile period on behavior, only a few studies have investigated the behavioural and cognitive consequences of social isolation in adulthood or in old age. The main hypothesis of this work is that social isolation can be considered a stressful situation that, when occurs at late adulthood or in old age, induces changes in certain physiological and neurobiological processes affecting behavior and exacerbating age-related cognitive decline.

In the first part of this study we used adult female *Octodon degus* to investigate the effects of long-term social isolation on contextual and cued fear conditioning, and the possible modulation of the synaptic levels of NCAM and PSA-NCAM in the hippocampus. After 6½ months of social isolation, adult female degus showed a normal auditory-cued fear memory, but a deficit in contextual fear memory, a hippocampal dependent task. Subsequently, we observed reduced hippocampal synaptic levels of PSA-NCAM in isolated compared to grouped-housed female degus. Interestingly, social isolation reduced the volume of the hippocampal CA1 subfield, without affecting the volume of the CA3 subregion or the total hippocampus. Moreover, attenuated body weight gain and reduced number of granulocytes were detected in isolated animals. Our findings indicate for the first time, that long-term social isolation of adult female animals induces a specific shrinkage of CA1 and a decrease in synaptic levels of PSA-NCAM in the hippocampus. These effects may be related to the deficit in contextual fear memory observed in isolated female *degus*.

Our studies with male Wistar rats, carried out in the second part of the study, indicate that social isolation at aging progressively alters sympathetic activity, and increases anxiety and depressive-like behaviour. In addition, long-term isolated rats showed elevated plasmatic corticosterone levels and displayed morphological, electrophysiological and biochemical changes in the hippocampus that may lead to the spatial memory impairment observed in these animals. After long term social isolation, systemic administration of a synthetic peptide that mimics some neural cell adhesion activities was able to revert isolation-induced spatial memory impairment, indicating that this pharmacological treatment may be of therapeutic relevance.

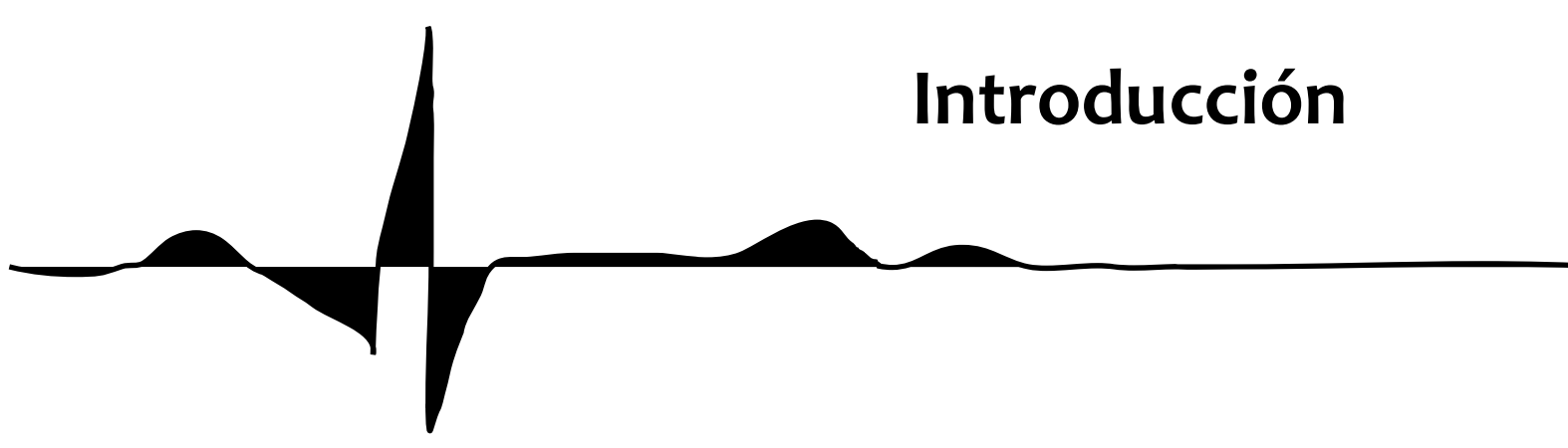
Clave de Abreviaturas

- AB:** amígdala basal
ACTH: hormona adrenocorticotrópica
AL: amígdala lateral, LA del inglés
AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazolpropiónico
BLA: complejo basolateral de la amígdala, BLA del inglés
BMA: amígdala basomedial, BMA del inglés
BDNF: del inglés factor neurotrófico derivado del cerebro
CA: *Cornu Ammonis*
CE: corteza entorrinal
CeA: núcleo central de la amígdala (CeA)
CeL: núcleo central lateral de la amígdala
CeM: núcleo central medial de la amígdala
CPF: corteza prefrontal
CRH: hormona liberadora de corticotropina
DG: giro dentado, DG del inglés
FGFR: receptor para el FGF
FGF: factor de crecimiento de fibroblasto, FGF del inglés
GCs: glucocorticoides
GR: receptor glucocorticoide
HFS: hormona folículo-estimulante, FSH del inglés
HHS: eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal
HP: hipocampo
Ig: inmunoglobulinas
LH: hormona luteinizante
LTD: depresión a largo plazo, LTD del inglés
LTP: potenciación a largo plazo, LTP del inglés
DM: trastorno de depresión mayor, MDD del inglés
MR: receptor para los mineralocorticoides
NCAM: molécula de adhesión celular neural
NMDA: N-metil-D-aspartato
NSQ: núcleo supraquiasmático
NT-3: Neurotrofina-3
NTS: núcleo del tracto solitario
PSA: ácido polisiálico, PSA del inglés
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
SMA: sistema nervioso simpático médulo-adrenal
SNA: sistema nervioso autónomo
SNE: sistema nervioso entérico
SNP: sistema nervioso parasimpático
SNS: sistema nervioso simpático
TSH: hormona estimulante de la tiroides



Cajal, 1901

Introducción



1. El estrés

1.1. El concepto de estrés

A finales de la década de los treinta, Hans Selye demostró el papel crítico que desempeña el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS) para la vida y los potentes efectos que tiene este eje en la respuesta al estrés. Desde ese momento las investigaciones se centraron en el eje HHS, lográndose avanzar en el conocimiento sobre las hormonas catabólicas llamadas glucocorticoides (GCs), y son el último sustrato en la respuesta neuroendocrina del estrés -activado por el eje HHS- que ejercen un espectro muy amplio. Se consiguió demostrar que tienen un espectro muy amplio de acción en los tejidos de los vertebrados.

El concepto de estrés se ha ido perfilando en su definición y ha sido de gran debate científico por parte de diferentes investigadores importantes. En este campo, destacamos desde el autor anteriormente mencionado y primer ejecutor del término procedente de la física, hasta los autores más recientes como Levine, McEwen o Koolhaas.

En 1936 Selye utilizó por primera vez el término estrés en la investigación fisiológica y biomédica y lo definió como la respuesta no específica del cuerpo a cualquier estímulo nocivo. Posteriormente concretó y diferenció entre “estrés” y “respuesta al estrés”. La *respuesta de estrés* es entendida como la reacción del organismo destinado a recuperar la homeostasis del individuo (Chrousos, 2009) y es desencadenada tras un *estímulo estresante* causante de poner en peligro su equilibrio homeostático.

El término homeostasis fue acuñado originalmente por Walter B. Cannon en 1932 para definir la tendencia de un organismo a mantener en equilibrio su estado interno, un medio que se basa en el concepto “*Milieu Intérieur*” descrito previamente por el autor Claude Bernard a mediados del siglo XIX. Cannon demostró que muchas variables fisiológicas como la presión arterial, la glucosa en sangre y/o la osmolaridad tienen un cierto nivel de referencia, y que una desviación de este punto de ajuste es contrarrestado por respuestas fisiológicas que restablecen los niveles fisiológicos adecuados. Varios autores se han apoyado en este concepto para hacer hincapié en la ambigüedad de la definición de estrés en términos de una amenaza para la homeostasis en general (Day, 2005; Levine, 2005; McEwen, 1998; Ursin, 1991).

Aparte de estos problemas de definición, Selye (1936, 1950) destacó el carácter adaptativo de la respuesta de estrés al describir el *Síndrome General de Adaptación* (SGA) en el que se distinguen tres fases; alarma, resistencia y agotamiento, pudiendo ocurrir que el individuo sin llegar a la etapa de agotamiento pueda entrar en la fase de adaptación al estrés. Esta definición contrastaría con diferentes autores que diferencian el concepto de adaptación y de inadaptación en la res-

puesta de estrés (Dallman, 2007; de Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005; Korte, Koolhaas, Wingfield, & McEwen, 2005; McEwen & Wingfield, 2003), debido a que resulta ser muy difícil disociar estos dos tipos de respuesta.

En general, la naturaleza de los estímulos estresantes se pueden dividir en cuatro categorías: **1)** Estresores físicos (frío, calor, ruido, radiación intensa, etc.), que dependiendo de la situación pueden resultar negativos para el organismo. **2)** Psíquicos, que pueden ser el resultado de una respuesta aprendida ante una condición adversa previa (por ejemplo, un estrés agudo previo). **3)** Estrés social, en el que se reflejan las interacciones que hay entre individuos (por ejemplo, en el caso de los animales, un animal dominante y la lucha por el territorio; en el caso de humanos, estar en una situación de desempleo, sufrir una separación matrimonial, etc.). **4)** Estresores que cambian la homeostasis cardiovascular y el metabolismo (por ejemplo, ejercicio, hipoglucemia, hemorragias, etc.) (Pacák & Palkovits, 2001). Por tanto, según lo indicado anteriormente, hay que destacar además que el estrés integra tres componentes: el psíquico, el social (del que nos centraremos en este trabajo) y el biológico, y es a raíz de esto cuando el concepto se entendería como una magnitud bio-psico-social.

La falta de recursos del individuo para controlar las demandas sociales y psicológicas pueden dar lugar al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, asma, úlceras, pérdidas de peso, depresión, así como otros problemas de salud (Mechanic, 1976; Siegrist, Siegrist, & Weber, 1986; Turner & Lloyd, 1995). Por ello, los trabajos centrados en la interpretación del estrés siguen una línea razonada a partir del estudio del eje HHS y del sistema nervioso simpático médulo-adrenal (SMA) que desempeñan una función crítica en la respuesta de estrés.

En resumen, actualmente podríamos entender el estrés como una condición en la que *las expectativas, ya sea genéticamente programadas, establecidas por el aprendizaje previo o por las circunstancias, no coinciden con la percepción actual o con lo esperado del ambiente interno o externo. Esta discrepancia entre lo que se observa o lo que se percibe y lo que se espera, provoca un modelado de las respuestas compensatorias* (Goldstein, 1995). Por tanto, el estrés debe ser considerado como una percepción cognitiva de la falta de control y/o imprevisibilidad donde la previsibilidad y capacidad de control están en juego. La imprevisibilidad se caracteriza por la ausencia de una respuesta anticipada y pérdida de control reflejada por un retraso en la recuperación de la respuesta y la presencia de un perfil típico neuroendocrino (Koolhaas et al., 2011).

1.2. La respuesta fisiológica de estrés

En la respuesta al estrés, dependiendo tanto de la naturaleza del estresor, como de características tales como la *intensidad, duración y frecuencia* podemos distinguir dos fases diferentes en la respuesta fisiológica: la primera fase se correspondería a una respuesta rápida y, dependiendo de las características del estresor anteriormente mencionadas, podríamos hablar de una segunda

respuesta más retardada, en la que se producen cambios a corto o largo plazo en una serie de sistemas (cardiovascular, inmune, endocrino, etc.) dirigidos a afrontar con éxito las demandas externas.

La primera fase es definida como *reacción de alarma* o respuesta de *lucha-huida*, la cual provoca una activación del sistema nervioso autónomo. Este sistema lo abordaremos con mayor detenimiento en el siguiente apartado.

La reacción de alarma está relacionada con la adrenalina y noradrenalina que, una vez secretadas desde la médula suprarrenal al torrente sanguíneo, favorecen rápidamente el aumento del metabolismo basal, la presión sanguínea y la respiración, así como el incremento del flujo sanguíneo a los órganos vitales tales como el corazón, los pulmones o el músculo esquelético. De esta forma, se favorecería la respuesta de huida en una primera etapa.

En una fase posterior se activa el eje HHS. En este circuito neuroendocrino, los sistemas límbico e hipotalámico coordinan la respuesta cognitiva, emocional, neuroendocrina y las respuestas del sistema nervioso autónomo, los cuales, en coordinación, determinan la magnitud y la respuesta comportamental individual, neural y hormonal de estrés (Lucassen et al., 2014).

1.2.1. El estrés. Sistema nervioso autónomo y corazón

Ernst Heinrich Weber, miembro de una numerosa familia de investigadores, dedicó su vida al estudio de la *psicofísica*. Este autor, nacido en 1795 fue uno de los primeros científicos en percibir que el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) (referido hoy en día como un sistema que regula el músculo liso, el músculo cardíaco y las glándulas) estaba constituido por tres sistemas nerviosos diferentes. Hoy en día estos sistemas son conocidos como el Sistema Nervioso Simpático (SNS), el Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) y el Sistema Nervioso Entérico (SNE).

A nivel central, el hipotálamo es la estructura más relevante en la regulación del SNA. Esta estructura integra la información sensorial y visceral que recibe de zonas cerebrales tales como la corteza cerebral, la corteza entorrinal (CE), el hipocampo (HP), la amígdala, algunos núcleos talámicos, los ganglios basales y el cerebelo y, por otra parte, ante una situación de estrés activa la respuesta simpática directamente a partir del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) o a través del núcleo del tracto solitario (NTS).

Además, la activación del hipotálamo va a desencadenar una serie de sucesos que provoquen la liberación de noradrenalina, haciendo que tenga efecto sobre sus órganos diana. Entre otros, en el corazón tendrán como resultado un aumento en la fuerza de contracción y en la tasa

cardíaca, mientras que en el hígado provocarán glucogenolisis, produciendo cambios metabólicos en el organismo en general, tendientes en última instancia a la liberación de energía.

Por tanto, un buen ejemplo de la medida del control del sistema nervioso autónomo podemos estudiarlo en el corazón. En este caso, la regulación de la variabilidad de la tasa cardíaca o HRV, descubierto por Sayers y su equipo (Hyndman, Kitney, & Sayers, 1971; Sayers, 1973), es llevada a cabo tanto por la activación simpática, como la activación parasimpática (equilibrio simpático-vagal). La estrecha relación que guarda la activación simpática, encargada de la preparación de un organismo ante una situación de estrés frente a la activación parasimpática, que predomina en las funciones fisiológicas normales en ausencia de estrés, nos puede aportar información sobre el estado fisiológico de un organismo al que se le ha sometido a un periodo de estrés crónico.

Tanto la activación simpática como la parasimpática son tónicamente activas, y generalmente actúan oponiéndose la una a la otra. Es importante indicar que la frecuencia en las respuestas de ambas ramas del SNA es diferente debido a la bioquímica de los neurotransmisores implicados. Por ejemplo, los efectos parasimpáticos (vagales) al corazón actúan rápidamente para disminuir la tasa cardíaca por un corto periodo de tiempo y, por el contrario, la activación simpática del corazón tiene una latencia más lenta, pero con una mayor duración relativa. El tiempo de latencia superior se debe al segundo mensajero utilizado por el sistema de receptores adrenérgicos. En este caso, la noradrenalina, con una mayor vida media, tiene un catabolismo que se basa en la recaptación por el terminal presináptico, o su incorporación al flujo sanguíneo. Sin embargo, la acetilcolina (sistema vagal) se hidroliza enzimáticamente en la sinapsis. Esto explicaría las diferencias en el tiempo de acción (Altimiras, 1999; Thayer & Lane, 2009). Por tanto, y de acuerdo con los diferentes comportamientos del organismo, se produciría un incremento de noradrenalina cuando predomina la activación simpática y un decremento de ésta cuando predomina la activación vagal (Costoli et al., 2004). Más concretamente, ante situaciones de afrontamiento, tanto físico como psicológico, se produciría la activación del SNS lo que facilitaría desarrollar acciones de supervivencia. Sin embargo, una activación excesiva o continua de este sistema puede representar un factor de riesgo mayor para la aparición de enfermedades cardiovasculares o de otro tipo (Kleiger, Miller, Bigger, & Moss, 1987; Malik, Farrell, Cripps, & Camm, 1989; Montano et al., 2009). En estos casos la causa que lo provoca es un incremento de la influencia simpática (menores frecuencias de variación), con un correspondiente descenso en la variabilidad (Carney et al., 1995).

Los cambios de la HRV pueden ser debidos a distintas circunstancias: **(a)** Cambios relativos a la edad: la tasa cardíaca tiende a disminuir con la edad debido a cambios estructurales y hemodinámicos; **(b)** Cambios estacionales: hibernación. La variabilidad se debería a cambios de temperatura y hormonales; **(c)** Ritmos circadianos; **(d)** Ritmos ultradianos, de 1 a 3 horas, debidos a cambios hormonales y centrales; **(e)** Cambios de minutos, debidos a variaciones en el sistema adrenalina-noradrenalina y/o niveles de angiotensina circulantes en sangre; **(f)** Cambios en el intervalo entre latidos, son mediados por el SNA, debidos a la actividad de los mecanismos reflejos involucrados en el control cardiovascular (Altimiras, 1999).

En resumen a todo lo anterior, y dado que las respuestas comportamentales de estrés están acompañadas de cambios en la actividad del SNA, la HRV supone una medida indirecta que mide la activación del SNA traducido como cambios en la tasa cardíaca, en la tensión arterial, en la temperatura corporal y en la motilidad gástrica. Un ejemplo de esto lo vemos en experimentos con ratas realizados en 1998 por Nijsen y colaboradores. La exposición a un estresor en estos animales produjo respuestas de taquicardia y aumento de catecolaminas circulantes, resultados que se correlacionaban con un incremento de la actividad del SNS. Sin embargo, no encontraron una relación lineal entre intensidad del estresor y cambios en la tasa cardíaca (Nijsen et al., 1998).

1.2.2. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal

Con los estudios de Ernest H. Starling (1905) se denominaron por primera vez a los mensajeros químicos con el nombre de hormonas. Este término, que deriva del verbo griego ὀρμαω (*poner en movimiento, estimular*), será un concepto clave que trataremos en este apartado.

Hacia la década de 1930 se caracterizaron ya varias hormonas, entre ellas esteroides y proteínas, y se reconoció el papel integrador de la hipófisis anterior o adenohipófisis como la estructura cerebral directora de la orquesta endocrina. Sin embargo, no fue hasta más adelante cuando se identificó que el cerebro y el hipotálamo en particular eran los centros de control de las respuestas neuroendocrinas.

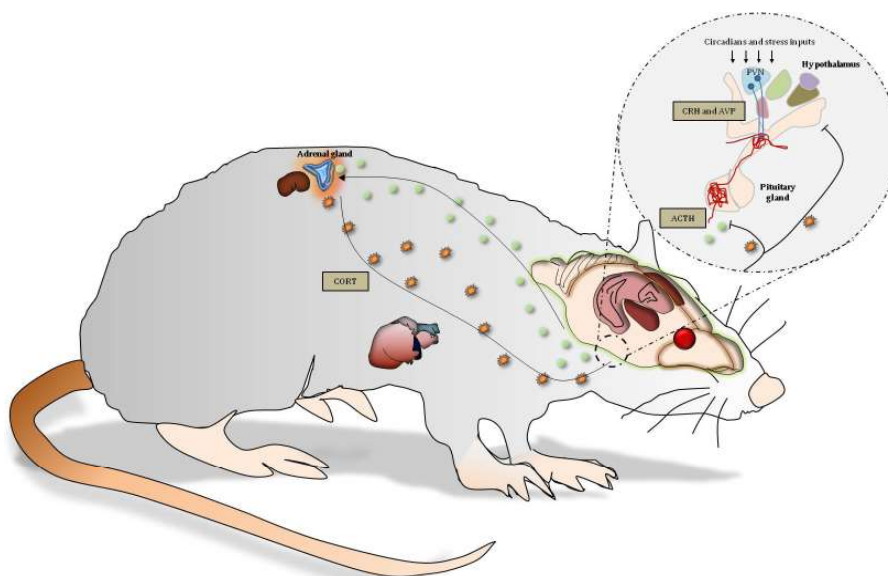


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal

Las neuronas del PVN del hipotálamo sintetizan las hormonas liberadoras de corticotropina (CRH) y son las primeras responsables en la secreción de la “hormona del estrés”; cortisol en humanos, y corticosterona en la mayoría de los roedores. A través de una serie de capilares sanguíneos en la eminencia media, el CRH llega hasta la adenohipófisis estimulando a las células corticotrópicas que, a su vez, liberan la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (**Figura 1**). Paralelamente, las células magnocelulares del hipotálamo liberan en la neurohipófisis otras hormonas, como la oxitocina y la vasopresina.

A través de la circulación sanguínea la ACTH llega a la corteza suprarrenal, y estimula la liberación de los GCs que han sido sintetizados en la capa fascicular de la corteza suprarrenal a partir del colesterol. Así pues, los GCs son el producto final de la activación del eje HHS (**Figura 1**). Una vez liberados al torrente sanguíneo, los GCs tienen efectos directos sobre el cerebro y el resto del organismo.

Cuando los niveles de GCs son elevados debido a una sobre-activación del eje HHS, los GCs también participan en la regulación de sus niveles por mecanismos de retroalimentación negativa (Rich & Romero, 2005). Esto es debido a que los GCs actúan directamente sobre la adenohipófisis y el PVN; o indirectamente, tienen influencia sobre otras estructuras cerebrales como el HP, la amígdala o, el sistema noradrenérgico, modulando de esta manera la actividad del hipotálamo (Jankord & Herman, 2008).

Cabe destacar que otras vías de señalización actúan en concierto con el eje HHS regulando de esta forma los recursos energéticos. Cuando se trata de enfrentarse a un desafío estresante, el organismo centrará la atención en aquellas funciones de mayor importancia, dejando al margen aquellos con menor prioridad como por ejemplo, la ingesta de alimentos, la digestión o la reproducción, que quedan suprimidas temporalmente (Joëls, Sarabdjitsingh, & Karst, 2012). Entre estas vías de señalización paralelas se encuentran el eje Hipotálamo-Adiposo-Gonadal y el sistema inmunológico (más información en: Cruces, Venero, Pereda-Pérez, & De la Fuente, 2014)

1.2.2.1. Acciones de los glucocorticoides

Los GCs se caracterizaron aproximadamente en los años 30 del siglo pasado y años más tarde se consiguió determinar cuál era su modo de actuación.

Los niveles plasmáticos basales de GCs están determinados por variaciones circadianas (Butte, Kakihana, & Noble, 1976; Liston et al., 2013; Qian, Droste, Lightman, Reul, & Linthorst, 2012). Estas variaciones dependerán del periodo de actividad e inactividad del organismo o, lo que es lo mismo, de su ciclo circadiano. De esta manera, en humanos, durante las horas correspondientes a la menor actividad (periodo de somnolencia) se observan los niveles plasmáticos más bajos de cortisol y, durante la mañana y el periodo diurno, las concentraciones más altas. De manera similar,

encontramos que en la mayoría de los roedores, que son nocturnos, las mayores concentraciones plasmáticas de corticosterona se obtienen durante sus periodos de vigilia, en la noche, mientras que durante el periodo de luz, correspondiente a su fase de somnolencia, las concentraciones de estas hormonas son menores (Butte et al., 1976). La falta de esta ritmicidad en el ciclo de los GCs provocaría desajustes fisiológicos en el organismo, destacando, entre otros, la pérdida del ciclo circadiano (Boyar, Witkin, Carruth, & Ramsey, 1979). Cabe señalar que la variación circadiana de cortisol también interactúa con otras oscilaciones biológicas importantes tales como la temperatura del cuerpo (Bailey & Heitkemper, 2001).

Los GCs tienen capacidad de actuación en el sistema nervioso central y en la mayoría de los órganos periféricos mediante receptores específicos que se encuentran en estos órganos. Estos receptores se caracterizan por la diferente afinidad a los GCs, así como por su distribución, y se dividen en dos clases: 1) El receptor mineralocorticoide (MR) o tipo I; y 2) el receptor glucocorticoide (GR) (Russell, Kalafatakis, & Lightman, 2014) o tipo II.

A los MRs se les unen los mineralocorticoides (siendo la aldosterona la principal hormona esteroidea de esta familia) y se caracterizan por presentar una alta afinidad para la unión de los GCs. Los MRs tienen una localización más limitada que los GRs; se encuentran principalmente en tejidos cardiovasculares, hígado y riñones, así como en la mayoría de regiones corticolímbicas del cerebro, incluyendo las implicadas en la regulación del eje HHS (De Kloet, Vreugdenhil, Oitzl, & Joëls, 1998). Por otra parte, los GRs tienen una afinidad entre seis y diez veces menor que los MR por los GCs y, en el cerebro, se encuentran en altas concentraciones en el HP, neuronas de los ganglios basales y en el septo lateral y medial de la amígdala (Patel et al., 2000). Más concretamente, el HP humano muestra una expresión abundante de GRs tanto en neuronas de la capa del *Cornu Ammonis 1* (CA1), como en neuronas del giro dentado (DG), habiéndose demostrado los niveles más bajos en la subregión CA3 del HP. Además, los GRs se expresan en otro grupo celular, los astrocitos. A pesar de que los niveles de GRs se mantienen estables con la edad, se ha observado que, en pacientes con trastornos de depresión mayor (DM) y esquizofrenia se suele observar hipercortisolemia y una disminución del ARNm para los GRs en el HP (Wang et al., 2013).

El grupo de investigación dirigido por el Dr. Bruce McEwen postuló por primera vez la asociación entre el estrés crónico y el daño neuronal en la *hipótesis de la cascada glucocorticoide* (Sapolsky, Krey, & McEwen, 1986). Según esta hipótesis, si la exposición a altos niveles de GCs se prolongaba durante un largo periodo de tiempo, lo que corresponde a las situaciones de estrés crónico o a una disfunción del eje HHS, induciría un daño progresivo en las áreas clave del cerebro implicadas en la regulación del eje HHS, siendo particularmente vulnerable el HP.

1.3. El estrés y el control del ciclo circadiano

El hecho de que la mayoría de los individuos tengamos actividad durante el día e inactividad durante la noche, tiene una razón de ser. Todos los animales, plantas y seguramente todos los organismos, muestran algún tipo de variación fisiológica que está asociada con un cambio ambiental rítmico. El conocimiento de la periodicidad de los fenómenos biológicos data de épocas muy antiguas. Ya Aristóteles o Galeno describieron la periodicidad del sueño, señalando principalmente al corazón como centro de control. A finales del siglo XX (1962), con Aschoff, Wever y Siffé, surgieron las primeras investigaciones en animales de laboratorio y, paralelamente, se comenzaron a describir los cambios en los ritmos diarios de la temperatura en trabajadores por turnos o en soldados durante guardias nocturnas.

En los vertebrados, la existencia de variaciones fisiológicas asociadas a cambios ambientales rítmicos está regulada, principalmente, por el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo anterior (Meijer, Rusak, & Harrington, 1989; Stokkan, Yamazaki, Tei, Sakaki, & Menaker, 2001). Aquél actúa como un oscilador que marca el ritmo de muchas funciones biológicas, entre las que se encuentra, por ejemplo, la síntesis de CRH (Kalsbeek, van Heerikhuizen, Wortel, & Buijs, 1996), de la hormona luteinizante (LH), de la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH) o la hormona folículo-estimulante (FSH). La liberación de todas estas hormonas se encuentra sincronizada endógenamente y regulada por los ciclos de luz y de temperatura, así como por los ritmos de actividad animal. En los periodos de estrés se puede producir la interrupción de esta periodicidad (Oishi et al., 2014) independientemente de la edad o de las condiciones exteriores de luz y temperatura.

El NSQ del hipotálamo es modulado fundamentalmente por la variación de luz a través de la retina de los ojos. La retina contiene fotorreceptores unidos a las células ganglionares que, a su vez, cuentan con un pigmento llamado melanopsina. La información de estas células pasa por el tracto retinohipotalámico hasta el NSQ. Si hay luz, se disminuye la liberación de la hormona segregada por la glándula pineal, llamada melatonina; y con la ausencia de luz, los niveles de melatonina se incrementan. Esta hormona, conocida también como la hormona del sueño en humanos, se ha comprobado que en roedores interacciona con el sistema GABAérgico, que tiene una gran importancia en la regulación funcional de las interneuronas del NSQ, el cual está involucrado en la ritmicidad del reloj circadiano.

Cuando se produce un periodo de estrés o una disrupción en el ciclo circadiano, diversos resultados experimentales obtenidos en ratas de laboratorio muestran que la ausencia de la liberación rítmica de melatonina en la circulación sanguínea conduce a la cronodisrupción de funciones asociadas con el metabolismo de la energía (Kumar Jha, Challet, & Kalsbeek, 2015). En particular, se ha observado que la pinealectomía, que conlleva la supresión del aumento nocturno de melatonina, perturba el ritmo de 24 h de la concentración de glucosa en plasma (la Fleur, Kalsbeek, Wortel, van der Vliet, & Buijs, 2001) y suprime el ritmo diario de la secreción de insulina inducida por la glucosa (Picinato, Haber, Carpinelli, & Cipolla-Neto, 2002).

Por otra parte, la actividad termorreguladora y el inicio o el fin de la fase del sueño también se han visto estrechamente relacionados con la liberación de melatonina (Kräuchi, Cajochen, Werth, & Wirz-Justice, 2000). El inicio del sueño generalmente coincide cuando la temperatura corporal comienza a disminuir, lo cual es explicado fundamentalmente por la vasodilatación de las regiones distales de la piel y, por el contrario, sube cuando se inicia el despertar (Kräuchi et al., 2000).

Además de este control central anteriormente explicado, el NSQ a su vez dirige el *oscilador periférico* o *reloj periférico* presentes en órganos vitales y células no nerviosas que responden también a ritmos circadianos, incluyendo el corazón, el hígado, músculo, riñón y tejido adiposo (Dibner, Schibler, & Albrecht, 2010). Sin embargo, mientras que el reloj periférico está influenciado principalmente por la disponibilidad de nutrientes (en humanos, alta disponibilidad durante el día, ausente en la noche), que altera la transcripción de hormonas endocrinas clave (Dibner et al., 2010), el reloj central mantiene un control maestro a través de la liberación de factores neurohormonales dependiendo de la detección de luz por la retina.

Como mencionamos anteriormente, un ejemplo de esto lo encontramos en el sistema cardiovascular que también se encuentra bajo el control del ritmo circadiano (Stöhr, Marx, & Federici, 2014). El estudio de los mecanismos de interrupción del ritmo circadiano y sus efectos se ha estudiado en los trabajadores con ciclo nocturno. En ellos se ha observado un alto riesgo de desarrollar obesidad (Kubo et al., 2011) o muerte prematura (Huang, Ramsey, Marcheva, & Bass, 2011). El ciclo circadiano estudiado en este grupo de sujetos ha demostrado incluso que se correlaciona con la resistencia a la insulina y trastornos en el ciclo del cortisol. Aunque sigue sin haber un mecanismo único que explique este fenómeno, ciertos autores presentan un razonamiento válido que responde a estas variaciones, basándose en que la privación de sueño se encuentra inducida por la predominancia de la actividad del sistema nervioso simpático y la liberación de las catecolaminas (Zhong, Xiao, Huang, & Huang, 2005), apoyándose además en que estos sujetos suelen presentar alteraciones en el control circadiano del eje HHS.

Por otra parte se ha estudiado que el sueño puede contribuir a mantener la conectividad entre la corteza medial prefrontal y la amígdala, que es fundamental para responder adecuadamente a los desafíos emocionales del siguiente día (Yoo, Gujar, Hu, Jolesz, & Walker, 2007).

Para terminar, únicamente indicar que los trastornos de la actividad psicomotora y del ciclo sueño-vigilia son los principales síntomas en los trastornos del estado de ánimo (Salvatore, Indic, Murray, & Baldessarini, 2012) y a menudo conllevan cambios afectivos. La actividad locomotora, así como los patrones de sueño diferentes, parecen ser específicos para determinados tipos de enfermedad afectiva como, por ejemplo, el observado en la depresión unipolar (estado de ánimo que se mantiene en un solo polo emocional), asociados con incrementos de la actividad psicomotora frente a la depresión bipolar (estado de ánimo que cursa con el trastorno maníaco-depresivo), que a su vez muestra periodos de insomnio (Kupfer, Weiss, Foster, Detre, & McPartland, 1974).

1.4. Estrés y metabolismo

En 1934, el endocrinólogo Hans Selye estudiaba los cambios hormonales que se producían en el organismo de ratas de laboratorio tras inyectarles extractos ováricos. En este experimento, las ratas comenzaron a desarrollar ciertos síntomas que él mismo describió como crecimiento de la corteza suprarrenal, atrofia del bazo, del timo y de los nódulos linfáticos, así como úlceras sangrantes profundas en el revestimiento interno del estómago y duodeno. Todo indicaba el descubrimiento de una nueva hormona implicada en estos cambios. Sin embargo se comprobó que inyecciones con diferentes extractos producían los mismos efectos. El propio Selye apuntó más tarde: *Se suponía que la mía era una nueva hormona y quién iba a saber que tal vez la hipófisis también podía manufacturar esa misma*. De la manera más casual concibió las consecuencias de lo que más tarde apuntó en el concepto de estrés.

Hoy en día se conoce que una de las consecuencias más graves relacionadas con el estrés y el sistema digestivo son las úlceras gástricas y/o las duodenales. Éstas parecen estar asociadas a un incremento crónico de los GCs. Estos esteroides parecen vincularse al aumento del ácido clorhídrico, principal causante de la reducción de la protección gástrica de las paredes del estómago.

Sin embargo, este no es el único trastorno ocasionado por el incremento de los GCs. La secreción de estas hormonas también produce aumento del apetito (Hoebel, 1997). Aunque este hecho en algunas personas predisponga a la obesidad, debido a que el estrés crónico induce la acumulación de tejido adiposo abdominal e inhibición del eje HHS, el patrón de la distribución de las hormonas juega un papel muy importante, así como el de la secreción de GCs y la CRH. Por ejemplo, los efectos de la CRH sobre el apetito es el contrario, es decir, provoca su inhibición. Los problemas de obesidad y bulimia en muchas ocasiones se han relacionado con trastornos asociados al estrés. Los ejemplos de anorexia y bulimia nerviosa son trastornos que probablemente sean el resultado de diferentes factores emocionales, psicológicos, fisiológicos y sociológicos (Kaye, 2008).

Según hemos ido avanzando en el conocimiento del estrés y los problemas vinculados con éste, se han relacionado nuevos sistemas implicados en el desajuste fisiológico del organismo. Hoy en día es bien conocido que tanto el SNS como el HHS provocan la liberación de glucosa desde los almacenes de energía, lo que puede afectar el equilibrio energético.

A nivel metabólico, las hormonas adrenales y tiroideas son los principales factores catabólicos que regulan el metabolismo basal. Esto tiene una explicación fisiológica constatada. La adrenalina y el aumento de cortisol secretados por las glándulas suprarrenales activan la vía de la glucólisis de los músculos, movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo y la termogénesis. En última instancia, la termogénesis provocaría el consumo de energía, por lo que el gasto energético se ve incrementado al regular la expresión de proteínas desacopladoras en tejido adiposo

pardo y músculo, que permiten la generación de calor. Por otra parte, las hormonas tiroideas son las responsables del 20-25% del gasto energético y de la termogénesis del cuerpo.

Un ejemplo de lo que ocurre en regímenes de estrés crónico se ha estudiado en el caso de la subordinación social en roedores. Estos animales reducen el consumo de comida, la ganancia de peso y la adiposidad. Como resultado, también se reduce la leptina y la insulina plasmáticas. Al mismo tiempo, el estado metabólico puede influenciar también la respuesta de estrés activando el eje HHS y el SNS debido a que la leptina tiene efectos sobre el eje HHS. A modo de retroalimentación también se ven modificadas las respuestas conductuales al estrés, así como el equilibrio simpático-vagal inclinándose hacia una activación simpática.

Para terminar, solamente destacar que existen otro tipo de dolencias comunes, que aparecen con más frecuencia, tras la exposición al estrés como es el caso de la colitis, la impotencia, la amenorrea, el envejecimiento prematuro, y otras afectaciones del sistema inmune (Ver revisión Cruces, Venero, Pereda-Pérez, & De la Fuente, 2014) e incluso embolias.

1.5. Efectos del estrés en la plasticidad sináptica y la LTP

Santiago Ramón y Cajal fue uno de los impulsores de la neurociencia moderna de los últimos años del siglo XIX. Sentó sus bases describiendo a la neurona como la unidad básica del cerebro. En contra de lo que se pensaba, fue el primero en describir la individualidad funcional e histológica de las neuronas y más adelante los estudios explicaron que las conexiones entre las neuronas estaban fuertemente activas en unas regiones o espacios especializados, que hoy en día conocemos como *sinapsis* (Sherrington, 1906). Sin embargo, no fue hasta 1948 cuando Donald Hebb formaliza fisiológicamente el concepto de que el aprendizaje se produce por el establecimiento de contactos sinápticos entre las neuronas que se activan de manera concurrente formando redes neuronales.

En 1973, Tim Bliss y Terje Lømo describieron por primera vez un evento de plasticidad sináptica en el HP de conejo que pareció describir las especificaciones descritas previamente por Hebb. Se proponía que las neuronas podían generar nuevas conexiones o sufrir cambios metabólicos que daban lugar a una mejor comunicación entre ellas (Bliss & Lomo, 1973). Este evento, ocasionado por la inducción de actividad, podía durar horas e incluso días y es conocido como potenciación a largo plazo (LTP, *del inglés Long Term Potentiation*).

La formación hipocampal es una estructura cerebral particularmente favorable para estudiar la LTP por el empaquetamiento, número y capas de células que posee. Los cambios sinápticos de la LTP dependen principalmente de dos tipos de receptores de glutamato que se encuentran en las espinas dendríticas de las neuronas; los que responden preferentemente al agonista N-metil-D-aspartato (NMDA) se denominan receptores tipo NMDA, y los que responden preferentemente al

agonista α -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), son los receptores AMPA. Los receptores NMDA tienen unas propiedades especiales que permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ en la espina postsináptica solo cuando la activación presináptica y postsináptica ocurren al mismo tiempo. De esta manera, el flujo de iones desencadena una cascada de procesos moleculares en las neuronas que, finalmente, favorecen los procesos de aprendizaje y memoria.

1.5.1. Plasticidad sináptica

El término de plasticidad fue introducido en 1890 por el psicólogo William James para describir la naturaleza modificable del comportamiento humano (Nieto Sampredo, 2003). Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XX con Donald Hebb, cuando se dio a conocer el término de *plasticidad sináptica*, entendida como una sucesión de eventos que cambian la fuerza de las conexiones sinápticas que facilitan la memoria.

Los estudios más recientes indican que las alteraciones en la plasticidad y en los cambios estructurales y volumétricos de zonas corticolímbicas específicas contribuyen a los desequilibrios relacionados con el estrés. Esta idea, muy al contrario de lo que se ha pensado tradicionalmente, añade que, además de los desequilibrios neuroquímicos, existen una serie de dianas a nivel molecular y celular que resultan susceptibles al cambio como consecuencia del estrés. Entre estos objetivos estaríamos hablando de la retracción dendrítica o la disminución en la densidad de espinas dendríticas, la pérdida neuronal o glial y otros cambios a nivel molecular que destacaremos más adelante.

1.5.2. Complejidad del árbol dendrítico

La complejidad del árbol dendrítico depende del incremento del número dendritas o número de ramificaciones de las neuronas. Este hecho se ha visto relacionado con el incremento de las sinapsis entre las neuronas (Fiala & Harris, 1999), discutiéndose mucho sobre el papel crítico y la relación que guarda en el almacenamiento de la información. Por tanto, el conocimiento acerca de la remodelación dendrítica ha servido como punto de apoyo para entender cuál es el funcionamiento del sistema nervioso concebido como un sistema plástico.

A nivel estructural, la exposición prolongada a altas dosis de corticosterona como ocurre en un estrés crónico por inmovilización parece reducir la complejidad de las ramas apicales (aunque no de las basales) de las neuronas piramidales (para revisión ver Lucassen et al., 2014), así como en neuronas de la corteza prefrontal medial (Dias-Ferreira et al., 2009; Liston et al., 2006; Radley et al., 2004; Wellman, 2001). Sin embargo, otros estudios con estrés crónico muestran el efecto contrario en neuronas de la amígdala basolateral (Vyas, Mitra, Shankaranarayana Rao, & Chattarji,

2002) o en neuronas de la corteza orbitofrontal (Liston et al., 2006). Igualmente se ha observado que una exposición prolongada a diversos tipos de estrés conlleva resultados similares en diferentes especies animales (Galea et al., 1997; Magariños, McEwen, Flügge, & Fuchs, 1996). Cabe señalar que, cuando la fuente de estrés cesa, se ha observado que, mientras ciertas regiones presentan modificaciones reversibles después de un periodo de recuperación (Goldwater et al., 2009), otras regiones parecen ser resistentes a nuevos cambios tras el periodo de estrés (Miracle, Brace, Huyck, Singler, & Wellman, 2006).

Estos cambios en la morfología dendrítica generalmente necesitan varias semanas para desarrollarse. Asimismo, y aunque se expondrá con mayor detalle en el siguiente apartado, se ha demostrado que el estrés crónico también conduce a una pérdida de las sinapsis en las fibras musgosas y a reordenamientos de las mitocondrias y de las vesículas sinápticas en los terminales presinápticos (Sandi et al., 2003; Tata, Marciano, & Anderson, 2006).

Pese a que pueden existir relaciones recíprocas entre comportamientos relacionados con el estrés y cambios en la plasticidad estructural y neuronal, en general todavía no está claro si los sustratos anteriores deben clasificarse como verdaderamente patológicos o si se pueden clasificar como un sistema de adaptación dinámica ante un factor estresante. En cierta medida, estos cambios pueden considerarse reversibles o irreversibles dependiendo de la situación. Veamos algunos ejemplos a continuación.

El primer ejemplo es el estudio llevado a cabo en ratas subordinadas sometidas a estrés crónico por otras ratas dominantes en un sistema de madrigueras. Se ha observado que las ratas subordinadas sufren una remodelación en las dendritas del HP, reduciéndose y simplificándose el número de sus ramificaciones neuronales. Este hecho ha resultado ser independiente del tamaño de las glándulas adrenales (McKittrick et al., 2000). Lo que este efecto particular enfatiza es que no es el tamaño de la glándula adrenal o la presunta cantidad de estrés fisiológico *per se* lo que determina la remodelación dendrítica, sino un complejo conjunto de otros factores que interactúan y modulan la estructura neuronal. De hecho, en las especies de mamíferos que hibernan, la remodelación dendrítica es un proceso reversible, y se produce pocas horas después del inicio de la hibernación (visto en hámsteres europeos y en las ardillas de tierra) (Magariños, McEwen, Saboureaux, & Pevet, 2006; Popov, Bocharova, & Bragin, 1992). Esto implica que la reorganización del citoesqueleto se lleva a cabo con rapidez y de forma reversible, por lo que los cambios en la longitud de las dendritas y la ramificación de éstas no son “daños” sino una forma de plasticidad estructural.

El siguiente ejemplo que podemos mencionar es el llevado a cabo en ratones de laboratorio y cuyos resultados se asemejan a otros resultados obtenidos bajo condiciones de estrés crónico. Cuando se produce la interrupción del ciclo circadiano, se ha comprobado que existe una remodelación dendrítica de las neuronas de la región prelímbica de la corteza prefrontal medial. Concretamente, se ha observado una pérdida en la ramificación dendrítica y reducción de la longitud de las dendritas apicales, pero no se ha constatado que haya una disminución en la densidad de las espinas

(Karatsoreos, Bhagat, Bloss, Morrison, & McEwen, 2011). En cuanto a los cambios en el comportamiento, estos animales muestran una adquisición normal en las tareas de la navegación espacial, pero denotan un deterioro en la flexibilidad cognitiva mostrando déficits en el cambio de estrategia ante una nueva ubicación. Esto sugiere que, si bien la interrupción circadiana crónica puede no poner en peligro las tareas cognitivas simples, las tareas más complejas que requieren flexibilidad cognitiva pueden verse afectadas.

1.5.3. Densidad de espinas

La sinapsis es un proceso esencial de comunicación entre las neuronas. Ocurre en sitios especializados de las dendritas y consisten en protrusiones dendríticas llamadas espinas. Estas formaciones fueron descritas por primera vez en 1892 en neuronas del cerebelo por el premio nobel español Santiago Ramón y Cajal.

Una sola dendrita puede contener cientos de miles de espinas con un citoesqueleto dinámico. Su estructura les confiere dinamismo y la capacidad de cambiar rápidamente sus volúmenes o formas en respuesta a diferentes estímulos. En cuestión de horas, y dependiendo de la estabilidad del citoesqueleto de la espina, se ha comprobado que entre el 10 y el 20% de las espinas pueden aparecer o desaparecer de forma espontánea en las dendritas (De Roo, Klausner, Mendez, Pogliano, & Muller, 2008).

Hoy en día está bien descrito que la memoria a largo plazo está mediada, en parte, por el crecimiento de nuevas espinas dendríticas estables para reforzar una vía neural en particular. Aunque los efectos del estrés en la densidad de las espinas dendríticas se han visto modificados, durante los últimos años los estudios han mostrado en muchas ocasiones resultados contradictorios. Se ha observado que, mientras unos autores han descrito un aumento en el número de espinas de las dendritas de las neuronas piramidales de CA3 (Yoshiya et al., 2013), así como un aumento en las densidades postsinápticas de las neuronas de CA1 (Sebastian, Estil, Chen, Schrott, & Serrano, 2013), otros autores no han encontrado estos cambios (Chen et al., 2010). Por el contrario, otros estudios han demostrado una disminución de la complejidad dendrítica de CA3 y CA1 tras el periodo de estrés que, rápidamente, se hizo reversible después de un periodo de recuperación (Alfarez et al., 2009; Sousa, Lukoyanov, Madeira, Almeida, & Paula-Barbosa, 2000). Esto nos indica que la formación o desaparición de las espinas tienen un comportamiento dinámico y constante, pudiendo encontrar la clave de su funcionalidad en la estabilidad de aquéllas.

Entre otros, este dinamismo en muchas ocasiones resulta afectado por diversos mecanismos. Por ejemplo, se ha observado que la eliminación de las espinas presentes antes de un aprendizaje motor, así como el mantenimiento de las nuevas espinas para la retención del mismo (Liston et al., 2013), guarda una relación muy importante con las concentraciones plasmáticas oscilantes

de los GCs a lo largo del ritmo circadiano; sugiriendo que la eliminación de espinas, provocada por las diferentes concentraciones de GCs, es mediada a través de los MRs (Liston et al., 2013).

En conjunto, estos estudios sugieren que la exposición prolongada al estrés crónico y a los GCs altera marcadamente el número y la morfología de ambos elementos estructurales tanto pre como post-sinápticas y, por lo tanto, la fuerza de las sinapsis excitadoras en las espinas de las neuronas. Sin embargo, y aunque este hecho ha sido ampliamente estudiado en el HP, los efectos del estrés a largo plazo también podrían traducirse en cambios sinápticos en zonas claves del SNC como la CPF (Goldwater et al., 2009) o la amígdala. Cambios que podrían reflejarse además en la expresión de moléculas sinápticas (por ejemplo, receptores NMDA y AMPA) y en cambios morfológicos en el árbol dendrítico.

1.6. Aprendizaje y glucocorticoides

Hasta ahora, nos hemos centrado únicamente en los cambios que ejerce el estrés a nivel estructural. Sin embargo, a continuación, nuestra pregunta fundamental en el presente apartado tratará de explicar cuál es el resultado fisiológico y cognitivo de los cambios en la plasticidad y las conexiones sinápticas por el efecto de los GCs. Como hemos ido viendo a lo largo de la introducción, los GCs son los principales protagonistas de una serie de cambios fisiológicos que ocurren en situaciones de estrés.

En la actualidad se sabe, además, que los GCs son reguladores clave del aprendizaje y la memoria tanto intrínseca como extrínseca (tipo condicionamiento Pavloviano y espacial) (Sandi & Pinelo-Nava, 2007), cuyas bases neuroanatómicas se encuentran en las áreas corticolímbicas, principalmente en la formación hipocampal (Russell et al., 2014), en la corteza prefrontal y en la amígdala (Sandi & Pinelo-Nava, 2007). Dentro de este sistema, los GCs interactúan en múltiples niveles y, dependiendo del periodo de exposición, se pueden producir cambios estructurales o incluso consecuencias funcionales con un resultado opuesto o bidireccional al esperado (Joëls et al., 2004).

Diversos estudios de investigación en roedores han puesto de manifiesto que cuando la vivencia del estrés es moderada y se repite diariamente por un periodo aproximado de dos semanas, generalmente no se producen consecuencias negativas sobre la función cognitiva. Muy al contrario, algunos investigadores han llegado a observar que algunos procesos de aprendizaje pueden verse potenciados bajo estas condiciones (Luine, Martinez, Villegas, Magariños, & McEwen, 1996). Sin embargo, si la exposición al estrés se prolonga a tres semanas, generalmente se produce un cierto empeoramiento de las capacidades de aprendizaje, manifestándose especialmente en el aprendizaje espacial (Sandi, 2004). Aunque si al cumplirse las tres semanas cesa la fuente estresante, los animales suelen recuperar sus capacidades cognitivas en el transcurso de las siguientes dos semanas; también se ha estudiado que, cuando la vivencia de estrés se extiende por periodos

superiores a tres meses o implican situaciones de estrés muy intensas, las perturbaciones cognitivas observadas son más profundas y tal vez resulten irreversibles (Bruce S McEwen & Tucker, 2011).

Estos resultados se explican de la siguiente manera. A nivel sináptico, los GCs modulan la actividad presináptica y las respuestas postsinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas que están implicadas en los fenómenos moleculares de potenciación (LTP, *long-term potentiation*) y depresión (LTD, *long-term depression*) sinápticas (reducción de la eficacia de la sinapsis neuronal) de los procesos de aprendizaje (Russell et al., 2014). A nivel celular (fisiológico y estructural), los GCs influyen en las propiedades eléctricas de la actividad neuronal (Joëls et al., 2012) y en el volumen de las espinas dendríticas, ambas características importantes para la comunicación eficaz entre las neuronas (Jeanneteau & Chao, 2013). Por otra parte, los GCs interactúan con los circuitos noradrenérgicos y colinérgicos que inervan el HP y la amígdala, y afectan a la formación de la memoria, así como al sistema endocannabinoide (Manzanares, Corchero, & Fuentes, 1999) y a la regulación de las adaptaciones del comportamiento. La naturaleza variable de estos efectos se determina por la fase del ciclo ultradiano de los GCs, las concentraciones de éstos, el momento y el tipo de aprendizaje analizado (Roozendaal, 2002; Schwabe, Tegenthoff, Höffken, & Wolf, 2012). Aumentos agudos en los GCs justo inmediatamente antes del aprendizaje pueden promover procesos tales como la formación de la memoria, la consolidación y el recuerdo de los estímulos emocionalmente conmovedores (Cahill, Gorski, & Le; McReynolds et al., 2010; Roozendaal, 2002). Sin embargo, si el estrés se produce temporalmente mucho antes del aprendizaje, las consecuencias genómicas provocadas por la acción de los GCs pueden impedir los procesos de la memoria (Buchanan, Tranel, & Adolphs, 2006). Además, la exposición crónica a niveles elevados de GCs puede perjudicar al establecimiento y recuperación de la memoria espacial (Dumas, Gillette, Ferguson, Hamilton, & Sapolsky, 2010; Roozendaal, 2002). El estrés agudo desencadena altos niveles de GCs. Estos GCs, al interactuar con los MRs; principalmente localizados en poblaciones neuronales y gliales del HP y la amígdala, provocan un aumento en la liberación de glutamato en los espacios presinápticos con un efecto rápido y no genómico (Karst, Berger, Erdmann, Schutz, & Joels, 2010). A este efecto le sigue un aumento de los receptores intracelulares de NMDA y AMPA en la membrana plasmática postsináptica (Musazzi, Racagni, & Popoli, 2011). La duración del efecto entre la interacción de los GCs y los MRs sobre la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica es específica de cada región, siendo de corta duración en el HP y de larga duración en la amígdala dorsolateral, donde posteriores estímulos estresantes agudos conducen a una regulación a la baja de los GRs por la estimulación glutamatérgica (Karst et al., 2010). Por el contrario, durante una exposición crónica al estrés, la neurotransmisión glutamatérgica permanece constante en el HP aunque los GCs también contribuyen a la eliminación de glutamato a través de los transportadores localizados principalmente en las células gliales.

En vista de todas estas investigaciones se podría concluir que la cantidad de GCs circulantes podría tener consecuencias negativas o positivas sobre la consolidación de la memoria o el aprendizaje; sin embargo, cabría preguntarse cuál sería la cantidad adecuada de exposición. De esta forma, se ha sugerido que los efectos de estas hormonas sobre el aprendizaje y la memoria sigan una función de “*U invertida*”; de manera que, niveles muy bajos o elevados deteriorarían el apren-

dizaje, mientras que cantidades moderadas de GCs lo potenciarían, aunque esta curva no parece reflejarse en las memorias emocionales (Finsterwald & Alberini, 2014; Sandi & Pinelo-Nava, 2007; C Venero et al., 2002).

2. Efectos del estrés crónico

Hasta el momento hemos hablado de las consecuencias fisiológicas, morfológicas y moleculares que causan diferentes tipos de estrés sobre la salud del individuo. Sin embargo, hay que tener presente que un estrés agudo o puntual no siempre tiene las mismas consecuencias fisiológicas y conductuales que un estrés crónico o prolongado a lo largo del tiempo. De hecho, a menudo se observan efectos diferentes, incluso, contrapuestos. En este apartado nos centraremos esencialmente en matizar algunos de los principales efectos que ocurren tras un periodo de estrés crónico por aislamiento social.

El estudio sistemático de las consecuencias cognitivas y fisiológicas tras la exposición repetida al estrés ha sido investigado principalmente en animales de experimentación. Sin embargo, también podemos encontrar en la literatura científica multitud de estudios sobre las consecuencias negativas que el estrés crónico produce en la salud de las personas, siendo de gran importancia la duración y cronicidad de la situación estresante. Cuando se tiene en cuenta la duración del estrés crónico y las consecuencias cognitivas en animales, podríamos diferenciar entre diferentes subtipos de estrés (Sandi Pérez, Venero, & Cordero, 2001): El *estrés subcrónico* caracterizado por una duración entre 1 o 2 semanas, muestra efectos contradictorios en cuanto al aprendizaje. El *estrés crónico*, con una duración más prolongada que la anterior, en el que comienzan a hacerse evidentes las consecuencias cognitivas, existiendo cierta reversibilidad de los efectos ocasionados por dicho estrés.

En los estudios de investigación básica cuyo objetivo ha sido evaluar los efectos fisiológicos y conductuales de la exposición a situaciones de estrés, se han empleado modelos animales que reproducen las alteraciones conductuales y fisiológicas que se observan en los sujetos que sufren estrés psicosocial. De esta manera, encontramos en la literatura algunos ejemplos con modelos animales de depresión por estrés crónico moderado (*CMS*, del inglés *chronic mild stress*) en los que se han descrito que se induce un estado anhedónico equivalente a algunos de los síntomas de la depresión humana. En estos experimentos se han constatado alteraciones en los niveles de corticosterona y ACTH, de aldosterona, y de renina plasmática, además de una alteración en la retroalimentación negativa de los GCS sobre el eje HHS; aumento de la expresión del ARNm y densidad de los sitios de acoplamiento de los receptores de GCs en el HP, la corteza y el núcleo dorsal del Rafe; así como mayores niveles de CRH en este núcleo. Por otro lado, el sistema inmunológico también se ha visto afectado (Cruces, Venero, Pereda-Pérez, et al., 2014), observándose una elevación de los niveles circulantes -en plasma y en tejido neural del SNC-, tanto de IL-1 β , como de TNF- α , lo cual se ha relacionado con que se produzca también mayor anhedonia.

Los estudios llevados a cabo en humanos también han demostrado que el estrés crónico contribuye a incrementar la probabilidad de padecer enfermedades cardíacas (Rozanski, Blumenthal, & Kaplan, 1999), e incluso al aumento de la tasa de infarto de miocardio en humanos (Rosengren et al., 2004). Aunque los mecanismos implicados no están dilucidados, se cree que deberían ser tanto centrales, como periféricos.

En humanos, los estresores crónicos ambientales tales como problemas de pareja, de salud, o exceso de trabajo, están asociados a trastornos de tipo depresivo. Se ha postulado que los daños que el estrés crónico puede producir en el HP son un mecanismo central que conduce a síntomas depresivos a través de su influencia sobre la actividad del eje HHS (Delgado y Palacios et al., 2011). Algunos estresores sociales, como el rechazo, pueden inducir un desequilibrio autonómico hacia la rama simpática, con la ocurrencia de arritmias ventriculares; mientras que un estresor no social, como la inmovilidad forzada, se caracteriza por una fuerte respuesta vagal y casi ninguna incidencia de extrasístoles ventriculares (Sgoifo et al., 1998).

2.1. El aislamiento social

Es bien conocido que cierto tipo de animales, como los roedores o los humanos, viven en organizaciones sociales, lo cual contribuye a la supervivencia y al éxito reproductivo de las especies. Este sistema de organización les proporciona protección contra amenazas del medio ambiente y se asocia con un aumento en la esperanza de vida (House, Landis, & Umberson, 1988; Lillard, Brien, & Waite, 1995). Más aún, los fuertes lazos sociales ayudan a promover el funcionamiento correcto de los sistemas de regulación y a mantener el equilibrio homeostático en cada individuo (Kiecolt-Glaser & Newton, 2001; Waltz, Badura, Pfaff, & Schott, 1988). Por otra parte, es sabido que muchos cambios genéticos, moleculares y hormonales han ayudado a apoyar este tipo de organización social.

Existe un gran número de estudios en los que se ha descrito que las personas que reciben mayor apoyo social o se encuentran más integrados dentro de una red social tienen mayor capacidad cognitiva y son menos propensos a experimentar cambios cognitivos deletéreos a lo largo de su vida (Berkman & Syme, 1979; Fratiglioni, Paillard-Borg, & Winblad, 2004; House et al., 1988; House, Robbins, & Metzner, 1982; Seeman, Lusignolo, Albert, & Berkman, 2001; Zunzunegui, Alvarado, Del Ser, & Otero, 2003) incluyendo en este periodo la vejez (Bassuk, Glass, & Berkman, 1999; Fratiglioni et al., 2004; Gow, Corley, Starr, & Deary, 2013; Seeman et al., 2001; Zunzunegui et al., 2003). Otros estudios han sugerido que las personas que viven solas son dos veces más propensas a desarrollar demencia (Fratiglioni, Wang, Ericsson, Maytan, & Winblad, 2000; Helmer et al., 1999). En este sentido, algunos estudios han indicado que el matrimonio o la cohabitación se asocian con una mejor función cognitiva en la vejez (Wang, He, & Dong, 2015; Yeh & Liu, 2003), e incluso puede ser un factor protector contra el desarrollo de la EA (Håkansson et al., 2009; Helmer et al., 1999).

Finalmente, cabe indicar que los individuos con una buena red social gozan de una mejor salud y una mayor esperanza de vida que los individuos que tienen una red social pequeña y/o con relaciones sociales de baja calidad (Gow et al., 2013). Por tanto, podríamos destacar que las relaciones sociales, así como la red de las relaciones con el resto de individuos, son comprendidas desde el punto de vista de las circunstancias y del núcleo social al que pertenecen.

La concepción y la investigación sobre el aislamiento social ha ido cambiando con el tiempo. Los primeros estudios sobre este tema estaban enfocados a definir el concepto en sí, y más adelante se llevaron a cabo estudios que implicaban una investigación práctica incluyendo el análisis de cohortes de sujetos o muestras reales. Posteriormente, la investigación se centró en estudios más avanzados que se preocupaban por el conocimiento de los atributos, elementos o consecuencias que llevaban a esta situación (Nicholson, 2009). Los estudios sobre este tema comenzaron a dirigir su atención hacia trabajos con un mayor enfoque objetivo.

Actualmente el aislamiento social podríamos dividirlo en dos tipos: el aislamiento físico (Cornwell & Waite, 2009a; Hawthorne, 2008; Waite & Hughes, 1999) y el aislamiento relacionado con la participación social (Benjamins, 2004). Sin embargo, Cornwell y Wait (2009b) proponen estudiar el aislamiento social en dos vertientes diferentes; una de ellas dirigida a entenderla como la desconexión del mundo social; la segunda, explicada desde el punto de vista de la percepción del sentimiento de aislamiento o del inglés, *loneliness*.

Algunos estudios señalan que los riesgos que el aislamiento social puede suponer para la salud son comparables a los que se asocian con el consumo de cigarrillos o la obesidad (House, 2001). Las personas que carecen de conexiones sociales, o sienten sentimientos frecuentes de soledad, tienden a sufrir mayores tasas de morbilidad y mortalidad (Brummett et al., 2001; Seeman, 2000; Uchino, Cacioppo, & Kiecolt-Glaser, 1996), así como de infecciones (Pressman et al., 2005), depresión (Heikkinen & Kauppinen, 2004) o deterioro cognitivo (Barnes, Mendes de Leon, Wilson, Bienias, & Evans, 2004). Sin embargo, a diferencia de lo estudiado en el tabaquismo y la obesidad, poco se sabe acerca de cómo y por qué el aislamiento social afecta a la salud (Cacioppo & Hawkey, 2003; House et al., 1988).

Aunque es cierto que el aislamiento social y el sentimiento de soledad están relacionados, la asociación entre ambos es moderada (Cornwell & Waite, 2009a), y rara vez se consideran los dos conceptos unidos (Yi & Hwang, 2015). Un ejemplo de esta interacción se ha visto reflejado en un estudio experimental, en el que se entrevistaron a 3015 personas y se observó que, si bien la mayoría de los participantes estaban conectados socialmente, el 9% indicó algún tipo de aislamiento social y en un 7% se clasificaron como aislados o muy aislados. En este estudio, se determinó que el aislamiento social percibido variaba dependiendo del sexo y grupo de edad, región de nacimiento o tipo de ingresos; y el hallazgo clave fue que los adultos más jóvenes tenían mayores probabilidades de ser clasificados como socialmente aislados y los síntomas de depresión fueron asociados de manera potente con la percepción de aislamiento social (Hawthorne, 2008).

Por tanto, la desconexión social estaría marcada por la falta de relaciones sociales y los bajos niveles de participación en las actividades sociales, y el aislamiento percibido o *loneliness*, se entendería como el sentimiento de soledad y una supuesta falta de apoyo social (Yi & Hwang, 2015). Como bien indican los autores Yi y Hwang (2015), estos dos conceptos dejan una serie de preguntas importantes sin respuesta. Por ejemplo, ¿el vínculo entre la desconexión social y la salud, en realidad refleja el impacto de la soledad? ¿Es la unión entre la desconexión social y los sentimientos de soledad la que provocaría cambios en la salud o cada factor actúa por separado?

2.1.1. Aislamiento social: Efectos neuroendocrinos

Estudios en humanos y en especies de animales sociales indican que el aislamiento social puede ser considerado un modelo de estrés que, aunque de naturaleza puramente psicogénica, induce la activación de los dos sistemas principales implicados en la regulación de la respuesta de los organismos al estrés: el sistema simpático médula adrenal (SMA) y el eje HHS, cuya consecuencia final es la liberación de GCs (Hatch et al., 1965). Esta respuesta se acompaña de una disminución de la respuesta inflamatoria e inmunitaria, alteraciones metabólicas, neurológicas y desórdenes conductuales y cognitivos (Arranz, Giménez-Llort, De Castro, Baeza, & De la Fuente, 2009), que constituyen un factor de riesgo para la aparición y evolución de múltiples patologías que incluyen desde enfermedades cardiovasculares, inmunitarias (ver más información en Cruces et al., 2014) y metabólicas, hasta patologías neurológicas y neuropsiquiátricas.

Los efectos del aislamiento social en la etapa adulta, o durante el envejecimiento, suelen diferir de los efectos en neonatos. A continuación se hará referencia a las principales alteraciones fisiológicas, neuroinmunoendocrinas y comportamentales que se han descrito tras la exposición a situaciones de aislamiento social, si bien existe información más detallada en la revisión de (Cruces, Venero, Pereda-Pérez & De la Fuente, 2014).

Existe una extensa información en la literatura científica que indica que el aislamiento social durante la adolescencia y la edad adulta tiene consecuencias neuroendocrinas que dependerán, a su vez, de la especie, el sexo y la edad de los sujetos (Cruces, Venero, Pereda-Pérez, et al., 2014; Martin et al., 2000; Sapolsky, Alberts, & Altmann, 1997). Así, y aunque hay resultados contradictorios, se ha observado que en algunos estudios el aislamiento social durante la edad adulta no siempre altera los niveles basales de los GCs o la relación con la ACTH y/o GRs en el HP. Cuando hablamos de la proporción de receptores para los mineralocorticoides y GCs no se han visto alteraciones durante el aislamiento en el período de destete (Holson, Scallet, Ali, & Turner, 1991) o en edad adulta (Filipović, Gavrilović, Dronjak, & Radojčić, 2005). Además, en la mayoría de los estudios, y aunque los niveles de GCs dependen del sexo y la cepa del animal, parece que se suman resultados contrapuestos en cuanto a la concentración de estas hormonas del estrés. Esto es así debido a que mientras que en unos estudios aumentan (Gambardella, Greco, Sticchi, Bellotti, & Di Renzo, 1994; Giralt & Armario, 1989; Hatch et al., 1965; Moore, 1968; Palanza, Gioiosa, & Parmigiani, 2001), en

otros disminuyen (Viveros, Hernández, Martínez, & González, 1988) e incluso en otros no parecen diferir los resultados (Moore, 1968; Pereda-Pérez et al., 2013).

No obstante, y aunque existe gran cantidad de resultados en la literatura científica, podríamos enumerar una serie de características que parecen ser disfunciones frecuentes asociadas al aislamiento social. Entre estas anomalías pueden destacarse las siguientes: una mayor resistencia vascular (Cacioppo, 2002); presión arterial elevada (Hawkley, Masi, Berry, & Cacioppo, 2006); aumento de la actividad del eje HHS (Adam, 2006) y desregulación de los niveles plasmáticos de GCs (Hawkley, Cole, Capitanio, Norman, & Cacioppo, 2012). Además se han descrito trastornos del sueño (Adam, 2006; Cacioppo, 2002; Hawkley, Preacher, & Cacioppo, 2010); disminución del control inflamatorio; deterioro de la respuesta inmunológica (Arranz et al., 2009; Cole, 2008; Cole et al., 2007) de la capacidad cognitiva y de la atención, así como un comportamiento con evidencias de ansiedad manifiesta (Arranz et al., 2009; Cacioppo & Hawkley, 2009; Cruces, Venero, Pereda-Pérez, et al., 2014). También se ha observado un incremento de peso de las glándulas suprarrenales de animales aislados (Hatch et al., 1965; Holson, Scallet, Ali, Sullivan, & Gough, 1988); aunque estos cambios no han sido siempre evidentes (Gamallo, Villanua, Trancho, & Fraile, 1986; Gentsch, Lichtsteiner, & Feer, 1981; Morinan & Leonard, 1980; Pereda-Pérez et al., 2013; Viveros et al., 1988). En consecuencia, el aislamiento social puede producir cambios fisiológicos perjudiciales para la salud y es considerado como un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad (Carnevali et al., 2012; House et al., 1988).

Por otra parte, es bien conocido que tras un periodo prolongado de estrés se pueden producir alteraciones morfológicas en estructuras cerebrales, siendo el HP una de las más vulnerables. A este respecto, se ha descrito que la reducción del volumen hipocampal está asociada con trastornos de tipo depresivo, resultando ser uno de los hallazgos más replicados en psiquiatría biológica (Kempton et al., 2011).

En conjunto, todos estos resultados indican que el aislamiento social puede ser considerado un potente estresor psicológico en las especies sociales, advirtiéndose una posible afectación en la actividad del eje HHS de manera directa o indirecta. No obstante, hay trabajos en los que no se ha observado una relación directa entre el aislamiento social en animales en edad temprana y el peso de las glándulas adrenales (Sánchez, Aguado, Sánchez-Toscano, & Saphier, 1998).

Finalmente, cabe señalar que, en humanos, el sentimiento de soledad o *loneliness* está relacionado con niveles elevados de cortisol tanto en niños, como en adultos (Adam, 2006; Cacioppo et al., 2000; Doane & Adam, 2010); y parece que, aunque hay una menor capacidad de respuesta del cortisol al estrés (Hackett, Hamer, Endrighi, Brydon, & Steptoe, 2012), no se manifiesta de la misma manera en todos los casos (Steptoe, Owen, Kunz-Ebrecht, & Brydon, 2004).

2.1.2. El aislamiento social: Efectos en el comportamiento y la cognición

Curiosamente, al comienzo de esta tesis sólo encontramos un estudio publicado por Arranz y colaboradores en 2009, en el que los autores describieron, por primera vez, los efectos del aislamiento social en ratones hembra viejas (a la edad de 18 meses) en las capacidades de aprendizaje y memoria espacial; la conclusión más relevante de dicha investigación fue que el aislamiento social aumentaba la ansiedad y aceleraba el declive cognitivo asociado con la edad (Arranz et al., 2009).

En general, los estudios sobre el efecto del aislamiento social en modelos animales, fundamentalmente rata y ratón, han resultado ser controvertidos, particularmente en relación a la conducta y la cognición. Ello puede ser debido, al menos en parte, a que factores críticos como la edad y el estado de desarrollo influyen de manera crítica en los efectos del aislamiento social (Arakawa, 2005). La mayoría de estudios se han centrado principalmente en los periodos neonatal/destete/adolescente o adulto. Sin embargo, poco se sabe de los efectos del aislamiento social durante el último periodo del proceso vital que sigue a la madurez del individuo, durante el proceso de envejecimiento y la vejez. Este último tramo de edad será el principal objetivo de estudio en esta tesis enfocándonos principalmente en los efectos conductuales, cognitivos y neurobiológicos del aislamiento social.

El aislamiento social durante el periodo postnatal induce un “síndrome de aislamiento” (Hatch et al., 1965) caracterizado por cambios bioquímicos (Blanchard et al., 1998; Heim & Nemeroff, 1999) y alteraciones conductuales que incluyen hiperactividad locomotora (Gentsch, Lichtsteiner, Kraeuchi, & Feer, 1982), déficits en la inhibición prepulso (Geyer, Wilkinson, Humby, & Robbins, 1993), mayor respuesta a ambientes novedosos (Gentsch et al., 1982) y diferencias en las capacidades cognitivas (Juraska, Henderson, & Müller, 1984).

Cuando se ha estudiado el efecto del aislamiento social en ratones adultos o ratas adolescentes, algunos autores han observado que durante el periodo de 1-3 semanas de aislamiento aumenta la agresividad (Bourke & Neigh, 2012; Mathews, Wilton, Styles, & McCormick, 2008; Parmigiani, Palanza, Rogers, & Ferrari, 1999), pero no se afectan significativamente los parámetros de ansiedad en el laberinto en cruz elevado (Rodgers & Cole, 1993). En otros estudios sí se han observado diferencias en estos parámetros (Cruces, Venero, Pereda-Pérez, et al., 2014; Moragrega, Carrasco, Vicens, & Redolat, 2003). Curiosamente, cuando ratones de la cepa “senescence accelerated mice” (SAM), un modelo animal de envejecimiento acelerado, fueron sometidos a aislamiento social durante 12 semanas se observó que aumentaba el daño oxidativo en la amígdala de estos ratones, aunque no parecían observarse alteraciones en la memoria espacial (Chida, Sudo, Mori, & Kubo, 2006).

En ratas, cuando el aislamiento social tiene lugar durante la etapa juvenil, la actividad exploratoria se ve reducida mientras que, cuando tiene lugar durante la edad adulta, se observan patro-

nes exploratorios alterados con un patrón más activo (Arakawa, 2005). Estos resultados sugieren que las pautas exploratorias dependen de la experiencia social en interacción con otras ratas durante la etapa juvenil, y son modificadas por las condiciones sociales en la edad adulta.

Por tanto, los efectos del aislamiento social en animales neonatos no parecen ser comparables a los efectos que se producen en la edad adulta. No obstante, existen pocas investigaciones sobre el impacto del aislamiento social en el adulto a pesar de que éste es más frecuente en humanos adultos y, especialmente, en personas mayores.

En relación a los efectos cognitivos que hemos encontrado al revisar la literatura específica (indicados en la **TABLA 1**), en los resultados de las investigaciones destacan de manera especial déficits en el aprendizaje (Arranz et al., 2009; Huang et al., 2011) y en la memoria de trabajo (Garrido et al., 2013), además de otros también señalados. Por ejemplo, los estudios realizados en ratones macho sobre la memoria del miedo al contexto resultan inconsistentes, mostrando en unos casos incremento (Pibiri, Nelson, Guidotti, Costa, & Pinna, 2008); y en otros reducción (Hsiao, Chen, Chen, & Gean, 2011) o ausencia de cambios (Martin & Brown, 2010).

3. El envejecimiento

Es un hecho ampliamente constatado que el envejecimiento normal conduce a un cierto grado de deterioro cognitivo que implica cambios cerebrales que están caracterizados por un proceso neurodegenerativo. En éste intervienen de manera conjunta factores genéticos, ambientales, metabólicos y hormonales, donde los GCs juegan un papel crucial (Garrido, 2011). Todo esto lleva consigo alteraciones anatomofisiológicas que acaban desencadenando daño y/o pérdida neuronal y deterioro funcional (Burke & Barnes, 2006).

Aunque no todos los individuos ancianos muestran alteraciones en la regulación del eje HHS (Lupien et al., 2005), el proceso de envejecimiento lleva consigo un declive de los mecanismos de regulación de este eje. Algunas personas mayores, cuando están expuestos ante situaciones de estrés, pierden la capacidad para inhibir el proceso de retroalimentación negativa que modula a la baja la actividad del eje HHS. Por lo tanto, algunos individuos presentan una elevación significativa de sus niveles de cortisol endógeno (Lupien et al., 1994), así como de catecolaminas (Ferrari et al., 2004).

Este fenómeno aparece también en animales de laboratorio. De hecho, en ratas viejas, además de observarse una concentración mayor de corticosterona en plasma, existe una disminución de los receptores para MR y GR en las áreas CA1 y CA3 del HP (de Kloet, Rots, & Cools, 1996). Como consecuencia, la función y morfología hipocampales se ven comprometidas durante el envejecimiento (Lupien et al., 1998; Lupien et al., 2005). Muchos aspectos de la plasticidad hipocampal se reducen con la edad como, por ejemplo, el grado del proceso de neurogénesis (Couillard-Després,

| Author | Species | Age at isolation | Isolation duration | Neuroendocrinology and Others Biomarkers | Behaviour and Cognition |
|--|-------------------------|--------------------|-----------------------------|--|--|
| (Sánchez et al., 1998) | Wistar rats ♂ | Pre-weaning | 2 month | ↓ in plasma corticosterone levels = adrenal or testicular weights. | = Body weight and daily consumption of food and water |
| (Kanitz et al., 2009) | Domestic piglets | Pre-weaning | Single 4h about | ↑ cortisol ↑ Hypothalamic GR, MR ↓ MR in the amygdala ↑ c-fos in hypothalamus and amygdala | ↑ open-field reactivity (e.g. locomotion, vocalization) |
| (Levine & Mody, 2003) | Squirrel monkeys | Pre-weaning | 4-6 h during 2 months | ↓ response of cortisol and noradrenergic system following social isolation in juvenile squirrel monkeys at 2 and 3 years of age | ↓ Behavioral response (vocalizations). |
| (Lukkes, Mokin, Scholl, & Forster, 2009) | Sprague-Dawley rats ♂ | Post-weaning | 3 weeks | ↓ plasma corticosterone 2 h after restraint | ↑ Anxiety and Fear ↓ social contact |
| (Wongwitdech & Marsden, 1996) | Lister hooded rats ♂ | Post-weaning | 4 weeks | | ↑ place and reversal learning |
| (Hellemans, Bengs, & Olmstead, 2004) | Long-Evans rats ♂ | Post-weaning | Until adolescence (66 days) | | ↑ anxiety, spatial learning, and locomotor activity; switching the rearing condition partially reversed these changes. |
| (Toth, Mikics, Tulogdi, Aliczki, & Haller, 2011) | Wistar Rats ♂ | Post-weaning | 7-8 weeks | = Basal corticosterone plasma levels = Diurnal oscillations in heart rate | Abnormal attack patterns (↑ in heart rate) deficient social communication and ↑ defensive behaviors |
| (Weiss, Pryce, Jongen-Relo, Nanz-Bahr, & Feldon, 2004) | Sprague-Dawley rats ♀ ♂ | Post-weaning | Chronic | ♂ ↑ basal ACTH and ↑ ACTH and corticosterone following stress ♀ = HPA axis functioning = mRNA expression of MR and GR | ♀ ♂ ↓ contextual fear-conditioning = Locomotor activity in the open field ♂ ↑ anxiety in the elevated plus maze ♀ = Startle response |
| (Arakawa, 2005) | Wistar Rats ♂ | Post-weaning | 14, 26, 51 and 116 days | | ↓ exploration and altered patterns of exploratory behavior |
| (Ouchi, Ono, Murakami, & Matsumoto, 2013) | ICR mice ♀ ♂ | Post-weaning | 6 weeks | | = object recognition test ↓ contextual fear memory |
| (Chida et al., 2006) | Mice SAMPI0 ♂ | Post-weaning | 9 weeks | ↑ serum corticosterone levels | ↓ conditioning memory = spatial memory |
| (Moragrega, Carmen Carrasco, & Redolat, 2005) | NMRI mice ♂ | Juvenile-Adult | 30 days | | ↑ locomotion activity ↑ spatial memory in the water-maze |
| (Martin & Brown, 2010) | C57BL/6J mice ♀ | Juvenile | 16 weeks | | ↑ immobility in the forced swim test and tail suspension test (TST), ↓ startle response and prepulse inhibition = cued or contextual fear memory |
| (Pressman et al., 2005) | Humans | Young adult | Loneliness | ↑ plasma cortisol | ↑ psychological stress and negative affect, ↓ positive affect, ↓ sleep efficiency and quality. |
| (Garrido et al., 2013) | Wistar rats ♂ | Young | 3 to 6 months of age | ↑ corticosterone and dopamine and = acetylcholine in the PFC in response to acute restraint stress | Compared to environmental enriched rats = Spatial working memory ↑ Inhibitory avoidance response. |
| (Grippio et al., 2007) | Prairie voles ♀ ♂ | Adult | 4 weeks | ↑ oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus ♀ ↑ plasma oxytocin, ACTH and corticosterone ♂ ↑ plasma oxytocin | Sucrose intake was ↓ in ♀ ♂ |
| (Stephens et al., 2004) | Humans ♀ ♂ | Adult, middle aged | Loneliness | ↑ fibrinogen and natural killer cell. The cortisol response 30 min following waking was positively associated with loneliness | Loneliness: Not associated with gender, age or socioeconomic position ↓ emotional support ↑ depression, hopelessness and sleep problems |
| (Pereda-Pérez et al., 2013) | Octodon Degu ♀ | Adult | 6,5 months | = Plasma cortisol levels ↓ PSAN-CAM hippocampus levels ↓ number of granulocytes ↓ Body weight = Adrenal weight | ↓ % Freezing to fear conditioning training ↓ % Freezen to context test |
| (Arranz et al., 2009) | C57b/129sv mice ♀ | Older | 6 months | ↓ NK activity of thymic cells. | ↓ spatial learning and memory ↑ neophobia and anxiety |

(↑) Increase, (↓) Decrease, (=) No change.

TABLE 1. (Cruces, Venero, Pereda-Pérez, et al., 2014)

2013); los niveles de proteínas sinápticas (Eastwood, Burnet, Beckwith, Kerwin, & Harrison, 1994) y la cantidad de espinas dendríticas (Anderson & Rutledge, 1996; Tsamis et al., 2010; von Bohlen und Halbach, Zacher, Gass, & Unsicker, 2006). Hechos todos estudiados tanto en humanos, como en roedores.

Por otra parte, además del HP, existen algunas estructuras cerebrales que se ven más afectadas que otras con el paso de los años. Es el caso también de la amígdala (Sherman, Cheng, Fingerman, & Schnyer, 2015) o la corteza prefrontal y la corteza parieto-temporal que, a diferencia de la amígdala, son susceptibles de sufrir atrofia dendrítica y muerte neuronal (Rapp & Heindel, 1994). A pesar de que estos cambios en humanos son coincidentes con los observados en animales de experimentación, se ha observado que los descensos de la población neural de la sustancia negra o del HP, encontrados en ratas viejas, no suele superar el 20% (Jones, 1983; Morgan, May, & Finch, 1987). Hoy en día se considera que la muerte neuronal en el envejecimiento ocurre en mucho menor grado de lo que se estimó en la década de los años 80 y comienzos de los 90 (Vincen & Cristofalo, 1996).

Además, el envejecimiento está asociado con reducciones en los factores neurotróficos derivados del cerebro (Ziegenhorn et al., 2007), los cuales son importantes en la plasticidad neural y están comprometidos con la depresión y otro tipo de enfermedades frecuentes en el envejecimiento. De esto trataremos en los apartados siguientes.

El envejecimiento también se asocia con alteraciones en la reactividad vascular que se manifiesta como cambios exagerados en la presión arterial: hipertensión arterial e hipotensión ortostática. La respuesta de la frecuencia cardíaca a los cambios de la tensión arterial y al ciclo respiratorio está muy disminuida en los pacientes de edad más avanzada. La primera alteración del sistema autónomo que se detecta en estos pacientes es una disminución en la recaptación de NA. El aumento de las concentraciones de la NA se ha asociado a una reducción de la actividad vagal, lo cual está directamente relacionado con el padecimiento de arritmias e incluso muerte súbita en pacientes con patologías cardíacas asociadas. La pérdida de la eficacia en el control del sistema simpático sobre el sistema cardiovascular podría explicar el aumento de incidencia y vulnerabilidad de los pacientes de edad avanzada a sufrir enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca.

Por tanto, si a estas patologías asociadas a la edad se le suman periodos de estrés, podríamos ver acelerado el proceso de envejecimiento. Este hecho es el que trataremos de investigar en este trabajo, vinculándolo a un suceso que resulta ser una clave más en la aceleración de este proceso: El aislamiento social.

3.1. Envejecimiento y aislamiento social

Como hemos mencionado anteriormente, los riesgos para la salud que plantea el aislamiento social pueden ser especialmente graves para las personas mayores (Cacioppo & Hawkley, 2003; Tomaka, Thompson, & Palacios, 2006). Concretamente porque es una etapa vital en la que el individuo tiene que hacer frente a los cambios estresantes del curso de la vida, problemas de salud y discapacidad (Brummett et al., 2001) que suponen una serie de retos que le dificulta permanecer conectado socialmente (Thoits & Hewitt, 2001). Los cambios de rumbo en la vida pueden ser debidos además, por ejemplo, a la jubilación, el duelo y/o problemas socioeconómicos (Ferraro, Mutran, & Barresi, 1984).

Por otra parte, aunque la independencia de los hijos u otros muchos factores puedan afectar de una manera más o menos adversa, se podría destacar que pueden resultar circunstancias para los que el individuo esté preparado y no conduzcan a ese sentimiento de soledad (Cornwell & Waite, 2009b). En este caso contrario, un aumento en la participación social, como puede ser realizar actividades de voluntariado, debido en parte al aumento del tiempo libre interpuesto por la jubilación, junto con otro tipo de respuesta contrapuesto en el que el individuo tiene menos recursos sociales, contribuyen a una gran variedad de trayectorias relacionadas con esta etapa (Cornwell, Laumann, & Schumm, 2008).

Dado que las personas mayores son más propensas a experimentar aislamiento social (Cornwell & Waite, 2009b) y/o *loneliness* (Berkman & Syme, 1979; Hawkley et al., 2006; Krause, 1987; Thoits & Hewitt, 2001) y que su estado de salud suele estar más comprometido, es más probable que el aislamiento social tenga consecuencias particularmente perjudiciales para la salud en edades avanzadas (Cacioppo, Hughes, Waite, Hawkley, & Thisted, 2006; Heikkinen & Kauppinen, 2004; House et al., 1988). Esto implicaría un mayor riesgo de mortalidad por cualquier causa, aumento de la morbilidad, disminución de la función inmunológica, depresión y deterioro cognitivo (Barnes et al., 2004; Brummett et al., 2001; House, 2001; Seeman, 2000; Uchino et al., 1996).

Por lo tanto, es importante que entendamos los mecanismos mediante los cuales las distintas formas de entender el aislamiento social pueden resultar ser un factor de riesgo para la salud de las personas mayores, en particular. Sin embargo, cuando se examinan por separado estas formas en el aislamiento social, es difícil identificar el principal protagonista en el aislamiento social que conduce a sus efectos deletéreos sobre la salud (House, 2001).

4. Hipocampo y Amígdala: implicación funcional en la memoria y el aprendizaje

El cerebro es uno de los órganos diana de las hormonas del estrés. Como se ha expuesto hasta el momento, existen ciertas estructuras cerebrales en las que se encuentran altas concentraciones de receptores para los GCs, resultando ser áreas especialmente vulnerables frente a la respuesta de estrés.

Dada la importancia que tiene en este trabajo el estudio de la memoria, el aprendizaje y el estrés, nos centraremos como primer objetivo en la comprensión de las regiones implicadas en estos procesos haciendo especialmente hincapié en el HP y la amígdala. Estas regiones tienen una relación funcionalmente dinámica que depende de las condiciones de la tarea (Baddeley et al., 2000). Específicamente se ha sugerido que el HP y la CPF medial pueden, en ocasiones, operar independientemente o en paralelo bajo condiciones en las que hay un tiempo breve de demora entre la fase de entrenamiento y la fase de prueba (Seamans, Floresco, & Phillips, 1998); e incluso, pueden interactuar en condiciones en las que la memoria tiene un mayor tiempo de retardo (Giustino & Maren, 2015; Milad & Quirk, 2012).

Igualmente otros tipos de memoria resultan de gran importancia cuando hablamos, por ejemplo, de situaciones en las que se presenta un cierto tipo de estímulo (aversivo o estimulante). A modo de introducción, la amígdala es una estructura fuertemente ligada a la regulación emocional, así como elemento clave en reacciones frente al estrés. Esta estructura nos ayuda a anticipar un peligro, lo que resulta altamente adaptativo. El conocimiento acerca del condicionamiento del miedo que generalmente muestran los organismos cuando se encuentran ante una señal de peligro, así como los procesos de extinción del miedo, han sido ampliamente estudiados (Fanselow & Poulos, 2005; Herry et al., 2010; Johansen, Cain, Ostroff, & LeDoux, 2011; Maren, 2001; Milad & Quirk, 2012).

Debido a que la amígdala tiene una fuerte conectividad con la formación hipocampal y la CPF, es posible recordar o anticiparse ante un estímulo tanto beneficioso como aversivo. Esto se debe a que la vía HP-CPF, además de proyectar desde el subiculum y la región CA1 del HP, el HP ventral también tiene conexiones bidireccionales con la amígdala, y la amígdala a su vez tiene conexiones bidireccionales con la CPF. Todo esto lo veremos con mayor detalle en los siguientes epígrafes.

4.1. El hipocampo

El HP es una de las estructuras corticales cuya anatomía y plasticidad ha merecido mayor atención por parte de los investigadores en las últimas décadas. Ya en tiempos de Ramón y Cajal se observaron en esta región dos grandes áreas, el Giro Dentado (GD), que presenta en la rata una

característica forma de “v”, y Cornu Ammonis (CA) que, a su vez, se subdivide en tres zonas; CA1, CA2 y CA3 imbricándose con el GD (Figura 2).

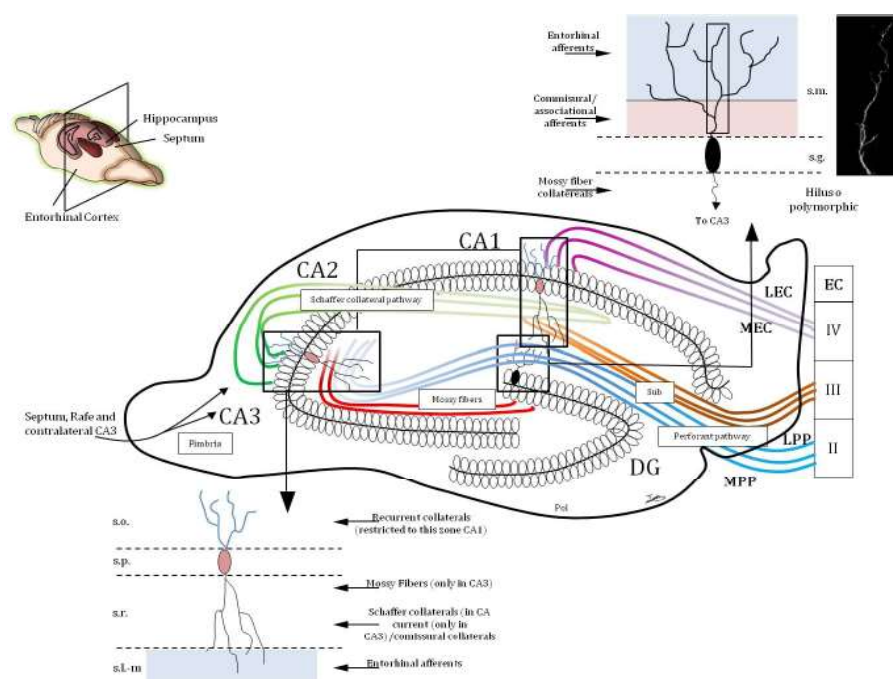


Figura 2. Esquema de las zonas y principales conexiones de la formación hipocampal

La región CA2 tiene una capa de células piramidales relativamente compacta y estrecha dando la sensación de que algunas de estas células se extiendan sobre la capa de células piramidales de CA1. Por esta razón, las fronteras de CA2 son difíciles de establecer y dependerá en gran medida del tipo de tinción histológica que se utilice. Sin embargo, una característica típica de esta región nos puede ayudar a delimitar la zona porque, cerca de la frontera de CA2, la capa de células piramidales de CA1 está en su punto más delgado y las células de ambas subcapas aparecen diferentemente compactadas.

El HP en su totalidad presenta una alta variedad de neuronas tanto inhibitorias como excitadoras, todas ellas distribuidas a su vez en diferentes subregiones. En el GD se puede apreciar una capa granular en la que se agrupan de manera empaquetada los somas elípticos de neuronas granulares cuya proyección dendrítica se dirige hacia la capa molecular del GD. En esta región se encuentran otro tipo de células a las que se les ha dado diferentes nombres, como células en cesto; así como varios tipos de células polimórficas incluyendo los somas de células multipolares o células en candelabro. Además el GD se divide en una última capa a la que se le ha dado el nombre de capa polimórfica. Esta capa tiene una amplia variedad de tipos neuronales, pero poco se sabe sobre ellas salvo en el caso de las células musgosas de las que, con su apariencia de forma triangular o multipolar, se tiene un mayor conocimiento de sus características. Las células musgosas de la rata tienen unas dendritas distintivas que entran en la capa molecular (Buckmaster & Amaral, 2001). Esto implica que este tipo de células, en ratas, reciben poca o ninguna entrada de la vía perforante (Amaral & Scharfman, 2012).

Por otra parte, en la región del CA, en la cara más cercana a la comisura hipocampal, podemos distinguir el *stratum oriens* donde proyectan las dendritas basales de las neuronas de la capa piramidal de la misma, así como de varios tipos de interneuronas. Las dendritas apicales de las neuronas de la región CA proyectan a tres regiones específicas; 1) el *stratum lucidum* 2) el *stratum radiatum* y 3) el *lacunosum moleculare*. La primera capa únicamente se encuentra en CA3 resultando ser indistinguible en la mayoría de las ocasiones. En el *stratum lucidum* y en el *stratum radiatum* se encuentra el principio de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, mientras que el estrato *lacunosum-moleculare* contiene las ramas terminales de estas dendritas (Schultz & Engelhardt, 2014).

En el *stratum lucidum* de CA3, las fibras musgosas que provienen de los axones de las neuronas del GD viajan y realizan sinapsis únicamente con las dendritas proximales de las neuronas de esta región. Por otra parte, en el *stratum radiatum* las dendritas apicales de las neuronas CA3 y CA2 reciben además proyecciones de asociación de niveles rostrocaudales, así como aferencias colinérgicas e histaminérgicas de los núcleos septales y regiones supramamilares. En CA1, las proyecciones que provienen del *stratum radiatum* de CA3 y CA2 -las denominadas colaterales de Schaffer- terminan en el *stratum oriens*, desde donde se envía la información a la CE.

Por tanto y a modo de resumen, la entrada de información al HP se produce fundamentalmente desde las neuronas de la capa II de la CE (Witter & Amaral, 1991), aunque también del *fórnix* y/o, en menor medida, del núcleo del Rafe. Estas aferencias entran por la vía perforante, haciendo sinapsis con las dendritas de las neuronas del GD que proyectan a la capa molecular, y continúan con las dendritas del *stratum lacunosum-moleculare* de CA3. Por otra parte, las neuronas de la capa III de la CE proyectan hacia CA1 y el *subiculum* (Schultz & Engelhardt, 2014) (**Figura 2**).

Las investigaciones sobre el HP en roedores indican que esta estructura cerebral participa en un tipo de memoria utilizada en la ejecución de diversas tareas espaciales y otras relacionadas con discriminaciones sensoriales. La información sensorial que llega al HP sufre un procesamiento que conduce al almacenamiento de los recuerdos de un modo que une o relaciona todos los eventos que ocurren en el momento en que el recuerdo se almacenó. Además, el HP es una estructura especialmente preparada para codificar información relacionada con el entorno espacial en que se encuentra el sujeto (Cohen & Eichenbaum, 1991), de manera que los numerosos estudios llevados a cabo con roedores han utilizado distintos tipos de pruebas, entre las que destacan:

- El laberinto radial.
- El laberinto acuático diseñado por Richard Morris (Morris, 1981).
- El condicionamiento del miedo al contexto (Phillips & LeDoux, 1992).

A pesar de que existen controversias en lo que respecta a las funciones del HP, éste ha sido centro de atención de una gran parte de las investigaciones sobre la memoria. En estudios llevados a cabo mediante registros electrofisiológicos se detectó que en el HP no sólo existían células de lugar, sino que también había otras células que presentaban actividad en respuesta a distintos

eventos tales como las *Phase cells* o *Conjunctive cells*. Estos estudios sugieren que el HP llevaría a cabo el procesamiento tanto de información espacial como no espacial y la interrelación entre ambas (Hampson, Simeral, & Deadwyler, 1999).

El HP, además de jugar un papel muy importante en procesos de aprendizaje y memoria, también contribuye a modular la activación del eje HHS que da lugar a la liberación de los GCs en respuesta a una situación de estrés (Jankord & Herman, 2008).

4.2. La amígdala

En 1888, Brown y Schäfer, mientras estudiaban las consecuencias comportamentales tras la extirpación completa de los lóbulos temporales en un grupo de mono Rhesus (*Macaca mulatta*), descubrieron un profundo cambio en la disposición emocional de uno de ellos. Especialmente apuntaron que, previamente a la operación, uno de los monos tenía un comportamiento agresivo y salvaje; pero que, sin embargo, tras la operación el mono comenzó a mostrar un comportamiento dócil y presentaba ausencia de miedo incluso cuando era atacado por un mono agresivo (Brown & Schafer, 1888). Aunque la importancia de estos resultados no se estudiaron hasta 44 años más tarde, tuvieron una gran relevancia cuando Kluver y Bucy en los años 30 también describieron cambios similares en las respuestas emocionales en monos de experimentación después de provocar lesiones en el lóbulo temporal (Kluver & Bucy, 1937).

Pese a que en principio se entremezclan efectos de la lesión con las características que ahora le atribuimos a otras regiones del cerebro, estos fueron los primeros informes que describían la función de una región del cerebro que conecta e interrelaciona los estímulos con un significado emocional. Estos resultados se atribuyeron finalmente a una recolección anatómica y funcional de núcleos distintivos que, en su totalidad, fueron denominados con el nombre de amígdala, situada en la una región profunda de los lóbulos temporales del cerebro. Desde entonces se ha valorado el rol importante que desempeña la amígdala en la emoción y en la memoria emocional.

En 1956, Weiskrantz, experimentando con lesiones en la amígdala, demostró que se producía un deterioro en la adquisición del comportamiento en respuesta a un choque eléctrico posterior a una señal predictiva del mismo. Este es el resultado de un aprendizaje asociativo conocido como condicionamiento pavloviano. En este tipo de condicionamiento, aplicado típicamente en el laboratorio para el estudio del miedo, consta de un estímulo condicionado inicialmente neutral, emparejado con un estímulo aversivo, tal como un choque eléctrico, el cual lleva al sujeto experimental a mostrar signos de comportamiento del miedo (Janak & Tye, 2015). Este procedimiento simple de comportamiento ofrece una ventana básica para el estudio de los mecanismos de aprendizaje pavloviano que actúan con el fin de aumentar la supervivencia, y se encuentra íntimamente ligado a la función de la amígdala.

Los resultados posteriores de estudios con lesiones y las investigaciones en el campo de la electrofisiología también son consistentes con estas observaciones (LeDoux, 2003; Nishijo & Ono, 1992).

En paralelo a los primeros estudios sobre el condicionamiento del miedo, también se encontró que lesiones en la amígdala deterioraban el condicionamiento basado en recompensas. Por ejemplo, asociar una ubicación espacial ligada a los efectos reforzantes de la administración de Anfetamina (Hiroi & White, 1991). Esto vendría a indicar que diferentes lesiones en la amígdala han demostrado que puede afectar al comportamiento, ya sea por una recompensa o por una consecuencia a un estímulo nocivo.

La amígdala, además de modular el aprendizaje de eventos emocionales y procesos de atención, regula el apetito y tiene una función crítica en el procesamiento de la respuesta al estrés en reacciones tales como el temor, la agresión y la ansiedad. Esto último se ha visto reflejado en experimentos realizados en ratones a los que se les suministró un tratamiento crónico con corticosterona en el agua de bebida. Se observó que esta exposición reiterada a los GCs producía un efecto ansiogénico (Ardayfio & Kim, 2006; Karatsoreos et al., 2010). Este resultado se podía explicar debido al aumento de la actividad del CRH en la amígdala provocado por la interacción con los GCs (Makino, Gold, & Schulkin, 1994).

Aunque modesta en tamaño, la amígdala se compone de múltiples núcleos interconectados entre sí. Estos núcleos se encuentran englobados a su vez en varios complejos aunque destacaremos principalmente dos: el complejo basolateral de la amígdala (ABL o BLA, del inglés), formado a su vez por la amígdala lateral (AL o LA del inglés), basal (BA) y basomedial (BMA); y el segundo complejo, el núcleo central de la amígdala (CeA); subdividido en un núcleo lateral (CeL) y otro medial (CeM).

La entrada sensorial se transmite a través de vías talámicas y talámico-corticales a la zona basolateral y, posteriormente, al núcleo central. La amígdala basolateral es el sitio de interacción entre el sistema noradrenérgico y los GCs, mediando los efectos del estrés en la potenciación a largo plazo y consolidación de la memoria en el HP (**Figura 3**).

Como un núcleo de salida primaria, el núcleo central activa la salida de adrenalina (gracias a la interacción con el sistema noradrenérgico), así como la liberación de GCs en la glándula suprarrenal. Estas respuestas desencadenan el comportamiento de congelación/paralización

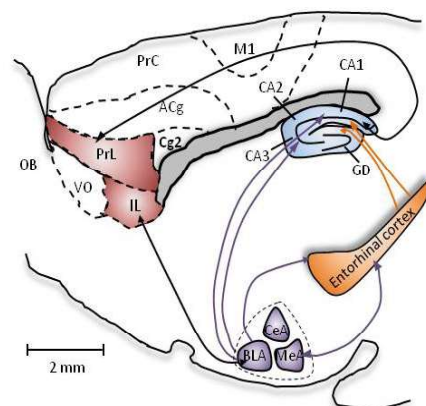


Figura 3. Conexiones entre amígdala, hipocampo, corteza entorrinal y corteza prefrontal en la rata.

(LeDoux, 2003), que ha sido relacionado con una cadena de circuitos neuronales vinculados con la supervivencia del animal. Por su parte, el núcleo central también está conectado con las áreas corticales implicadas en el procesamiento del estrés, incluyendo la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal ventromedial, y la corteza prefrontal orbital (McEwen & Gianaros, 2010).

Se ha comprobado que un nivel socioeconómico bajo, durante las primeras etapas de vida, correlaciona con un incremento en la reactividad funcional de la amígdala (Gianaros et al., 2009); además, influye también la falta de sueño (Yoo et al., 2007) e, incluso, predispone a padecer enfermedades cardiovasculares (Gianaros et al., 2008). Este último punto es debido a que la amígdala tiene eferencias a sistemas de regulación fisiológica, tales como el SNA y el sistema endocrino, volviéndose activa durante la amenaza y la incertidumbre o en enfermedades crónicas. Por lo tanto, los procesos inhibitorios son vitales para la preservación del sistema y para la salud. Estudiando la HRV se puede evaluar la funcionalidad de estos sistemas porque, concretamente, la activación del núcleo central de la amígdala (Rosenkranz, Venheim, & Padival, 2010) puede conducir a un aumento de la tasa cardíaca y a un descenso de la HRV; siendo la actividad cortical anterior la que inhibe tónicamente los circuitos que aceleran la tasa cardíaca, tomando el mayor control vagal desde el hemisferio derecho (Thayer & Lane, 2009).

Por otra parte, la excitación emocional se encuentra asociada a un descenso en la activación de la corteza anterior. Esta inactivación selectiva de la corteza prefrontal puede resultar adaptativa para facilitar conductas predominantemente no voluntarias, asociadas con estructuras neurales subcorticales tales como la amígdala. De esta manera se organizan respuestas sin la demora producida por la corteza prefrontal, que resultan más deliberativas y guiadas conscientemente (Fig. 3).

5. Factor de crecimiento de fibroblasto y moléculas de adhesión celular

5.1. El Sistema del FGF: Posible implicación en neuroprotección y su importancia en los efectos o consecuencias del estrés

Los factores de crecimiento de fibroblasto (FGFs) son una familia de 23 polipéptidos, al menos 10 de los cuales están presentes en el cerebro. Poseen múltiples funciones en el sistema nervioso central en desarrollo. Participan en procesos de neurogénesis, supervivencia y diferenciación neuronal, así como en procesos de reparación tras lesiones en la edad adulta (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003). El FGF1, implicado en neuroprotección, se expresa predominantemente en neuronas. El FGF2, importante en procesos de neurogénesis, crecimiento axonal, neuroprotección y regeneración, se expresa en neuronas y astrocitos (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003). Existen cuatro tipos de receptores para los FGFs, los FGFR1-4, que difieren en su distribución regional en el cerebro, así como en su expresión neuronal y astrocitaria (Reuss & von Bohlen und Halbach, 2003).

En el cerebro adulto, los niveles de FGF2 aumentan en el HP tras un entrenamiento en una prueba de aprendizaje espacial (Gómez-Pinilla, So, & Kesslak, 1998); y el FGFR1 parece ser crítico en la mediación de los efectos del FGF2 en los procesos de aprendizaje y memoria espacial, dado que los ratones knockout para el FGFR1 muestran un déficit en la consolidación de la memoria espacial (Zhao et al., 2007) (**Figura. 4**).

Aunque existen distintas evidencias de que el estrés y los GCs liberados durante la respuesta de estrés son los causantes directos de la modulación al alza o a la baja del FGF2, dependiendo de si se trata de una situación de estrés agudo o de unos días respectivamente, todavía no se ha estudiado cómo es la modulación del FGF2 y el FGFR1 en situaciones de estrés crónico, así como durante el envejecimiento. Se sabe que el estrés regula los niveles cerebrales de FGFs, en especial del FGF2. Así, el estrés agudo incrementa la expresión de FGF2 en todo el cerebro adulto (Bland et al., 2007; Molteni et al., 2001); mientras que dos semanas de exposición a un estrés impredecible promueve la aparición de efectos regionales, no alterando los niveles de FGF2 en el HP, pero sí disminuyéndolos en la corteza prefrontal (Fumagalli, Di Pasquale, Caffino, Racagni, & Riva, 2008). Hoy por hoy, no se sabe cómo el estrés más prolongado o una administración continuada de niveles elevados de GCs pueden modular los niveles de FGF2. A pesar de ello, hay evidencias de que los GCs podrían mediar el daño neural asociado al estrés crónico al modular la expresión del FGF2 en el SNC. Así: (i) en cerebros *postmortem* de pacientes con depresión mayor, enfermedad que cursa en un 50% de casos con hipercortisolemia, el FGF2 disminuye en algunas áreas del HP, mientras que aumenta la expresión génica del FGFR1 (Gaughran, Payne, Sedgwick, Cotter, & Berry, 2006); (ii) la modificación experimental de los niveles circulantes de GCs, ya sea induciendo una respuesta similar a la producida por el estrés agudo con la administración exógena de GCs, o mediante adrenalectomía (Chao & McEwen, 1994), muestra que los GCs ejercen un control tónico sobre la expresión del FGF2 en el cerebro.

5.2. Moléculas de adhesión celular

Por otra parte, las moléculas de adhesión celular son efectores bien conocidos en el desarrollo neuronal y la plasticidad estructural (Washbourne et al., 2004). Algunos de ellos también han sido vinculados a la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Doherty, Fazeli, & Walsh, 1995), en particular, a través de su interacción con la señalización mediada por el factor de crecimiento (Kiss & Muller, 2001). Desde este punto de vista, las moléculas de adhesión celular están siendo consideradas como posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de potenciadores cognitivos farmacológicos. Este es el caso de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Doherty et al., 1995), una proteína prominente de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), que desempeña un papel clave en el desarrollo neuronal y en la plasticidad sináptica, así como en los procesos de aprendizaje y memoria (Dityatev et al., 2004; Kochlamazashvili et al., 2010; Lüthi, Laurent, Figuero, Muller, & Schachner, 1994; Muller et al., 1996; Rutishauser, 2008; Sandi, 2004), incluyendo el condicionamiento del miedo (López-Fernández et al., 2007; Senkov et al., 2006).

La molécula NCAM se expresa como tres isoformas principales con pesos moleculares de 180, 140 y 120 kDa. Extracelularmente, todas las isoformas de NCAM contienen cinco dominios Ig y dos dominios de tipo fibronectina 3 (F3) (Walmod, Kolkova, Berezin, & Bock, 2004) (**Figura 4**). Los mecanismos por los que NCAM afecta a la plasticidad neural incluyen la activación de cascadas de señalización intracelular y la regulación de la unión célula-célula, así como la adherencia célula-matriz extracelular (Kleene & Schachner, 2004). Los procesos de adhesión están mediados en gran medida por la adición de residuos de cadenas largas de ácido siálico (ácido polisiálico, PSA del inglés) al dominio GI5 de NCAM (Rutishauser, 2008), y además incluyen tanto interacciones homofílicas como heterofílicas de NCAM (Berezin & Bock, 2004).

En trabajos de investigación con animales de laboratorio, se ha observado que el entrenamiento en tareas espaciales o contextuales producen un aumento transitorio en la expresión de NCAM en el HP (Merino, Cordero, & Sandi, 2000; Venero et al., 2006). Interferir con la función o la expresión de NCAM a través de herramientas farmacológicas o genéticas altera la función de la memoria y la LTP (Bisaz, Schachner, & Sandi, 2011; Lüthi et al., 1994). Esta evidencia señala a NCAM como un objetivo particularmente relevante para el desarrollo de fármacos potenciadores de la cognición.

Por otra parte, estudios previos con PSA-NCAM han demostrado que diferentes tipos de factores de estrés (por ejemplo, la inmovilización o el estrés variable e impredecible) pueden modular los niveles cerebrales de NCAM y PSA-NCAM (Bisaz et al., 2011; Cordero et al., 2005; Foley, Rønn, Murphy, & Regan, 2003; Murphy, O'Connell, & Regan, 1996; Murphy & Regan, 1999; Sandi et al., 2003; Touyarot, Venero, & Sandi, 2004; Venero et al., 2002; Wielgat, Walesiuk, & Braszko, 2011). Hasta la fecha, los efectos del aislamiento social a largo plazo en la edad adulta y su relación con los niveles de PSA-NCAM en el cerebro sólo se han estudiado en ratas Wistar machos (Djordjevic, Djordjevic, Adzic, & Radojicic, 2012).

Si bien la molécula de NCAM tiene cierta complejidad estructural y funcional, en los últimos años se ha logrado el desarrollo de péptidos miméticos y sintéticos de NCAM que imitan secuencias relevantes a las interacciones específicas sobre la base de la química combinatoria y los estudios estructurales (Berezin & Bock, 2004). Así, se ha observado que el pentadecapéptido FGL (Kraev et al., 2011), que abarca el dominio de interacción de NCAM con el FGFR: F y G β -capítulos y el bucle de interconexión del segundo módulo de FIII de NCAM, es crítico en la modulación de la cognición en animales de laboratorio (Cambon et al., 2004; Klementiev et al., 2007) (**Figura 4**). Así, se ha observado que la administración de FGL, *in vivo*, aumenta la memoria espacial y social en ratas (Cambon et al., 2004; Secher et al., 2006), previene el deterioro cognitivo inducido por estrés (Bisaz et al., 2011; Borcel et al., 2008) y por oligómeros de β -amiloide (Klementiev et al., 2007), y tiene efectos de tipo antidepresivo en ratas (Turner, Gula, Taylor, Watson, & Akil, 2008). Por tanto, el FGL parece actuar como un potenciador cognitivo, posiblemente mediante la participación de procesos de señalización relacionados con la interacción NCAM-FGFR y aumentando el número de receptores AMPA en la región sináptica (Knafo et al., 2012).

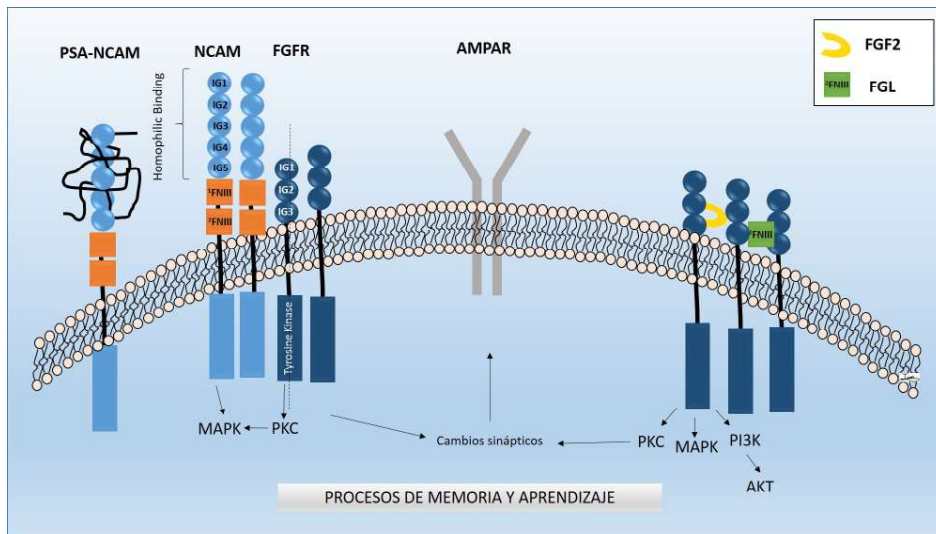
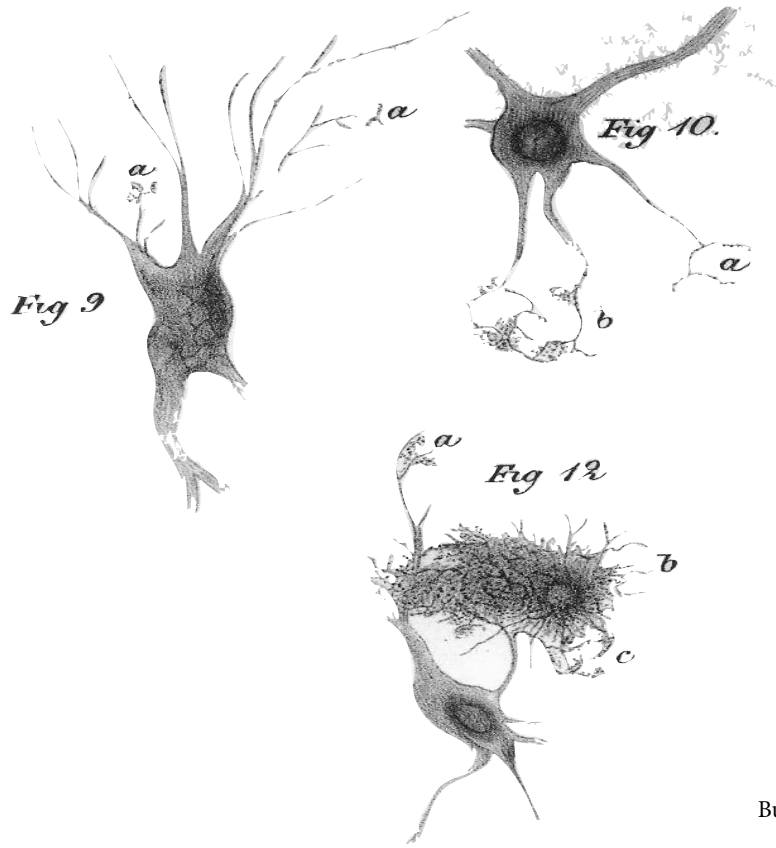


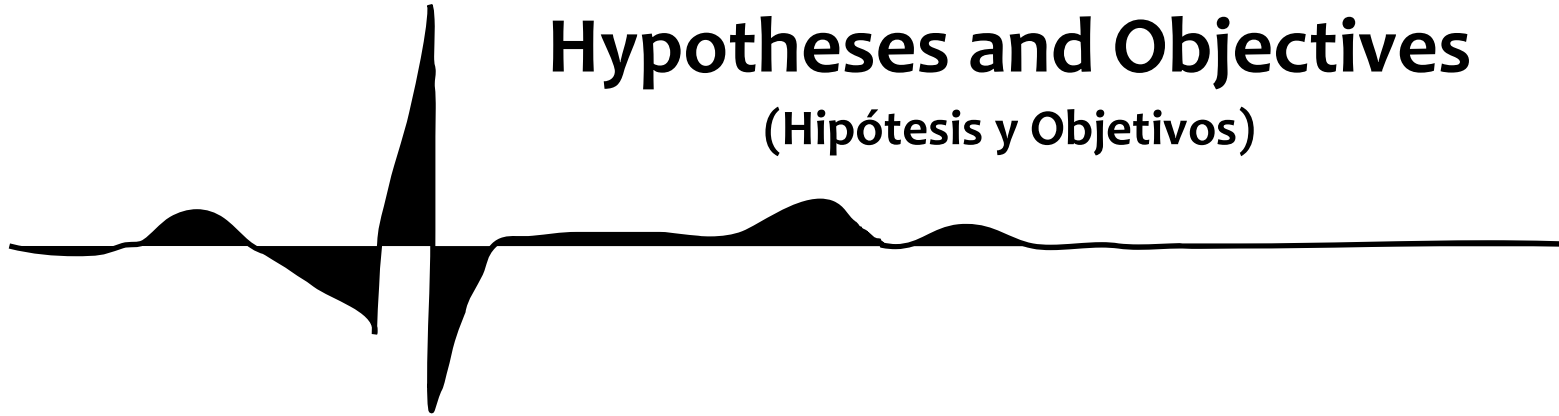
Figura 4. PSA-NCAM, NCAM y FGFR. Unión de FG2 y FGL con FGFR.



Butzke, 1872

Hypotheses and Objectives

(Hipótesis y Objetivos)



Social isolation in humans is marked by fewer quality social relationships and is aggravated after retirement, widowhood and the loss of close friends. Thus, social isolation is particularly prevalent in elderly people and an increasing problem in countries with a longer average lifespan. At present, there is epidemiological evidence indicating that social isolation is a risk factor for the development of various diseases such as cardiovascular disorders, depression, cognitive decline and even increased mortality. While many animal studies have investigated the effects of social isolation during the pre-weaning and juvenile period on behavior, only a few studies have investigated the behavioural and cognitive consequences of social isolation in adulthood or in old age. In addition, little is known about the mechanism through which social isolation exerts its detrimental effects on cognitive function. The main hypothesis of this thesis is that social isolation can be considered a stressful situation that, when occurs at late adulthood or in old age, induces changes in particular physiological and neurobiological processes affecting behavior and exacerbating age-related cognitive decline.

In order to assess this hypothesis, we used two different animal species:

Adult female degus (*Octodon degus*). This species was used for four reasons:

O. degus are highly social diurnal caviomorph rodents that, in natural conditions, live in groups (Fulk, 1976).

While in most rodents the main glucocorticoid is corticosterone, in *degus* is cortisol, as occurs in humans.

Female individuals of this species show a long estrous cycle that typically lasts 17–21 days (Mahoney, Rossi, Hagenauer, & Lee, 2011). This characteristic facilitates the design and conclusion of the study, and minimizes the problem of cycling fluctuations of hormones every four days that typically occurs over the oestrous cycle of mice and rats.

In the literature there was only one study that used age female rodents (mice), to evaluate the effects of social isolation on cognition.

Old male Wistar rats were used for three main reasons:

As we also highlighted above, there were no previous studies that investigated the effects of social isolation on cognition in old male rats.

In natural conditions, rats are social animals.

This strain of rats are commonly used in experimental research studies, being one of the main model species used in biochemical, physiological and toxicological analysis. In addition, laboratory rats allow researchers to have strict control of some variables to get reproducible results and be able to extrapolate the results to be applicable to humans (Rodríguez Martínez, Hernández Lorente, 2001).

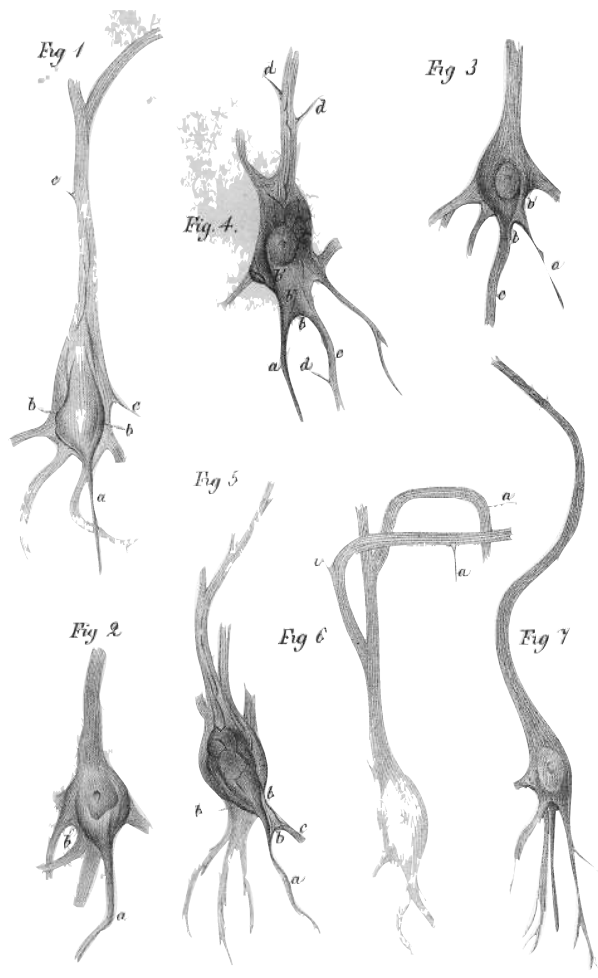
The specific aims of the present work were:

In adult female *degus*

- 1. To analyze whether chronic social isolation can affect contextual and cued fear conditioning.**
- 2. To evaluate whether chronic social isolation affects hippocampal levels of certain synaptic plasticity-related proteins involved in learning and memory processes.**
- 3. To study the consequences of chronic social isolation in the volume of specific subfields areas of the hippocampus.**
- 4. To investigate plasma cortisol levels and other blood biological markers of the stressful situation of being isolated.**

In old male Wistar rats

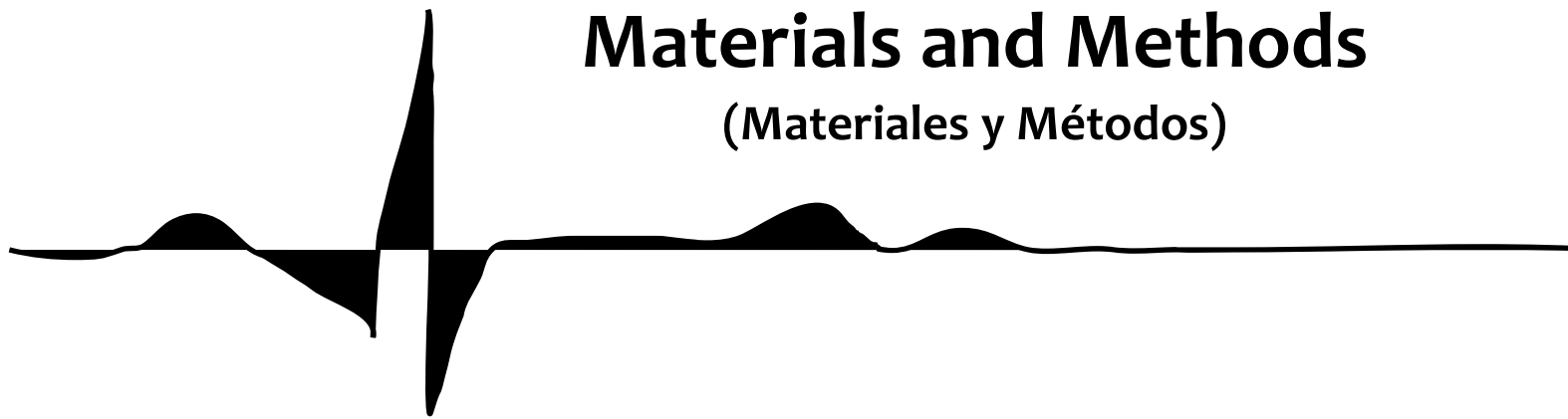
- 1. To analyze, longitudinally, whether short-term chronic social isolation can affect the activity of the autonomic nervous system and plasma corticosterone, as markers of the stress response.**
- 2. To investigate the effects of chronic social isolation on anxiety and depressive like-behavior.**
- 3. To study the consequences of exposure aged animals to short- or long- term chronic social isolation on spatial learning and memory abilities.**
- 4. To analyze the effect of submitting aged animals to short- or long- term chronic social isolation on spine density and brain volume in specific subfields areas of the hippocampus, a brain region primarily involved in certain forms of learning and memory.**
- 5. To study the effects of short- and long-term chronic social isolation on LTP induction in dentate granule cells and CA1 pyramidal cells of the hippocampus.**
- 6. To analyze how chronic social isolation affects hippocampal levels of the FGF2 system and certain synaptic plasticity-related proteins involved in learning and memory processes.**
- 7. To evaluate whether spatial memory impairment induced by chronic social isolation can be reversed by administration of FGL, a NCAM mimetic peptide that binds to the FGFR1.**



Butzke, 1872

Materials and Methods

(Materiales y Métodos)



Ethics Statement

All procedures related to animal maintenance and experimentation were performed following the European Union Council guidelines (86/609/EEC and 2003/65/ EC) and Spanish regulations (BOE 252/2005, 34367-91) for the use of laboratory animals in chronic experiments. All surgery was performed under anesthesia (Isoflurane and Urethane), and all efforts were made to minimize suffering.

Chapter 1

1. Animals

In this study we used 12 female *O. degus*, (39–44 months old at the beginning of the experimental procedure), that were obtained from the Animal Service of the University of Murcia. The animals were housed in groups of three per cage in transparent plexiglas cages (48.3 cm length x 26.7 cm width x 20.3 cm height), under a 12:12 light/dark cycle; light on from 08:00 to 20:00 h), with humidity (60%) and temperature (23 ± 1 °C) controlled conditions. The degus were fed ad libitum throughout the experiment, using a commercial rat chow (A04 rat–mouse maintenance Panlab). In captivity, degus show a life-span of 6–7 years, although some signs of aging (i.e. falls and significant Ab deposits in blood vessel walls) can already be found in 3-year-old animals. The fear conditioning was performed during the light period (09:00–15:00 h), that corresponds to their main activity phase since these rodents exhibit, predominantly, diurnal pattern with two crepuscular peaks of activity, around dusk and before lights-on (Otalora, Vivanco, Madariaga, Madrid, & Rol, 2010). Freezing behavior was recorded using a digital camera to enable subsequent evaluation by two researchers (one of them was kept blind concerning the animal groups). To avoid the effect of hormonal fluctuation in 17–21-day regular cycling females, animals were trained in the fear conditioning in a period that corresponds to the diestrous phase of the oestrous cycle. All procedures related to animal maintenance and experimentation were in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the guidelines issued by the Spanish Ministry of Agriculture, Fishing and Feeding (Royal Decree 1201/2005 of October 21, 2005) and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee. Efforts were made to minimize the number of animals used, as well as their suffering.

2. Experimental groups and design

At the age of 39 months, the animals were divided into two homogenous groups: individual-housed (N = 6) and group-housed (N = 6). Cardboard panels to avoid visual contact separated the individual cages. After maintenance during six months and a half in these conditions, we observed

that two animals (one isolated and one group-housed) showed eyelid drooping. These animals were excluded from the experimental design since contextual fear conditioning requires a proper functioning of vision that allows animals to recognize the context. Animals were sacrificed 45 days after fear conditioning in order to avoid the possible modulation of biological markers after training. During this period, animals were kept housed in the same conditions as before (individually or grouped-housed) (**Figure 7**).

2.1. Delay fear conditioning

The animals were handled for 2 min daily for 3 days before being trained to the fear conditioning for habituation to experimental manipulations. Conditioning and testing took place in a rodent observation cage using a shock generator (model LI100-26 Shocker, LETICA I.C., Madrid, Spain). The observation cage (30 x 37 x 25 cm) was placed in a sound-attenuating chamber. The side walls of the observation cage were constructed of stainless steel and the back walls and doors were constructed of clear Plexiglass. The floor consisted of 20 steel rods through which a scrambled shock from a LETICA I.C. (Spain) shock generator (Model LI100-26 Shocker) could be delivered. The observation cage was cleaned with a 0.1% acetic acid solution before and after each session. Ventilation fans provided a background noise of 68 dB and a 20W white light bulb illuminated the chamber.

On the conditioning day each animal was transported from the colony room to the laboratory (situated in adjacent rooms) and placed in the conditioning chamber. After 160 s three tone-shock pairings were delivered with an inter-shock interval of 60 s. The tone (85 dB sound at 1000 Hz) was presented for 20 s and at the end of each tone an electric foot shock was delivered (1 s, 0.4 mA, constant current). The rodents were removed from the conditioning chambers 30 s after the final shock presentation, and returned to their home cages. Thus, a conditioning session lasted 330 s. Testing for contextual fear conditioning was performed 1 day after conditioning. At testing, degus were placed back in the same chamber as used for conditioning but in the absence of shock or tone, for an 8 min context test. Testing for auditory fear conditioning was performed 2 days after conditioning. Female *degus* were placed in the absence of shock in a novel context (same cages but with different walls, floor and background odor) in the absence of the conditioning tone (3 min; pre-tone period) and then re-exposed to the tone (5 min; tone period). Using a time-sampling procedure the behavior was evaluated in each experimental session and each animal was scored blindly as either freezing or active every 2 s. Freezing was defined as behavioral immobility except for movement required for breathing. This freezing response is considered as a fear index. At conditioning, behavioral scores were noted for the 3 min period prior to shock (pre-shock period) and for the 2.5 min period starting immediately after presentation of the first shock (post-shock period). Scores for each of these periods were analyzed separately. At testing for auditory fear conditioning, the scores for the pre-tone and tone periods were also considered separately. At testing for contextual fear conditioning, the scores for the total 8 min context test were analyzed.

2.2. Foot shock sensitivity test

To assess if social isolation modified the sensitivity to foot shocks in our experimental conditions each animal was placed individually in a conditioning chamber different to that used for conditioning. After 120 s each degu received an ascending series of 1 s foot shocks, separated by 20 s, in 0.05 mA increments from 0 mA until the animal showed the first signs of discomfort and pain (defined as the animal's paws leaving from the grid floor, jumping and showing or evidencing vocalizations, scored as jump). The shock intensity that elicited this reaction was assessed.

3. Tissue processing

Immediately after decapitation, the brain was removed and split into the two hemispheres. The left hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h. Both hemispheres were removed and saturated in sucrose gradient solutions (10%, 20%, 30%) for a total of 48 h. Whole series of 40 μm thick coronal sections were cut in a vibratome Leica VT1000S, cryoprotected and frozen in -20°C . Subsequently, sections were stained with cresyl violet and mounted on histological glass slides with DPX mount (Sigma).

Anatomical boundaries of the hippocampal formation and CA1 and CA3 subfields were distinguished under light microscope according to the degus brain atlas (Wright & Kern, 1992).

The right hemisphere was kept on ice, the hippocampus was dissected out and rapidly frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were coded and stored at -80°C until use.

3.1. Hippocampal volumetric analysis

Cresyl-violet serial sections of the left-brain hemisphere were used to determine volume of the left hippocampus using a Leica DRIV microscope equipped with a MicroFire digital camera (Optronics) and a motorized stage using a 20x objective lens. The hippocampal volume was calculated, with assistance from StereoInvestigator software (Micro-BrightField), according Cavalieri's estimator; $V_{\text{ref}} = T \times \Sigma A \times 1/\text{ssf}$, where T is the mean thickness of the vibratome section (40 μm), A is the area of hippocampus and ssf is section-sampling fraction ($1/\text{ssf} = 10$).

4. Blood sampling procedure and measurements

Animals were sacrificed by rapid decapitation, and trunk blood was collected into sodium-heparinized or EDTA-containing tubes to prevent coagulation. Blood samples collected in EDTA-containing tubes were used to determine hematological parameters immediately after sampling. The remaining blood samples collected in heparinized tubes were centrifuged for 15 min at 4 °C to 2026g. The plasma obtained was stored at -80 °C until cortisol analysis was carried out.

4.1. Blood cell analysis

Hematological parameters were measured using an automatic hematology analyzer (Abacus Junior Vet; CVM S.L., Navarre, Spain). Analyzed hematological variables were white blood cells (WBC), lymphocytes (LYM), monocytes (MID), granulocytes (GRA), red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDWc), platelet count (PLT), platelet percentage (PCT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDWc).

4.2. Plasma cortisol measurement and adrenal weight

Plasma cortisol was measured using an ELISA (DRG Instruments GmbH, Germany) with a sensitivity of 2.5 ng/mL. The left and right adrenals were weighed together. All values represent absolute (mg) or relative (mg organ weight/g body weight) weights.

5. PSA-NCAM measure

PSA-NCAM was quantified by enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA). Briefly, flat-bottomed 96-well microplates were allowed to adsorb a coating solution (Na₂CO₃ 0.1 M/NaHCO₃, 0.1 M) for 2 h at room temperature. The solution was removed and 50 µl of pellet samples added at a concentration of 10 lg/ml to each well of polystyrene flat-bottomed ELISA plate. Plates were incubated overnight at 4 °C and then washed three times with 1 M phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20, pH 7.4. Additional binding sites were blocked with bovine serum albumin (BSA) (3%) for 2 h at room temperature. The wells were rinsed three times as described above, and incubated with 50 µl aliquots of a monoclonal mouse IgM antibody (AbCys) at a dilution (1:300) for 20-24 h at 4°C. Then, the wells were washed and 50 µl aliquots of peroxidase-conjugated second antibody were added for a 2 h incubation period. Afterwards, 50 µl of citrate buffer (50 mM Na₂HPO₄, 25 mM citric acid, pH 4.5) containing 1 mg/ml o-phenylenediamine and 0.06% H₂O₂,

added just before use, was placed in each well, and the peroxidase allowed to react for 10 min at room temperature. The reaction was terminated by the addition of 50 μ l of 5 N H₂SO₄ to each well. The optic density was determined by measuring absorbance at 492 nm with a Microplate Reader (DigiScan Reader V3.0 and DigiWIN software Program; ASYS Hitech GmbH, Austria).

6. Data analysis

All results were expressed as mean \pm SEM. Differences between isolated and group-housed animals were analyzed using Mann Whitney test. Significance was accepted at $p < 0.05$.

Chapter 2

1. Animals

In this study we used old male Wistar rats, 20 months old and 18 month old divided in seventh experimental groups with the respective design for behaviour and cognition, telemetry studies, neuronal injection, electrophysiology or biochemical described in results. All the rats were sacrificed with 21 months old approximately. The rats were purchased at 3-4 months age from Harlan, Barcelona and kept in the animal house till they reached the above stated ages for the start of experimentation. Animals were housed in groups of two per cage in transparent Plexiglas cages (48.3 cm length x 26.7 cm width x 20.3 cm height).

All the animals were kept under a 12:12 light/dark cycle; light on from 08:00 to 20:00 h, with controlled humidity (60%) and temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Food and water were available *ad libitum*.

2. Social stressor procedure

The rats for the stress group were isolated and housed in individual shadow boxes (48.3 cm length x 26.7 cm width x 20.3 cm height) during one (20 months old) and three months (18 months old) respectively. Simultaneously, control animals were housed in groups of two per cage in the same conditions, but in transparent Plexiglas cages (both groups with the same size).

3. Behavioural testing

Behavioural and cognitive tests were performed during the light period (09:00–15:00 h) to avoid the influence of circadian hormonal fluctuations and were recorded using a digital camera to enable subsequent evaluation.

3.1 Elevated plus maze

Anxiety-related behavior was evaluated using the plus-maze test. The plus-maze consists of two opposing open arms (45 × 10 cm) and two enclosed arms (45 × 10 × 50 cm) that extend from a central platform (10 × 10 cm), elevated 65 cm above the floor. The rats were placed individually on the central platform facing an enclosed arm and were allowed to freely explore the maze for 5 min. The movements of the rats were automatically registered and analyzed with a computerized tracking system (Ethovision 1.90, Noldus IT, Wageningen, Netherlands). Entry into an arm was defined as entry of all four paws into one arm. The time spent in the open and closed arms, as well as the number of times the animal entered each type of arm and the latency before entering an open arm for the first time were recorded.

Animals were handled daily for 3 days before being tested in the elevated plus-maze (EPM).

3.2 Morris Water Maze

The water maze was a black circular pool (2 m diameter, 45 cm high) filled with water (30 cm depth, at 24 °C). The pool was divided into four quadrants of equal size. An invisible escape platform (11-cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants (1.5 cm below the water surface) equidistant from the sidewalls and the middle of the pool. The testing room contained numerous maze cues. The behavior of the animal was monitored by a video camera mounted on the ceiling above the center of the pool and a computerized tracking system (Ethovision 1.90, Noldus IT, Wageningen, Netherlands).

The MWM task was performed with three successive steps. The acquisition phase was divided into 3 training sessions (day 1–3) and one probe trial (day 4). During training sessions, the platform was hidden to develop spatial learning. Each rat received three 90s trials per day with 60s inter-trial intervals. All animals were left on the platform for 30s and then removed from the pool for a 30s rest period, after which the next trial commenced. The starting points were semi-randomized so that each trial started from a different quadrant. If the rat did not find the platform within 90s, the experimenter gently guided the animal to the platform. In this case, 90s was recor-

ded as the escape latency. A 60s probe session (day 4), during which the platform was removed, was performed 24 h after the last trial of the learning period.

The same procedure was applied for the reversal phase in which the hidden platform was located in the opposite quadrant during training sessions (day 4). And finally, for the working memory the hidden platform was located in different parts of each quadrant during training sessions (day 5 to day 7, 2 trainings per day). For this test, each animal was left on the platform for 15s and then removed from the pool for a 15s rest period, till next trial commenced.

Different parameters of rats performance were analysed: latency or total time that rats need to find the platform (sec); total distance swum to reach the platform (cm); swim speed (cm/sec); and, during the transfer test, the percentage of time spent by the rat swimming in each quadrant (analyses performed on the percentage of time spent in the quadrant in which the platform was placed at training).

3.4 Porsolt Forced Swim Test

The forced swim test is a 2 day test wherein rats swim under conditions in which escape is not possible. The rats are forced to swim for 5 minutes on each of the days. Briefly, rats were placed in a transparent plexiglass cylinder (height = 50 cm, diameter = 30 cm) containing tap water, maintained at 24 ± 1 °C, at a depth of 30 cm in order to adjust for larger rats. Care was taken so that the rats could not use their tail or hind legs to maintain immobility.

Floating was defined by the absence of any movement except minor adjustments to maintain floating.

4. Blood Sampling Procedure: Plasma corticosterone measurement

Basal plasma samples to measure corticosterone were obtained between 9:00 and 10:00 am a week before starting any previous week or in the afternoon between 7:00 and 7:30 pm. Each animal was transferred individually from the animal facility to a nearby room, covered with a cloth and gently held in place, and small cut was issued on the tail.

To measure plasma corticosterone levels, approximately 300 µl of blood were collected in tubes impregnated with sodium heparin (Microvette; Sarsted). Afterwards, the tubes were centrifuged at 3000 r.p.m. for 15 minutes at 4 °C and the supernatant was collected and stored at -80 °C for later determination.

5. Neuronal injection

Animals were deeply anesthetized with tribromoethanol and transcardially perfused with phosphate buffer (PB) (0.1M, pH7.4) followed by PB+4% paraformaldehyde. The brains were removed and post-fixed in the same solution for 24 h. Coronal sections (150 μ m) were cut on a vibratome (Leica VT1000S) and, immediately, hippocampal neurons (CA1 and DG area) were individually injected with Alexa 594 (Invitrogen, Eugene, OR) by passing a steady hyperpolarizing current through the electrode (-0.5 to -1.0 nA). The current was applied until the distal tips of each neuron fluoresced brightly. The sections were mounted on a glass slide in fresh ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Eugene, OR). Slides were left for 24 h in the dark at room temperature for the mounting medium to cure, and the coverslip was then sealed with nail polish. Images were obtained with a confocal microscope (Zeiss LSM510 Meta) and 1 dendrite of 5 different neurons from *stratum oriens* was scanned from the soma (105 Neurons from CA1 and 110 from DG). The image stacks (physical size 45 x 45 μ m, logical size 1024 x 1024 pixels) consisted of 100-200 image planes and a 63 x glycerol-immersion were used with a calculated optimal zoom factor of 3.2 and a z-step of 0.14 μ m. For each stack, the laser intensity and detector sensitivity were set so fluorescence signal from the spines occupied the full dynamic range of the detector. This meant that some pixels were saturated in the dendritic shaft, but no pixels were saturated within the spines.

Dendritic spine density was determined by tracing the image of the acquired dendrites in three dimensions with NeuroLucida (MicroBrightField Inc., Williston, VT). All protusions were considered spines, applying no correction factors to the spine counts. The reconstructed data were exported to NeuroLucida Explorer (MicroBrightField Inc., Williston, VT,) for quantitative analysis, and the spine density was automatically calculated by dividing the number of spines by the dendrite length. Spines were also analyzed as a function of its distance from its origin (*Sholl analysis*).

6. Stereology

A group of animals transcardially perfused with phosphate buffer followed by 4% paraformaldehyde (0.1M, pH7.4) was used for this analysis. The extracted brains were fixed using 4% paraformaldehyde for 48 h. Subsequently, brains were saturated in sucrose gradient solutions (10%, 20%, 30%) for a total of 48 h. Serial sections (40 μ m, every 10th section) of whole series of coronal sections were cut in a vibratome Leica VT1000S, cryo-

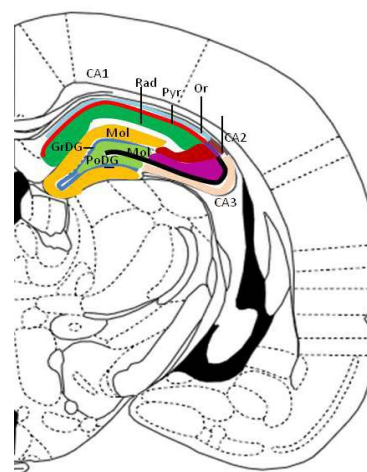


Figure 5. Coronal rat brain. Coordinates of hippocampal region -3.80mm Bregma. It is subdivided in Granular layer (blue) and Molecular layer (yellow) of Dentate Gyrus, and Radiatum (Rad), Pyramidal (Pyr) and Oriens (Or) of CA1, CA2 and CA3. Modified from Paxinos and Watson, Atlas of 1998.

protected and frozen in -20°C. Subsequently, sections were stained with cresyl violet and mounted on histological glass slides with DPX mount (Sigma).

6.1 Volumetric analysis of the hippocampal structure

The slices were taken for stereological quantification of volumes of the different hippocampal sub-regions (Granular layer and Molecular layer of Dentate Gyrus, and Radiatum, Pyramidal and Oriens layers of CA1, CA2 and CA3) (**Figure 5**). The above sub-regions were distinguished according to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998) using a light microscope (Leica DRIV microscope equipped with a MicroFire digital camera (Optronics) and a motorized stage using a 5x objective lens. The volume was calculated, with assistance from StereoInvestigator software (Micro-Bright-Field), according Cavalieri's estimator; $V_{ref} = T \times \Sigma A \times 1/ssf$, where T is the mean thickness of the vibratome section, A is the area and ssf is section-sampling fraction ($1/ssf= 10$).

7. Telemetry

7.1 Surgery, HR measurements, and data evaluation using Radio-telemetric probe implantation

ECG transmitters (Data Sciences, TA11CTAF40, St. Paul, MN, USA) were implanted into abdominal cavity with two electrodes used to record the ECG. The ECG transmitter was placed subcutaneously, and tightly sutured to muscles at the level of the last rib left, and under the right armpit (Stiedl & Spiess, 1997). ECG were extracted utilizing subcutaneously placed electrodes located in line with the long axis of the heart. One electrode is placed in the upper right quadrant of the chest and the other in the lower left quadrant of the chest in the rat. The upper right electrode can be placed just below the pectoral muscles against the rib cage near the first interspace. In the rat, the lower left electrode is placed within the muscle tissue in the lower left abdominal wall, just cranial to the groin area.

Implantation was performed at an age of 18 months old. The surgery was done in aseptic conditions and under anesthesia (Isoflurane) and received antibiotic (gentamicin 5mg/kg s.c.) at the end of surgery and animals were allowed to recovery over 1 week before measurement of heart rate, activity and body temperature. Before the recovery period the animals were handled to habituate them to the experimenter.

7.2 Data collection and analysis

Three parameters were concurrently measured; cardiovascular heart rate (HR), locomotor activity and body temperature.

HRs were automatically recorded by the radiotelemetric probes, using the ART gold software (Data Sciences International) running on a PC computer. They were sampled every 1 min from 10s time windows during 24 hours for the register and for the behavior every 1 min from 2s time windows of the register. Activity was a continuous measure of body movements, which was automatically tracked by the software from changes in orientation of the probes. Body temperature was also automatically tracked every 10 s from those probes that had a thermometer inside (C50-PXT, n = 14/10). All these parameters were later averaged over 1 min periods. In addition to those three automatic measures, an experimenter manually recorded the time spent freezing.

7.3 Telemetric testing every week and in the Elevated Plus Maze and the Porsolt forced swim test

The subjects were recorded for 24 hours in the home cage once every week for 5 weeks. One recording was done 1 week prior to the beginning of the experiment in order to obtain a baseline control value.

The EPM was done in conditions described above following the end of the experimental period; HR, activity and body temperature were recorded during the test.

Finally, animals underwent the forced swim test described earlier and video and telemetric data were collected for first and second days using the same procedure as above.

8. Electrophysiology

Experiments were performed on urethane-anesthetized (1.6 g/kg i.p.) 20 month old Wistar rats. Urethane was used because, unlike other drugs (e.g., barbiturates) (Nicoll, Eccles, Oshima, & Rubia, 1975), it appears to have little effect on GABAergic inhibition in the rat dentate gyrus (Shirasaka & Wasterlain, 1995) and the EEG pattern is similar to a natural slow sleep. Local anesthetic (lidocaine 1%) was applied to all skin incisions and supplemental doses of anesthetic were given to maintain areflexia. Animals were placed in a Kopf stereotaxic device in which surgical procedures and recordings were performed. The body temperature was maintained at 37 °C with a heating platform. Holes were drilled through the skull, and electrodes were directed to the dentate gyrus

Materials and Methods

(DG: -3.3 mm posterior, 2.0 mm lateral and 3.5 mm deep, relative to Bregma) and to the perforant pathway fibers and -3.3 mm posterior, 0.5 mm lateral and 4.0 mm deep for the stimulating electrode. CA1: -3.3 mm posterior, 1.5 mm lateral and 3.0 mm deep for the recording electrode activated the Schaffer collaterals pathway and -3.3 posterior, 3.0 mm lateral and 3.5 mm deep for the stimulating electrode (**Figure 6**).

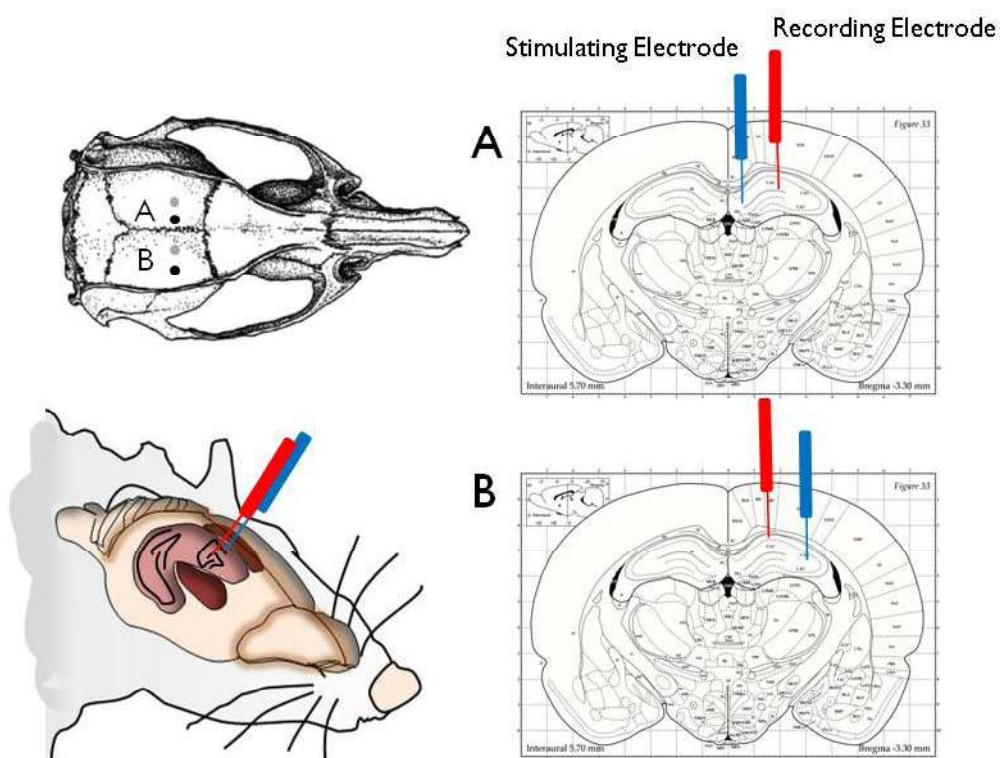


Figure 6. Wistar rats were mounted on a stereotaxic frame and trephine holes were drilled in the skull at preselected coordinates: GD (AP, -3.3; L, 2; D, 3.5) (A) and CA1 (AP, -3.3; L, 1.5; D, 3) (B) Modified from Paxinos and Watson, Atlas of 1998. Controls (n=7), STI (n=6), LTI (n=5).

Field potential was obtained using 120 μm thick nichrome macroelectrodes ($<1\text{ M}\Omega$). Signals were filtered (0.3 Hz to 1 KHz), amplified in a P15 preamplifier (Grass Instruments) and fed into a personal computer (sample rate 10 kHz) with the temporal references of the stimuli for off-line analysis with Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). The perforant pathway was stimulated by a bipolar electrode (World Precision Instruments). The intensity was set as the double of the threshold intensity to elicit a response (10-50 μA).

The experimental protocol consisted in a control period for a 10 min duration to ensure a stable activity where the perforant pathway was stimulated at 0.5 Hz. To induce LTP, a tetanic stimulation of the perforant pathway was delivered as three stimulation trains of 100 Hz frequency stimulation during 500 ms. Trains were separated by 2 seconds. After the tetanic stimulation train the perforant pathway was stimulated again at 0.5 Hz during 30 minutes.

The average of the evoked field potential was calculated every minute (30 stimuli). The slope of the evoked field potential was measured and was plotted considering 100% the mean slope during the control period.

9. Biochemical analysis

For this experimental group, the brain was removed immediately after decapitation. One hemisphere was kept on ice, the hippocampus and PFC were dissected out and flash frozen in liquid nitrogen. Tissue samples were coded and stored at -80 °C until use.

9.1 Preparation of homogenates and synaptosomes (*Chapters 1 and 2*)

Biochemical isolation of crude synaptosomes was carried out essentially as previously described (Carlin, Grab, Cohen, & Siekevitz, 1980). Briefly, hippocampus from old rats was homogenized in a Dounce glass homogenizer with buffer (0.32 M sucrose, 4 mM HEPES, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol and a cocktail of protease inhibitors from Roche—‘Complete Mini EDTA-free’). This homogenate was spun down at 1400 g for 10 min at 4°C. The supernatant was kept and the pellet was resuspended in buffer A and spun again at 700 g for 10 min at 4°C. Both supernatants were mixed and spun down at 13 800 g for 10 min at 4°C. The pellet (crude synaptosomal fraction) was resuspended in the buffer. Protein amount was quantified by Bradford and analysed by PAGE–SDS and western blot. Images were analysed using NIH Image J software.

9.2 Quantification of NCAM isoforms, NR1 and GluR1 by Western blot (*Chapters 1 and 2*)

The three major NCAM isoforms; NCAM120, NCAM140 and NCAM180, and the NMDA receptor subunits NR1 and NR2B and AMPA subunit GluR1 were measured in crude synaptosomal preparations using Western Blotting. In brief, hippocampal synaptosomal samples from each rat were incubated overnight at room temperature with Endo-N (AbCys) (final dilution 1:120) in order to selectively cleave the PSA moiety of NCAM. The reaction was then stopped by denaturation of samples at 100 °C for 2 min in 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 0.05% SDS and 2% b-mercaptoethanol. Equal amounts of protein (15 µg) were applied in each lane, separated on 7% (w/v) SDS–PAGE and transferred (1 mA/cm², 1 h) to an Immobilon-P membrane (Amersham). After saturation of the non-specific sites with 5% (w/v) skimmed milk in 50mM Tris–HCl, pH 8, 138mM NaCl, 0.05 % Tween 20 (TBST) the blots were incubated for 1.5 h at room temperature with the corresponding antibody; a polyclonal rabbit anti-rat NCAM (1:15,000), mouse anti-NR1 (1:3000) (Millipore) or goat anti-NR2B (1:1000) (Santa Cruz). The blots were washed with TBST, incubated for 1 h with the corresponding secondary antibody; an anti-rabbit Ig peroxidase conjugate for NCAM (whole molecule conjugate; diluted 1:20,000; Sigma, UK and Spain), anti-mouse or anti-

goat Ig peroxidases conjugates (1:10,000) (Santa Cruz). Finally, western blots were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham). All blots were reprobated with a β -actin antibody and the signal value was normalized to that of b-actin. For the quantification of autoradiographic films, images were captured by high-resolution (600 X 600 dpi), 8 bit (256 grey levels) microdensitometry with a flatbed scanner (AGFA Arcus II). Videoimages of the autoradiographs were converted to grey values and analyzed for optical density measurements using image analysis software (LeicaQwin).

9.3 ELISA

PSA-NCAM, FGF2, corticosterone and FGFR1 levels were quantified by enzyme-linked immuno absorbent assays (ELISA). PSA-NCAM hippocampal levels were quantified using an ELISA (AbCys Eurobio, Francia) charging 10 μ gr/prot per well. Evaluation of FGF2 hippocampal levels was done using an ELISA kit (NeoBiolab, Massachusetts, USA) charging 5 μ gr/prot per well. FGFR1 hippocampal levels were quantified using ELISA (Elabscience, Wuhan, P.R.C.) charging 30 μ gr/prot per well. Evaluation of plasma corticosterone levels was performed using an ELISA (DRG Instruments GmbH, Germany) with a sensibility of 2.5 ng/mL. The optic density was determined by measuring absorbance at 450 nm with a Microplate Reader (Digi-Scan Reader V3.0 and DigiWIN software Program; ASYS Hitech GmbH, Austria).

10. In vivo FGL Treatments

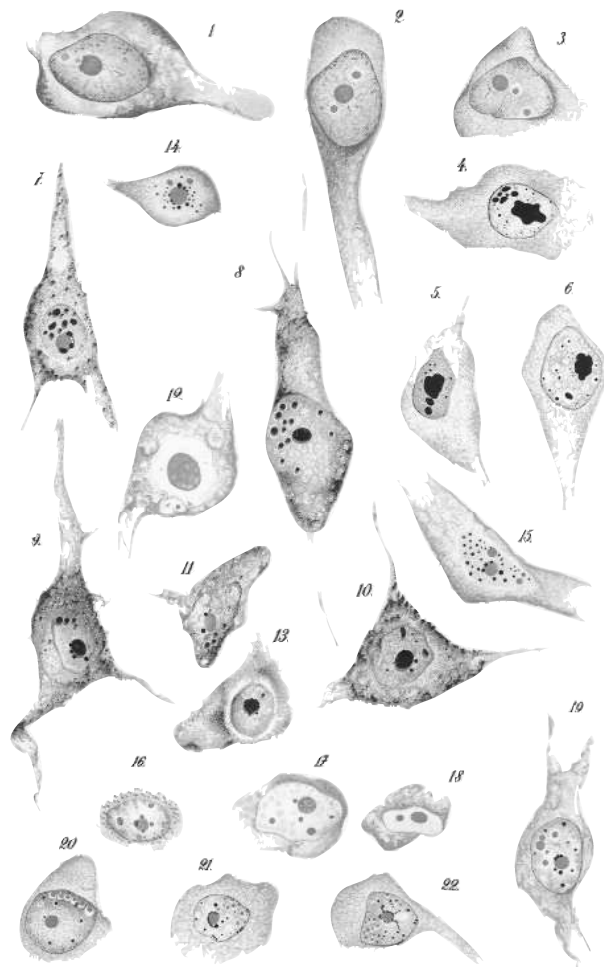
10.1 Subcutaneous FGL administration

Twenty-one month old male Wistar rats (600-700g) were subcutaneously injected with FGL (6.6 mg/kg body weight) or vehicle (0.9%NaCl). The pharmacological treatment began three months after social isolation started, and was administered every two days during twelve days before training in the Morris water maze and maintained during behavioral testing until one month. Animals were sacrificed after the end of the pharmacological treatment.

11. Data Analysis

Statistical analyses were performed with SPSS version 15.0. Generalized linear models (McCulloch & Searle, 2001) and generalized linear model repeated measures analysis (generalized estimating equations models, GEE) (Hardin & Hilbe, 2003) were used where appropriate. In all cases, if a statistically significant interaction was found, additional pairwise comparisons (Bonferroni sequential adjustment) were made and the method of estimation was the maximum likelihood (ML). Normality distribution and identity as a link function was always used. In all cases, the significance

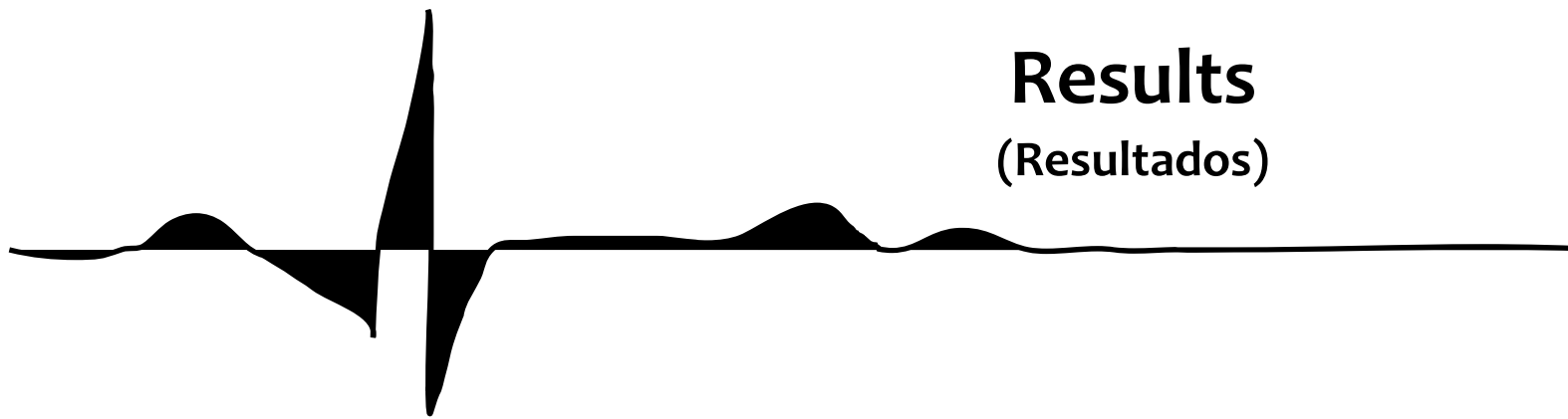
of the effects was determined by the Wald X^2 statistic. Student's t test was also used when appropriate. Data are presented as mean \pm SEM and statistical significance was set at $p < 0.05$. Detection of outliers was performed and, when necessary, they were removed from analyses.



Pilotti 1914

Results

(Resultados)



CHAPTER 1

Chronic Social Isolation in adult female Octodon degus

Experimental design

In this study, we used adult female *Octodon degus* to investigate the effects of long-term social isolation (6½ months of social isolation) on contextual and cued fear conditioning, and the possible modulation of the synaptic levels in the hippocampus of NCAM and PSA-NCAM and other proteins related with learning and memory. Furthermore, we analyzed volume changes in the hippocampus after long-term social isolation and body weight gain, granulocytopenia and plasma cortisol levels affection like so adrenal weight after sacrifice. Animals were randomly assigned to either living alone or to stay with the same home-cage three *degus* (control), before the experimental procedure was (Figure 7).

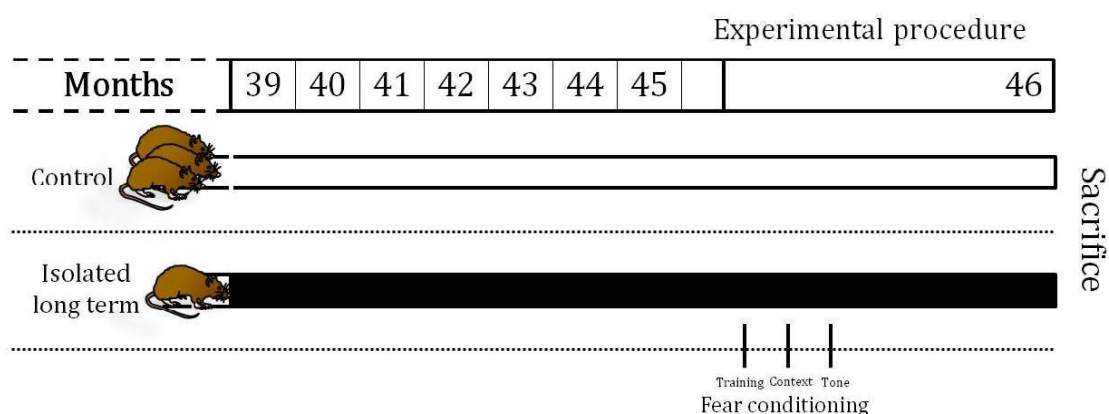


Figure 7. Twelve female *O. degus*, (39–44 months old at the beginning of the experimental procedure) were used. Animals were housed in groups of three per cage in transparent plexiglas cages. Fear conditioning was performed during the light period (09:00–15:00 h).

1. Reduced post shock freezing at fear conditioning training

We tested the **auditory fear conditioning** in these *degus* using immobility (freezing) as an index of fear learning (Blanchard & Blanchard, 1969). During conditioning training, baseline-freezing behavior was extremely low in isolated and group-housed animals ($p = 0.222$; **Figure 8A**). Freezing behavior during conditioning was statistically lower in isolated animals compared to group-housed female *degus* ($p = 0.046$, **Figure 8**).

2. Social isolation reduces contextual, but not auditory, fear memory

One day after fear conditioning training, female *degus* were placed inside the original conditioning chamber and tested for **contextual fear conditioning**. Isolated animals showed lower freezing levels in contextual fear memory as compared to group-housed *degus* ($p = 0.032$; **Figure**

8B). With purpose to test the auditory cued fear memory, two days after conditioning, the animals were exposed to the new context. Freezing levels in the auditory testing boxes before tone reappearance remained low in both groups, indicating that the new context differed significantly to the original context and was not recognized by the animals. No significant differences were found between groups during tone exposure in this memory test ($p = 0.151$; **Figure 8C**). Importantly, measurement of pain threshold did not reveal differences between groups (grouped: $0.70 \pm 0.08\text{mA}$; isolated: $0.08 \pm 0.10 \text{ mA}$; $p = 0.265$). Together, these results indicate that social isolation of female *degus* at adulthood impairs contextual, but not auditory-cued, fear conditioning memory.

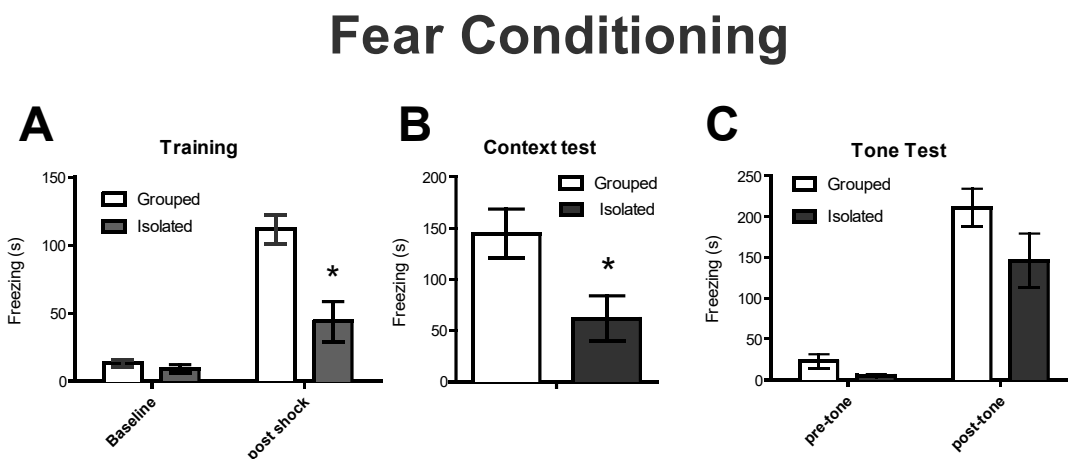


Figure 8. Fear conditioning. (A) Time that *degus* spent freezing during the pre-tone and tone-shocks pairings periods at training in the fear conditioning. (B) Freezing time during the test to the context. (C) Freezing responses on the auditory-cued testing day before and during the presentation of the tone. Isolated female *degus* displayed significantly lower freezing levels during the context test than grouped-housed animals.

Data are the median \pm interquartile range from 5 *degus* per group. $P < 0.05$.

3. Synaptic content of PSA-NCAM, but not NCAM, is down regulated in the hippocampus of socially isolated female *degus*

Western blot assays were performed to evaluate the relative amount of the three main NCAM isoforms in hippocampal crude synaptosomes, using an antibody that recognizes all NCAM isoforms. No significant differences were found between groups in any of the main NCAM isoforms; **NCAM120** ($p = 0.916$), **NCAM140** ($p = 0.963$) and **NCAM180** ($p = 0.841$; **Figure 9A**). **Synaptic PSA-NCAM** levels in the hippocampus were evaluated by ELISA, and significant reduced levels of PSA-NCAM were detected in hippocampal synaptosomes of individually housed female *degus* compared to group-housed animals ($p = 0.047$; **Figure 9C**). In order to investigate whether this effect was restricted to synaptic contacts or it was a general effect of isolation on polysialylation of NCAM in the hippocampus, we also measured PSA-NCAM in whole hippocampal homogenates, but no significant differences were found between both groups ($p = 0.917$; **Figure 9D**).

4. Social isolation does not affect synaptic levels of NR1 and NR2B subunits of the NMDA receptor in the hippocampus

Given that PSA-NCAM can interact with NMDA receptor, we decided to investigate whether long-term social isolation modulated NR1 and NR2B subunits of the NMDA receptor. Compared to group-housed animals, isolated female *degus* showed similar synaptic hippocampal levels of NR1 ($p = 0.341$) and NR2B ($p = 0.712$) subunits.

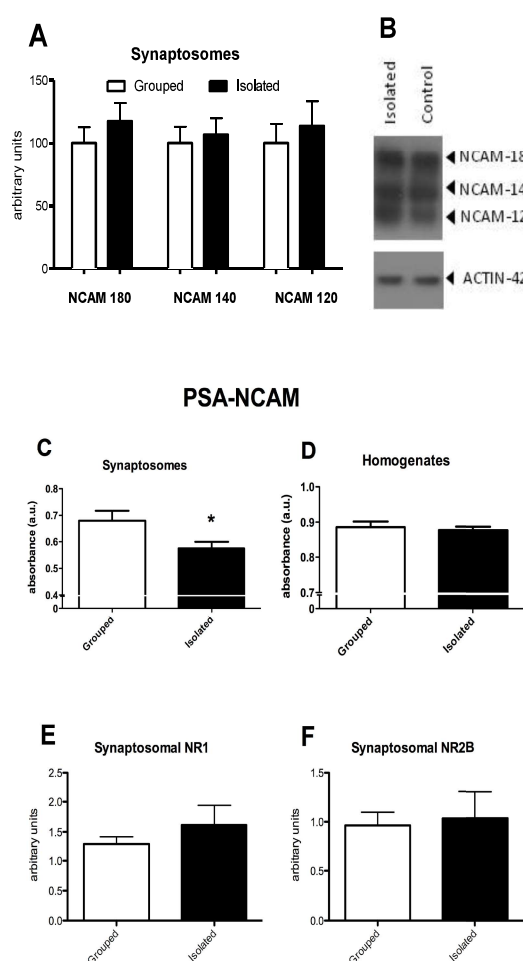


Figure 9. (A) Effects of chronic social isolation on the expression of the three major NCAM isoforms (NCAM-120, -140, and -180) in hippocampal synaptosomes. (B) Immunoblotting of the three major NCAM isoforms in representative hippocampal synaptosomes samples from an isolated and a grouped-housed *degus*. (C) Effects of social isolation on hippocampal PSA-NCAM levels in synaptosomes, or homogenates (D).

Data are the median \pm interquartile range from 5 *degus* per group. $p < 0.05$.

5. Hippocampal CA1 volume is reduced after social isolation

We used the Cavalieri's method on Cresyl-violet stained serial sections to estimate **hippocampal volume**. Statistical analysis indicated no significant differences in the whole hippocampal volume between isolated and group-housed female *degus* ($p = 0.421$; **Figure 10A**). Since it is possible that regional specific changes in some areas of the hippocampus may be overlooked when analyzing the whole hippocampal formation, we decided to analyze the volume of two specific subfield areas of the hippocampus involved in fear contextual fear conditioning; CA1 and CA3 (**Figure 10B**) (Kesner, 2007; Shimizu, Tang, Rampon, & Tsien, 2000; Nakazawa, McHugh, Wilson, & Tonegawa, 2004). Volumetric analysis of CA1 subfield indicated no significant differences in the dorsal ($p = 0.095$; **Figure.10C**) and ventral subdivision ($p = 0.309$; **Figure. 10D**) of isolated vs grouped animals, but a significant effect when the total CA1 subfield volume was compared ($p=0.032$; **Figure 10E**). In contrast, social isolation exerted no significant volume effects neither in the dorsal CA3 ($p = 0.151$; **Figure. 10F**), the ventral CA3 ($p = 0.691$; **Figure. 10G**), or the total CA3 subfield ($p = 0.222$; **Figure 10H**).

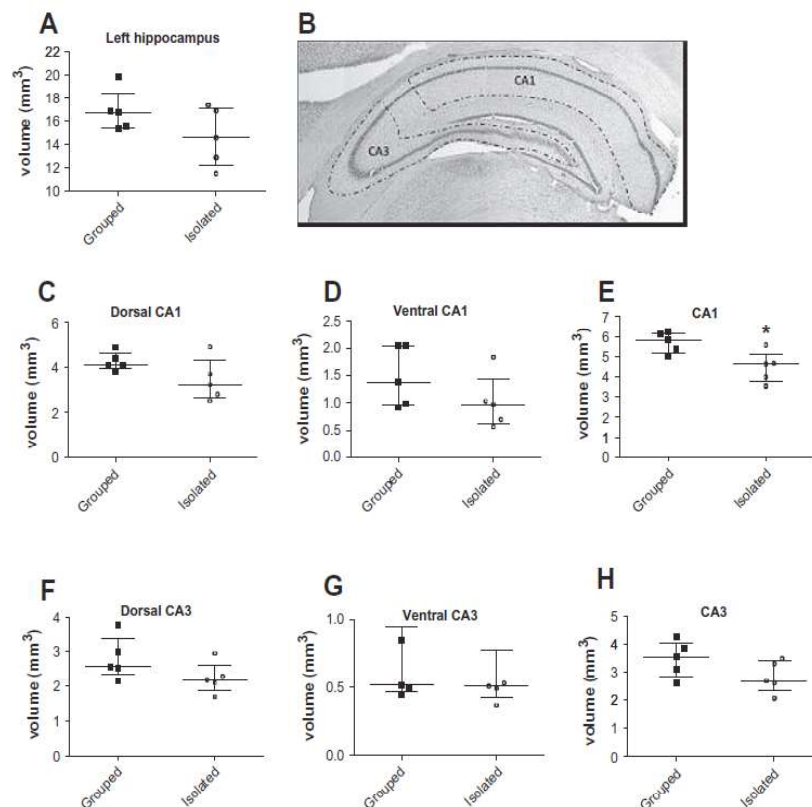


Figure 10. Stereological volume estimates in socially isolated and group-housed female *degus*. **(A)** Volumetric analysis of the total hippocampus. **(B)** Boundaries of the two hippocampal regions studied CA1 and CA3 traced over a *degus* brain slice stained with Nissl. Dorsal, ventral and total average volumes of CA1 and CA3 hippocampal regions **(C-H)**.

Data are the median \pm interquartile range from 5 *degus* per group. $P < 0.05$.

6. Social isolation reduced body weight gain and induced granulocytopenia without affecting plasma cortisol levels and adrenal weight

After long-term social isolation, female *degus* showed a significant reduction in **body weight gain** (grouped: 40.6 ± 6.2 g; isolated: 20.7 ± 3.8 g; $p = 0.031$). To evaluate whether long-term individual caging was reflected in physiological parameters, we measured **adrenal weight** and **plasma cortisol levels** at the time of sacrifice. We found that individually and group-housed animals showed similar relative adrenal weight (grouped: 0.124 ± 0.007 g/100g B.W; isolated: 0.110 ± 0.013 g/100g B.W; $p = 0.463$) and basal cortisol levels (grouped: 554 ± 141 mg/l; isolated: 362 ± 80 mg/l; $p = 1.183$, $p = 0.421$). Finally, we performed a full blood count in order to investigate additional biological markers of the stressful situation of being isolated. Reduced number of granulocytes was observed in isolated vs group-housed female *degus* ($p = 0.031$). No significant differences were found in other red blood cells and parameters including: **hemoglobin, erythrocyte volume fraction, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, platelet count percentage, mean platelet volume**, etc. (all $p > 0.189$).

Conclusions

After 6½ months of social isolation, adult female *degus* showed a normal auditory-cued fear memory, but a deficit in contextual fear memory, a hippocampal dependent task. Subsequently, we observed reduced hippocampal synaptic levels of PSA-NCAM in isolated compared to grouped-housed female *degus*. No significant differences were found between experimental groups in hippocampal levels of the three main isoforms of NCAM (NCAM180, NCAM140 and NCAM120). Interestingly, social isolation reduced the volume of the hippocampal CA1 subfield, without affecting the volume of the CA3 subregion or the total hippocampus. Moreover, attenuated body weight gain and reduced number of granulocytes were detected in isolated animals. Our findings indicate for the first time, that long-term social isolation of adult female animals induces a specific shrinkage of CA1 and a decrease in synaptic levels of PSA-NCAM in the hippocampus. These effects may be related to the deficit in contextual fear memory observed in isolated female *degus*.

CHAPTER 2

Short- and long- term isolation in aged male Wistar rats

Study 1. Effects of short-term social isolation on circadian rhythm, sympathetic tone, anxiety- and depressive-like behaviour in aged male Wistar rats

Firstly, we decided to investigate whether aged male Wistar rats (20 months old) subjected to social isolation stress for one month showed altered body weight gain, circadian rhythm, sympathetic tone, anxiety- and depressed-like behaviour. In order to measure circadian rhythm and sympathetic tone, animals were implanted with radiotelemetric transmitters to monitor HR, core body temperature and total activity. These variables were weekly registered for 24h, during the social isolation period. Subsequently, these animals were evaluated in the EPM and the forced swim test, and the analysis of the displayed behaviour was complemented by telemetry assessment. In addition, plasma corticosterone levels during social isolation were weekly monitored in a separated cohort of rats. Animals were randomly assigned to either living alone (short-term isolation, STI) or to stay with the same home-cage partner rat (Control), before physiological recording and behavioural evaluation (**Figures 11 and 13**).

Experiment 1. Primary effects of short-term social isolation on plasma corticosterone levels

A cohort of animals was used to analyze whether short-term social isolation affected plasma corticosterone levels. Two experimental groups were used, STI vs Control animals. Tail blood samples were collected before social isolation to assess baseline plasma corticosterone levels. Subsequently, during isolation procedure, blood samples were obtained once a week in the morning (around 9.00h) and in the evening (around 19.30h), before lights off (**figure. 11**).

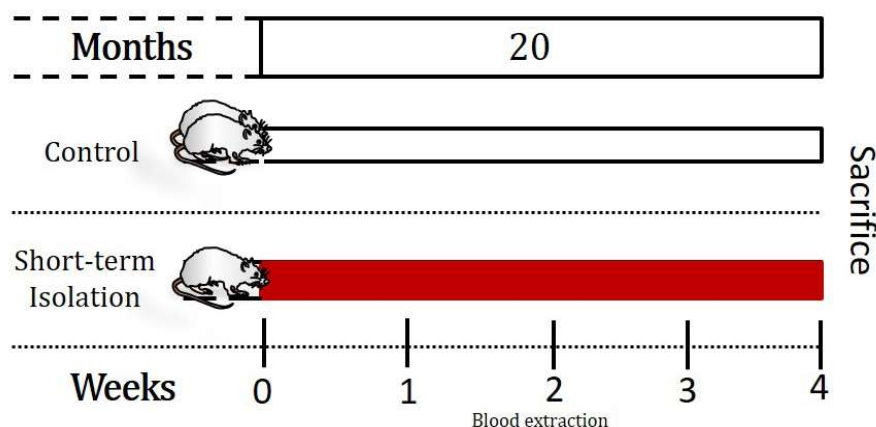


Figure 11. First experiment: Time course of plasma corticosterone levels. Tail blood samples were weekly collected during the isolation period. Control animals (n=10) vs STI (n= 10)

Statistical analysis of plasma corticosterone levels indicated no group, time or interaction effects either in the morning (Wald $X^2(1) = 0.004$, $p = 0.951$; Wald $X^2(4) = 6.711$, $p = 0.152$; Wald $X^2(4) = 2.117$, $p = 0.714$, respectively) (**Figure 12A**) or in the evening (Wald $X^2(1) = 0.000$, $p = 0.993$; Wald $X^2(4) = 2.612$, $p = 0.625$; Wald $X^2(4) = 3.489$, $p = 0.480$, respectively) (**Figure 12B**).

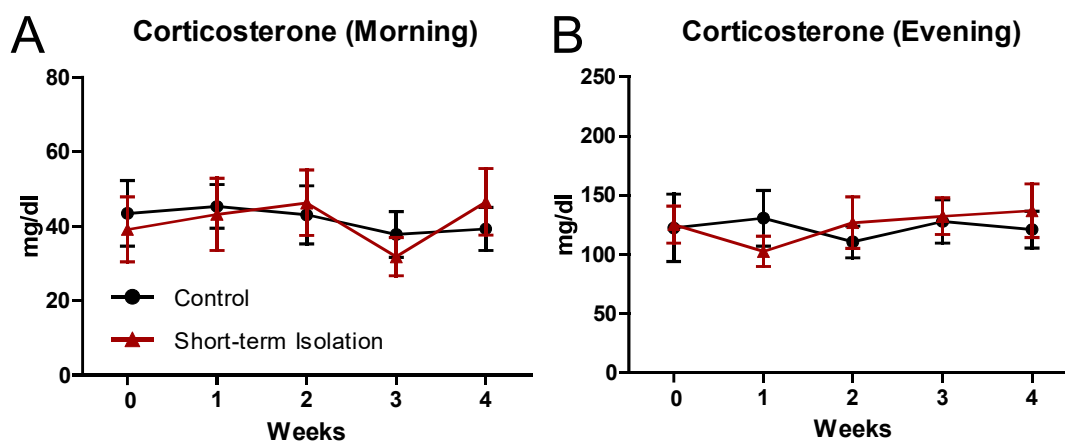


Figure 12. Plasma corticosterone levels during the social isolation period. A) Corticosterone levels in the morning. B) Corticosterone levels in the evening.

Mean and SEM are shown.

Experiment 2. Time-course effects of short-term social isolation on body weight gain, heart rate, core body temperature and home cage activity: a radiotelemetric study

The effects of social isolation on the circadian variation of several physiological variables were studied using telemetric radiotransmitters in another cohort of animals, in order to avoid the possible influence of tail blood cuts. Three different variables were measured in animals’s home cage: heart rate, core body temperature and total activity (locomotor + vertical activity). Recordings (each one lasted 24 hours) were weekly collected throughout the social isolation period. Furthermore, these parameters described above were also recorded during behavioral evaluation in the elevated plus maze and forced swim test (**Figure 13**).

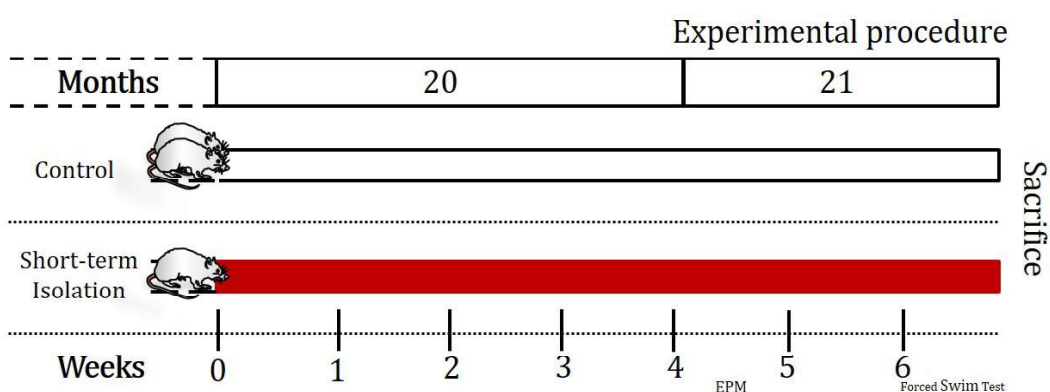


Figure 13. Second experiment: Radiotelemetry design. Control group (n=8), STI group (n=9). Telemetry recording was weekly performed measuring during 24 hours.

Effect of short-term social isolation on body weight gain

Body weight gain was weekly evaluated during social isolation. Statistical analysis did show a significant group effect (Wald $X^2(1) = 21.482, p < 0.001$). There was no effect in time or group x time interaction (Wald $X^2(3) = 2.056; p > 0.01$; Wald $X^2(3) = 3.306; p > 0.01$, respectively). Subsequent statistical analysis indicated that the effect of social isolation on body weight gain was evident from the first week of isolation (**Figure 14**).

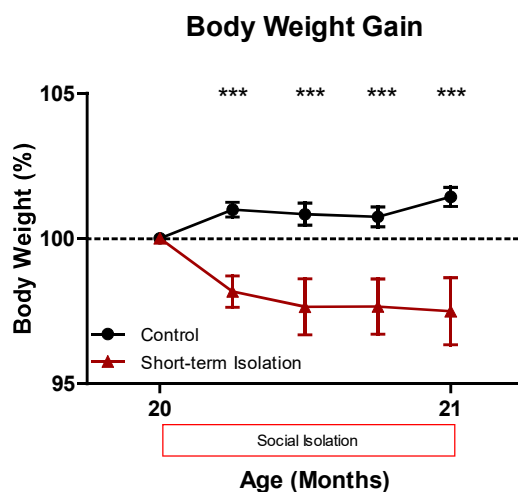


Figure 14. Body weight gain (gr) between month 20 to 21 of undisturbed animals (n=8) and STI (n=9).

Mean and SEM are shown. *** $p < 0.001$ IST vs control group.

A) Effects during short-term isolation: telemetric study

Longitudinal telemetric study

1. **Heart rate** measurement during 24 hours, once a week, in animals' home cage during social isolation procedure is shown in **Figure 15**. Statistical analysis of heart rate for control and STI groups after the **first week of social isolation** showed no significant group effect (Wald X^2 (1) = 1.15, $p=0.251$), but significant time (Wald X^2 (16) = 902,097, $p<0.001$) and interaction (group x time) (Wald X^2 (16) = 6140.156, $p<0.001$) effects. Further analysis showed that, compared to control group, STI group had a significant lower heart rate at 3:00 h, and a higher heart rate at different hours during light phase (9:00 h, 16:00 h and 17:00 h) (all $p<0.05$; **Figure 15**).

After completion of **the second week of isolation**, significant time (Wald X^2 (16) = 1917.656, $p<0.001$) group (Wald X^2 (1) = 5.38, $p<0.05$) and interaction (group x time) (Wald X^2 (15) = 1251.676, $p<0.001$) effects were found. Further statistical analysis showed that STI group had a significant higher heart rate during 20:00, 21:00, 22:00, 23:00, 1:00, 3:00, 13:00, 14:00, 15:00, 18:00 and 19:00 hours vs Control group (all $p<0.05$; **Figure 15**).

Statistical analysis of heart rate **after three weeks of social isolation** indicated no significant group effect (Wald X^2 (1) = 2.87, $p=0.09$), but showed significant time (Wald X^2 (15) = 661045.814 $p<0.001$) and interactions (group x time) (Wald X^2 (16) = 8.17×10^{14} , $p<0.001$) effects. Further analysis showed that compared to Control group, STI group had a significant higher heart rate at the beginning of lights off (20:00 h) and at different hours of the light phase; (14:00, 15:00 17:00 and 19:00) (all $p<0.05$; **Figure 15**).

After completion of the fourth week of isolation no significant group effect (Wald X^2 (1) = 1.252, $p=0.263$) was found, but significant time (Wald X^2 (14) = 3169.763 $p<0.001$) and interaction (group x time) (Wald X^2 (14) = 563.703, $p<0.001$) effects were observed. STI group had a significant higher heart rate during 21:00, 22:00, 2:00 and 17:00 hours and lower heart rate at 5:00 h when compared to Control group (all $p<0.05$; **Figure 15**).

2. The analysis of **core body temperature** during social isolation is shown in **Figure 16**. Statistical analysis of body temperature for STI and control groups after **the first week** of social isolation indicated no significant group effect (Wald X^2 (1) = 0.494, $p=0.319$), but significant time and interaction effects (Wald X^2 (17) = $1.047E+0.14$, $p<0.001$; Wald X^2 (16) = 258.267, $p<0.001$), respectively. Further analysis showed that, compared to Control group, STI group showed a higher core body temperature at 9:00 h ($p<0.01$), 10:00 h ($p<0.05$), 11:00 h ($p<0.01$), 12:00 h ($p<0.01$), 17:00 h ($p<0.01$) and 18:00 h ($p<0.05$) (**Figure 16**).

After completion of the second week of isolation statistical analyses of core body temperature data indicated no significant group effect (Wald X^2 (1) = 0.261, p = 0.61), but a significant time (Wald X^2 (15) = 5571.610 p < 0.001) and interaction (group x time) (Wald X^2 (15) = 984.267, p < 0.001). Further analysis showed that STI group had a significant higher body temperature at 19:00 h (p < 0.01) vs Control group (**Figure 16**).

Analysis of **body temperature after three weeks of social isolation** indicated no significant group effect (Wald X^2 (1) = 0.487, p = 0.485), but showed significant time (Wald X^2 (15) = 9793.587 p < 0.001) and interaction (Wald X^2 (15) = 264.125, p < 0.001) effects. Further analysis showed that STI group had a significant higher core body temperature at 18:00 h (p < 0.001) vs control group (**Figure 16**).

After the fourth week of isolation statistical analyses of body temperature data showed no significant group effect (Wald X^2 (1) = 0.028, p = 0.867), but significant time (Wald X^2 (14) = 303.344; p < 0.001) and interaction (group x time) (Wald X^2 (14) = 225.395; p < 0.001) effects was found. When compared to Control group, STI group had a significant lower body temperature at 6:00 h (p < 0.01), and a higher temperature at 17:00 h (p < 0.01), and 18:00 h (p < 0.05) (**Figure 16**).

3. Statistical analysis of **home cage activity data** over 24 hours, once a week, during social isolation is shown in **Figure 17**. Analysis of total activity after **the first week of isolation** did not show a group effect (Wald X^2 (1) = 2.67, p = 0.102), but significant time and interaction (group x time) effects (Wald X^2 (16) = 196.511, p < 0.001; Wald X^2 (16) = 6062.148, p < 0.001, respectively) were found. Further analysis showed that, compared to Control group, STI group showed a higher home cage activity at several hours; 8:00 (p < 0.01), 7:00 (p < 0.05), 9:00 (p < 0.01), 12:00 (p < 0.05), 14:00 (p < 0.01), 15:00 (p < 0.001), 16:00 (p < 0.05), 17:00 (p < 0.01), 18:00 (p < 0.05), 19:00 (p < 0.01).

After the second week of social isolation, no group effect was found (Wald X^2 (1) = 2.970, p = 0.085). However, significant time (Wald X^2 (15) = 1132.724 p < 0.001) and interaction (group x time) (Wald X^2 (15) = 44.142, p < 0.001) effects were observed in **total activity**. STI group displayed a significant higher activity at the beginning of the night phase (20:00 h) (p < 0.01), and at different hours of the light phase; 13:00 h (p < 0.05), 14:00 h (p < 0.001), 16:00 h (p < 0.01), 17:00 h (p < 0.01) and 18:00 h (p < 0.001) when compared to Control group (**Figure 17**).

Statistical analysis of **total activity data after three weeks of social isolation** showed no significant group effect (Wald X^2 (1) = 1.15, p = 0.251), but significant time (Wald X^2 (15) = 619.540, p < 0.001) and interaction (group x time) (Wald X^2 (15) = 459.096, p < 0.001) effects. Compared to Control group, STI group exhibited higher home cage activity during the following hours: 20:00 (p < 0.05), 00:00 (p < 0.05), 14:00 (p < 0.05), 15:00 (p < 0.05), 17:00 (p < 0.01), 18:00 (p < 0.05) and 19:00 (p < 0.05) (**Figure 17**).

After completion of the fourth week of social isolation, statistical analyses of total activity data showed no group effect (Wald $X^2(1) = 2.18$, $p = 0.140$), but significant time (Wald $X^2(14) = 853.983$, $p < 0.001$) and interaction (group \times time) (Wald $X^2(14) = 796.806$, $p < 0.001$) effects. Further analysis showed that STI group displayed higher activity during the following hours: 20:00 ($p < 0.05$), 21:00 ($p < 0.05$), 22:00 ($p < 0.05$), 4:00 ($p < 0.05$), 5:00 ($p < 0.01$), 6:00 ($p < 0.001$), 7:00 ($p < 0.01$), 11:00 ($p < 0.05$), 15:00 ($p < 0.05$), 16:00 ($p < 0.001$) and 18:00 ($p < 0.001$), when compared to Control group (**Figure 17**).

Pooled analysis of physiological variables during light/dark phases across social isolation

1. A detailed pooled analysis of **heart rate** measurement from animals **during light and night phases** across social isolation procedure is shown in **Figure 18 A and B**. Statistical analysis of heart rate for control and STI groups during the light phase showed significant group (Wald $X^2(1) = 6.764$, $p < 0.01$) and time (Wald $X^2(4) = 21.730$, $p < 0.001$) effects. Further analysis showed that, compared to control group, STI group showed a higher heart rate during the light period of the first and second week of isolation (both $p < 0.05$). There was no effect of the interaction group \times time. During the night phase, no statistical significant differences in heart rate were found between groups and interaction effects (Wald $X^2(4) = 3.087$; $p = 0.079$; (Wald $X^2(4) = 6.608$, $p = 0.158$, respectively).

2. Results from a pooled analysis of global core **body temperature recorded for one 24-hour period**, once a week, during social isolation is shown in **Figure 18 C and D**. Statistical analysis of body temperature for STI and control groups during the light phase indicated a significant group and time effect during the day (Wald $X^2(1) = 6.49$, $p < 0.05$; Wald $X^2(4) = 11.082$, $p < 0.05$, respectively). No significant interaction (group \times time) effect was found. Further analysis showed that STI group displayed a higher body temperature during the first week of isolation vs Control group ($p < 0.005$). In the night period, socially isolated animals and controls showed similar core body temperature.

3. Pooled analysis of **home cage activity** over light/night phases during social isolation is shown in **Figure 18 E and F**. The results for control and STI groups did show a significant group effect during the day (Wald $X^2(1) = 24.97$, $p < 0.001$). Further analysis showed that STI group exhibited a higher activity during the first, second and third weeks of isolation compared to control group ($p < 0.001$, $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively). There was no interaction (group \times time) effect. During the night period no statistical significant differences were found between control and STI groups.

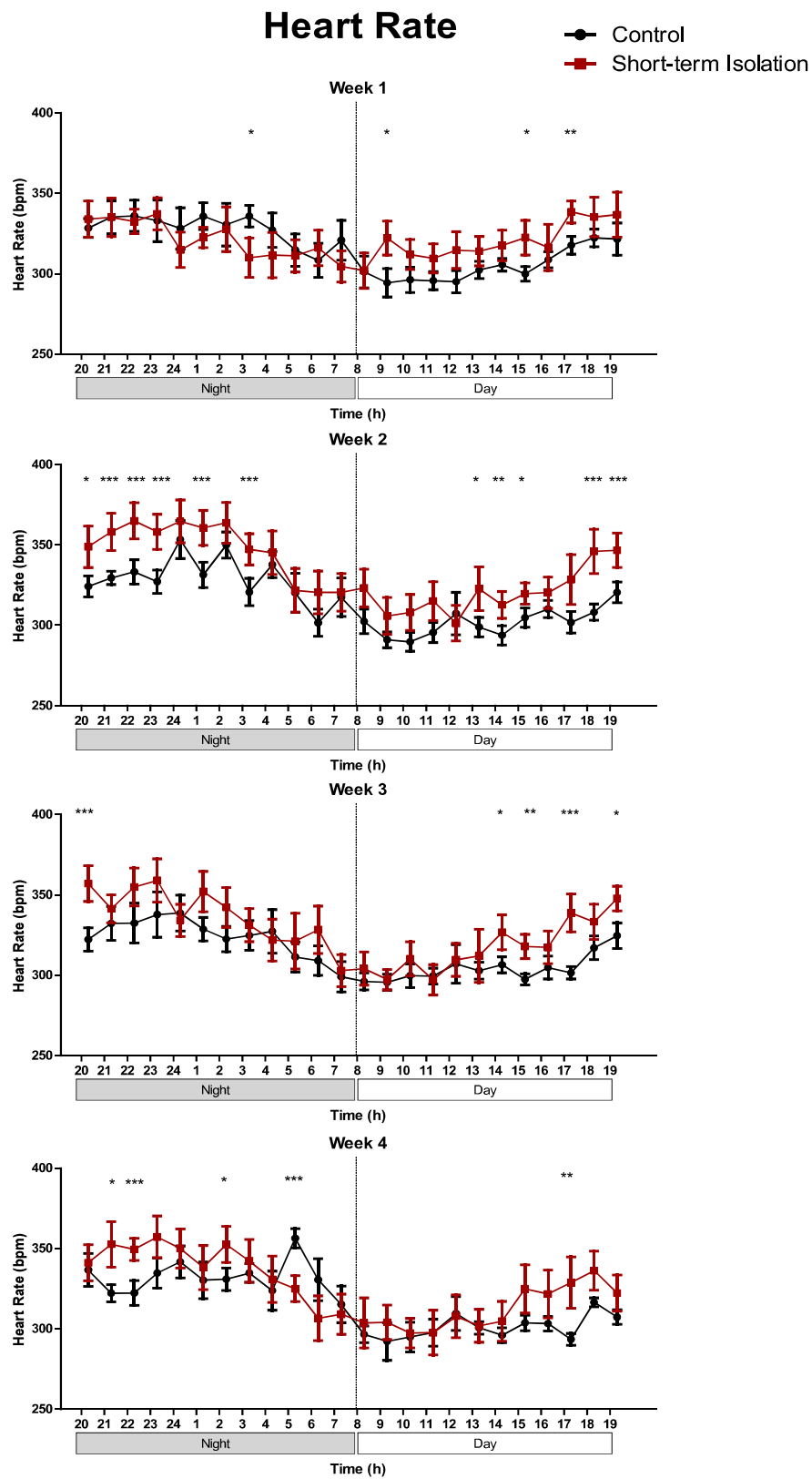


Figure 15. Telemetry Studies. Effect of social isolation on heart rate during the light and dark phases.

Mean and SEM are shown. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 STI vs Control group.

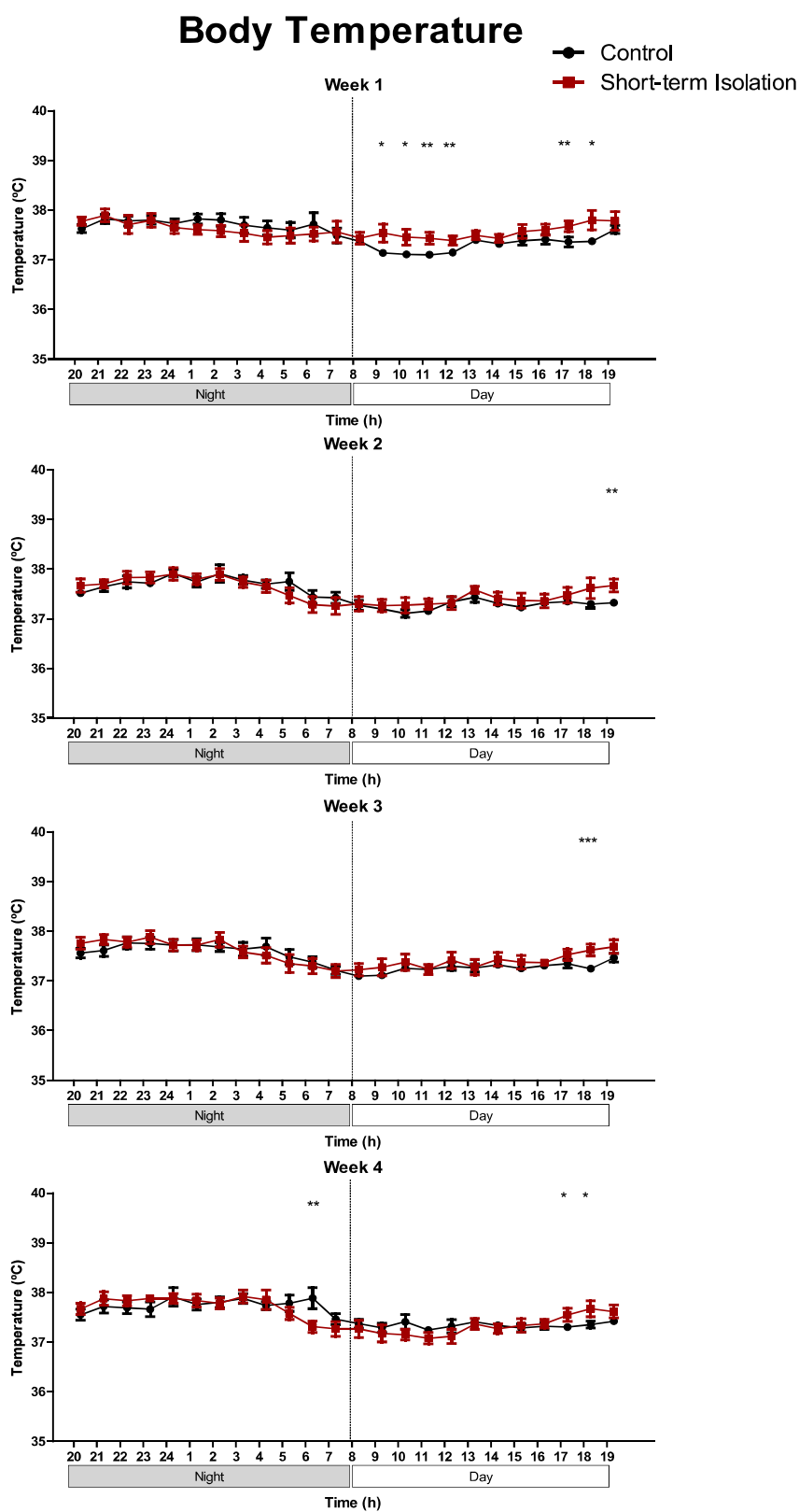


Figure 16. Telemetry Studies. Core body temperature of Control and STI animals during the light and dark phases throughout the four weeks of social isolation.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ STI vs control group.

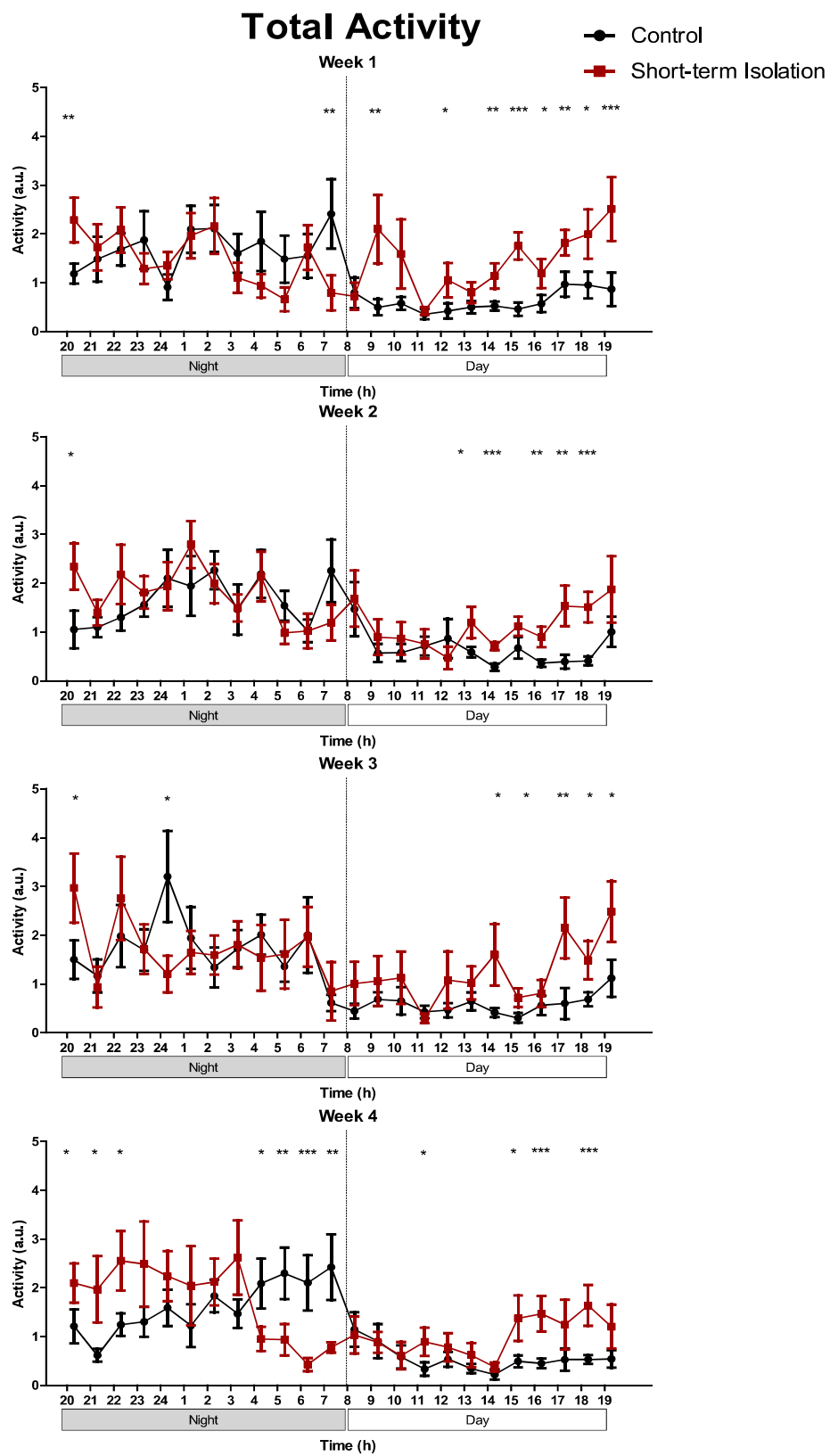


Figure 17. Telemetry Studies. Home cage total activity data of control and STI animals during the light and dark phases throughout the 4 weeks of social isolation.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ STI vs Control group.

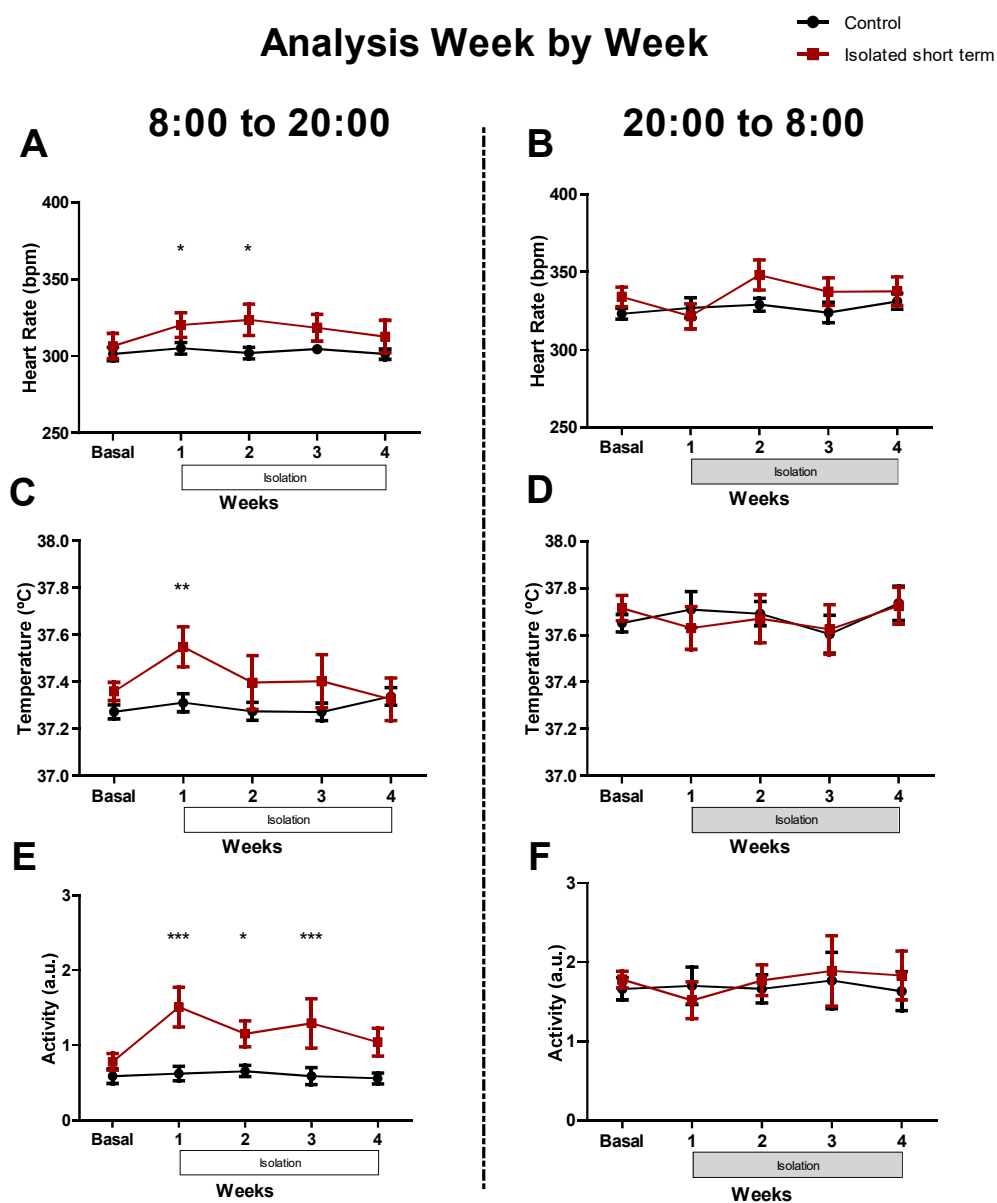


Figure 18. Telemetry Studies. Heart rate, activity and core body temperature of control and STI animals during the light and dark phases.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ STI vs Control group.

B) Effects of exposure to short-term social isolation on anxious- and depressive-like behavior: Studies using radiotelemetry and behaviour

The second experimental group (**Figure 13**) was used to analyze variables of the circadian rhythm through radiotransmitters evaluating the anxious-like behavior in the elevated plus maze and the depressive-like behavior in the forced swim test.

Results

After implanting radiotransmitters and allowing animals to recover for a week, three different measurements were taken in animals' home cage: heart rate, body temperature and activity. Recordings (each one lasted 24 hours) were collected once a week throughout the four weeks of social isolation. Furthermore, these parameters described above were also recorded during elevated plus maze and forced swim test.

1. Effects of short-term social isolation on anxiety-like behaviour in the EPM

In the EPM, statistical analysis of the **percentage (%) time in open arms** did not reach a significant difference between STI and control groups ($t = 0.987$, $df = 11$, $p < 0.349$) (**Figure 19A**).

Analysis of **heart rate** in control and STI groups during the EPM showed a significant group effect (Wald $X^2(1) = 28.333$, $p < 0.001$). Compared to Control group, STI group displayed a lower heart rate in the first four minutes in the EPM (**Figure 19B**). No significant time or group x time interaction effects were found.

Statistical analysis of **total activity** data in the EPM in control and STI groups did show a significant time and group effect (Wald $X^2(1) = 7.284$, $p < 0.01$; Wald $X^2(4) = 12.891$, $p < 0.05$, respectively). Further analysis showed that STI group displayed more total activity in the third minute vs Control group ($p < 0.01$). (**Figure 19C**)

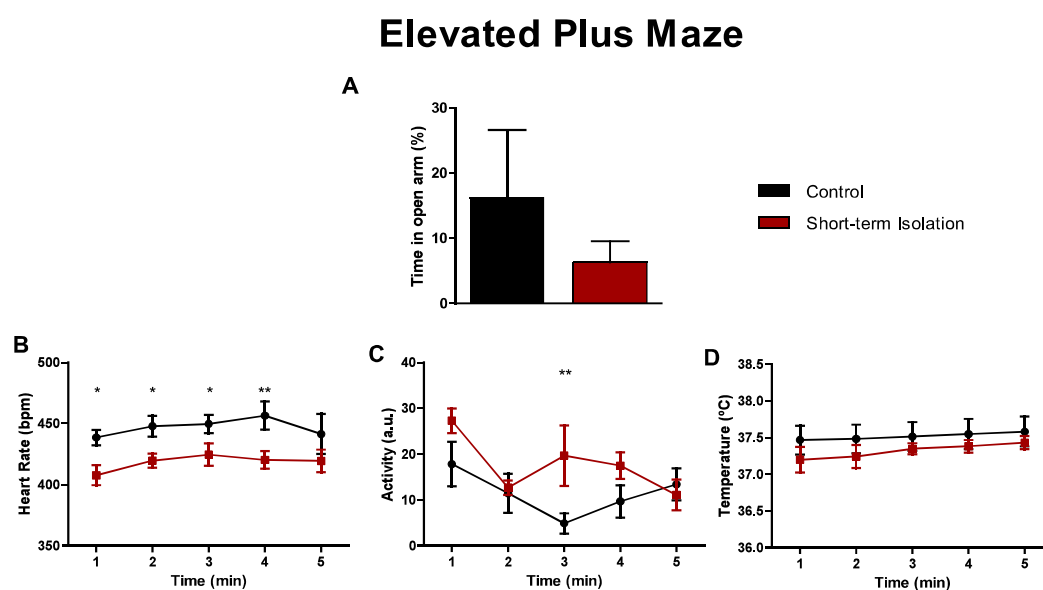


Figure 19. Elevated plus maze. Effect of social isolation on anxiety levels (A) heart rate (B), total activity (C) and core body temperature (D) during the EPM.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ IST vs control group.

Analysis of core **body temperature** during the EPM test in control and STI groups showed a significant time effect (Wald $X^2(4) = 20.214$, $p < 0.001$) (**Figure 19D**), but did not reach significant differences in group and interaction effects (Wald $X^2(1) = 1.36$, $p = 0.243$; Wald $X^2(4) = 1.034$, $p = 0.905$, respectively).

2. Effects of short-term social isolation on depressive-like behaviour in the forced swim test

Analysis of **immobility time in the first day** of the forced swim test revealed significant group, time, and interaction effects (Wald $X^2(1) = 20.513$, $p < 0.001$; Wald $X^2(4) = 46.231$, $p < 0.001$; Wald $X^2(4) = 26.447$, $p < 0.001$ respectively). Further analysis showed that STI group showed a higher immobility in the third, fourth and fifth minute vs Control group ($p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$ respectively) (**Figure 20A**).

Analysis of the **immobility time in the second day** of the forced swim test showed a significant time effect (Wald $X^2(4) = 32.132$, $p < 0.001$). Compared to controls, STI animals displayed a higher immobility in the fourth minute ($p < 0.05$). No significant differences in group and group x time interaction effects were observed (**Figure 20B**).

Statistical analysis of **heart rate** reached significant differences in time and interaction effects between STI and control groups on training and test days of the forced swim task (Wald $X^2(4) = 23.268$, $p < 0.001$; Wald $X^2(4) = 11.427$, $p < 0.05$; respectively on the first day; and Wald $X^2(4) = 11.901$, $p < 0.05$; Wald $X^2(4) = 10.182$, $p < 0.05$, respectively on the second day) (**Figure 20 C and D**). Statistical analysis of telemetric total **activity in the first day of the forced swim test** showed a significant time and group effect (Wald $X^2(1) = 7.45$, $p < 0.01$; Wald $X^2(4) = 77.457$, $p < 0.001$, respectively). Further analysis showed that, compared to Control group, STI group displayed more activity during the first minute ($p < 0.001$) (**Figure 20E**). Statistical analysis of the **activity in the second day of the forced swim test** for the Control and STI groups showed a significant time effect (Wald $X^2(4) = 180.528$, $p < 0.001$). Group and (group x time) interaction effects were not significant (**Figure 20F**).

Statistical analysis of **core body temperature in the first day** of the forced swim test (**Figure G**) in Control and STI groups indicated significant differences in group and time effects (Wald $X^2(1) = 8.36$, $p < 0.01$; Wald $X^2(4) = 88.309$, $p < 0.001$, respectively). Further analysis showed that STI group showed a lower body temperature in the fourth and fifth minutes vs control group (both $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively).

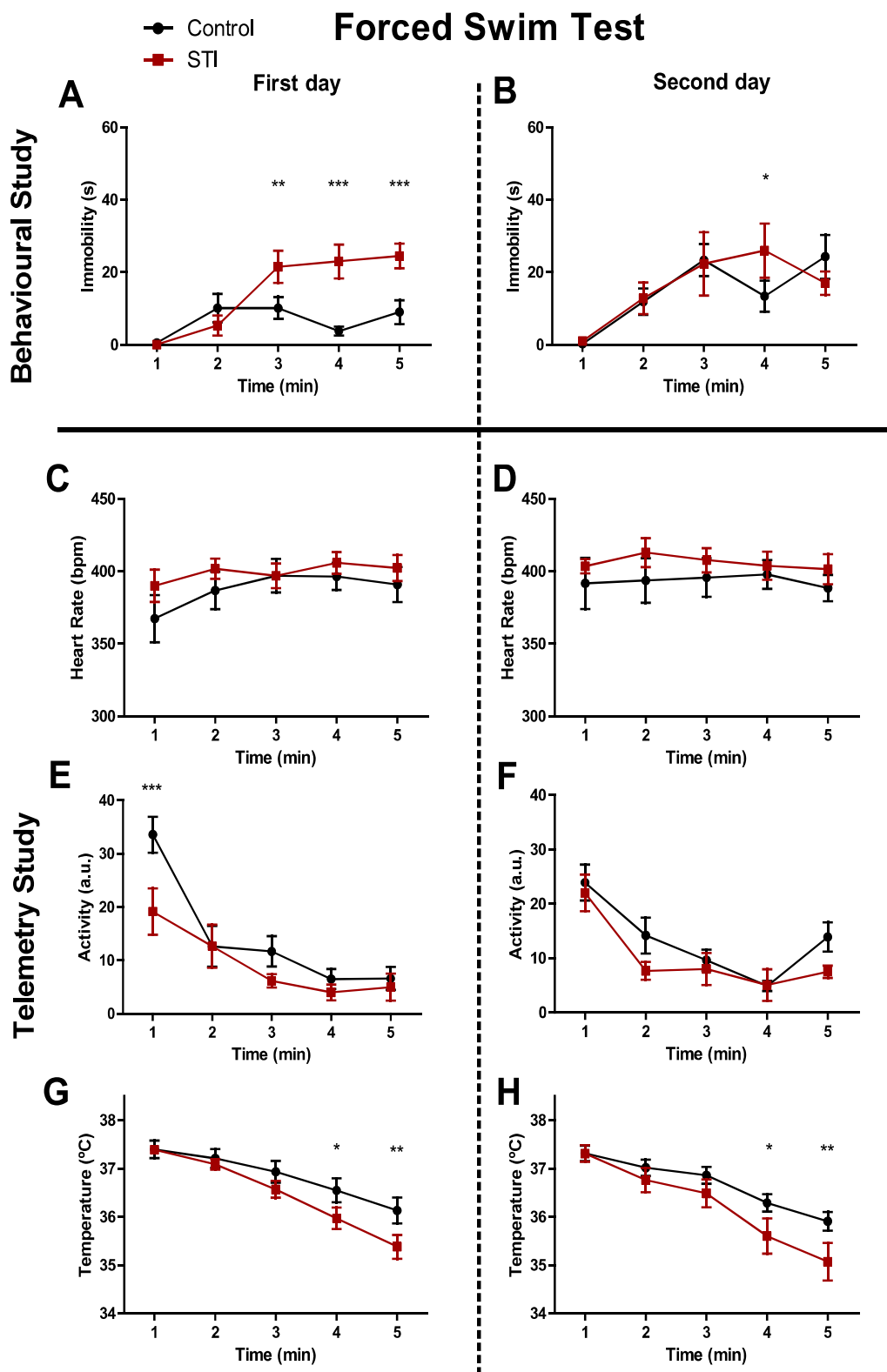


Figure 20. Forced swim test. A and B show immobility time during the two days of the forced swim task in controls and isolated animals. Effect of social isolation on heart rate (C, D), activity (E, F) and core body temperature (G, H) during the two days of forced swim test.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ STI vs Control group

Comparison of **body temperature data in the second day** of the forced swim test between control and STI group showed a significant difference in group and time effect (Wald $X^2(1) = 9.87$, $p < 0.01$; Wald $X^2(4) = 92.249$, $p < 0.001$, respectively) (**Figure 20H**). Further analysis showed that STI group showed a lower body temperature in the fourth and fifth minutes vs Control group (both $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

Conclusions

After one month of individual housing, aged male Wistar rats showed a significant reduction in body weight gain. Corticosterone levels were not affected by social isolation either in the morning or in the evening. Compared to controls, isolated animals showed a higher heart rate during the light period of the first two weeks of isolation, suggesting an increased sympathetic tone. In addition, isolated animals showed a higher activity in their home cages during the light, but not the dark phase. Furthermore, core body temperature was transiently elevated in STI rats compared to control animals, increasing during the light phase of the first week of isolation and returning to baseline levels by the second week of isolation.

Finally, compared to control animals, short-term chronic isolated animals did not show an increase in anxiety levels, evaluated in the EPM, but they showed a higher depressive-like behaviour in the forced swim test.

Study 2. Behavioural, morphological and electrophysiological changes after Chronic Social Isolation in aged male Wistar rats

Social isolation is known to alter cognitive function in young and adult rodents. However, few studies have evaluated the impact of social isolation on cognitive function in aged rats. In the present chapter, we investigated the electrophysiological, morphological and cognitive consequences of exposing aged male Wistar rats to short-term social isolation for 1 month (STI) or long-term social isolation for 3 months (LTI). Male Wistar rats (18-months old) (paired housed) were divided into three different groups of animals in pairs (controls), STI and LTI, according to uniform body weight. LTI animals were socially isolated at this age, while STI animals were isolated only when they were 20 month-old. In four independent experiments, with various cohorts of male Wistar rats, we evaluated: i) anxiety levels, spatial learning and memory abilities of the animals in the Morris water maze test as well as hippocampal volume; ii) dendritic spine density of granular neurons of DG and pyramidal neurons of CA1; iii) *in-vivo* Long-Term Potentiation (LTP) in the DG and CA1 areas of the hippocampus; and iv) changes in hippocampal levels of several learning and memory-related proteins.

Experiment 3: Effects of short- and long-term social isolation on body weight, anxious-like behavior, spatial learning and memory and hippocampal volume.

In order to analyze anxiety levels and spatial learning and memory abilities of the animals after chronic social isolation, (**experiment 3**), paired-housed animals were divided into three different experimental groups according to uniform body weight; i) male Wistar rats were kept housed in pairs (controls); ii) 20 month-old male Wistar animals were socially isolated for one month, short-term isolation (STI) and; iii) 18 month-old male Wistar rats were chronically isolated for three months, long-term isolation (LTI). At the end of the isolation procedure, animals were 21 months age (**Figure 21**).

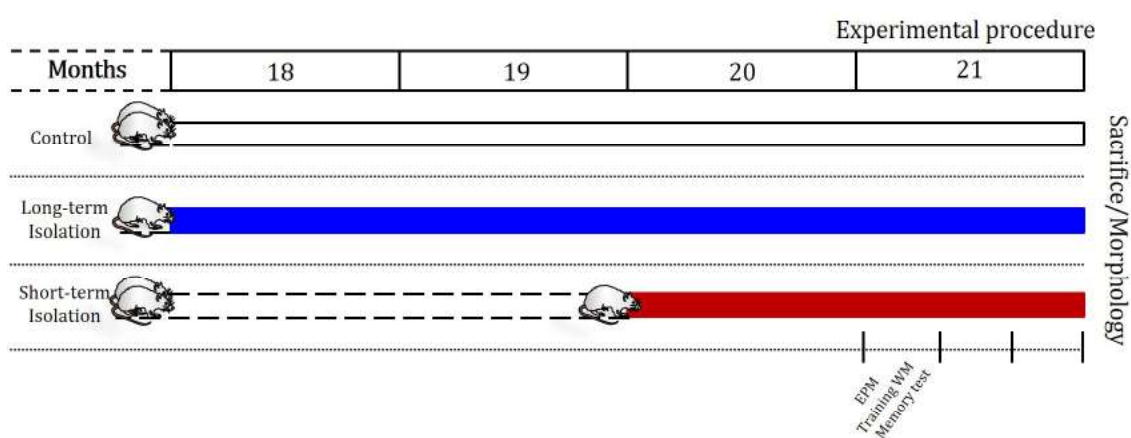


Figure 21. Third experimental design. After the isolation period elevated plus maze and water maze were realized. Controls (n=10), STI (n=10), LTI (n=10)

1. Effect of social isolation on body weight gain

Analysis of the percentage of body **weight gain** for control, short-term and long-term isolation groups showed significant group, time and interaction effects (Wald $X^2(2) = 13.36, p = 0.001$; Wald $X^2(11) = 362.39, p < 0.001$; Wald $X^2(22) = 323.08, p < 0.001$, respectively). Further analysis showed that LTI group had a lower body weight gain compared to controls. In addition, short-term isolation group had a lower body weight gain in the last month coincident with the isolation period. Subsequent statistical analysis indicated that chronic short- and

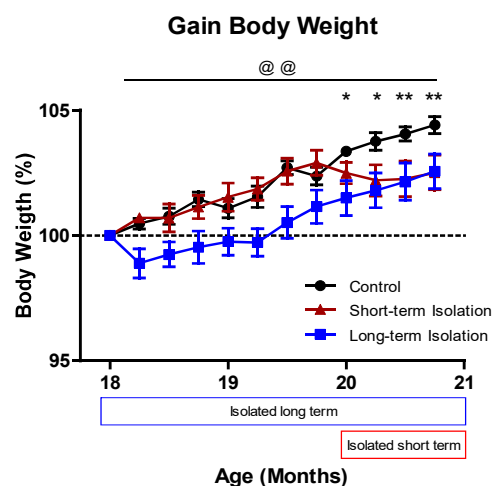


Figure 22. Body weight gain (%) in animals submitted to chronic short- and long-term social isolation.

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$ STI vs control group; @@ $p < 0.01$ LTI vs control group.

long-term social isolation at aging negatively influenced body weight gain of the animals from the first week of isolation (**Figure 22**).

2. Evaluation of behaviour in the EPM in male Wistar rats 21 month-old

Anxiety-like behaviour in aged male Wistar rats was assessed in the elevated plus maze after short- or long-term social isolation. Statistical analysis revealed a significant difference in percentage of time in open arms of the EPM between experimental groups (Wald $X^2(2) = 6.678$, $p < 0.05$). Further analysis revealed that LTI and STI animals spent less time in open arms of the EPM compared with controls (both $p < 0.05$) (**Figure 23**).

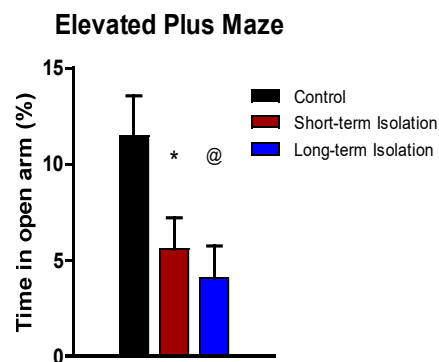


Figure 23. Anxiety-like behaviour in the EPM after social isolation

Mean and SEM are shown. * $p < 0.05$ STI vs control group; @ $p < 0.05$ LTI vs control group.

3. Learning and spatial memory in the Morris water maze (MWM)

Statistical analysis of latency **to find the hidden platform** during the acquisition phase of spatial learning in the MWM indicated a significant trial and group \times trial effect (Wald $X^2(11) = 183.753$, $p < 0.001$; Wald $X^2(22) = 68.545$, $p < 0.001$, respectively), indicating that the three experimental groups progressively learnt the platform location as training proceeded (**Figure 24 A**). Further analysis of interaction showed that, compared to controls, STI animals needed more time to reach the hidden platform at trials 3 and 5 (both $p < 0.05$).

Spatial memory for the previous platform location was assessed with a probe trial without the platform present. Statistical analysis (**Figure 24B**) revealed a significant difference between experimental groups in the first 1 min (Wald $X^2(2) = 12.14$, $p < 0.01$). Further analysis revealed that, compared to control animals, LTI rats spent less time in the target quadrant where the platform was previously located during the training days ($p < 0.01$).

4. Hippocampal volume changes after chronic social isolation

In order to analyze whether chronic social isolation can affect the volume of the hippocampus, animals were divided into three different experimental groups according to uniform body weight (**experiment 3**). At the end of the isolation procedure, the three experimental groups were 21 month-old.

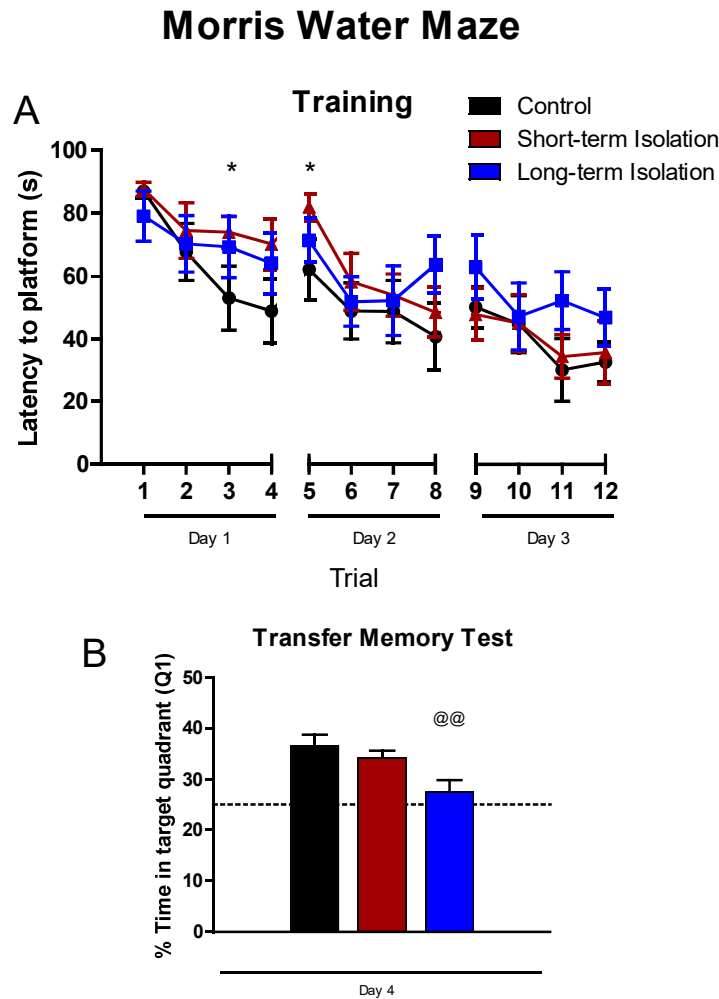


Figure 24. Effect of short- and long-term social isolation on **spatial learning and memory abilities** in the Morris water maze. **A)** Spatial training-escape latency. **B)** Transfer memory test.

Means and S.E.M. are shown. * $p < 0.05$ LTI vs control group; @@ $p < 0.01$ LTI vs control group.

The statistical analysis of CA1 **hippocampal volume** (**Figure 25A**) showed a significant group effect in *stratum oriens* of CA1 (Wald $X^2(2) = 12.015$, $p < 0.01$). Further analysis showed a significant decrease of the volume of the *stratum oriens* of CA1 in STI and LTI groups compared to control group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). A tendency to a lower volume in the CA1 pyramidal layer was found in LTI vs controls ($p = 0.076$).

The other analyzed hippocampal areas; CA2, CA3 and DG did not show significant differences between groups (all $p > 0.05$). (**Figure 25 B, C and D**)

Hippocampus Volume

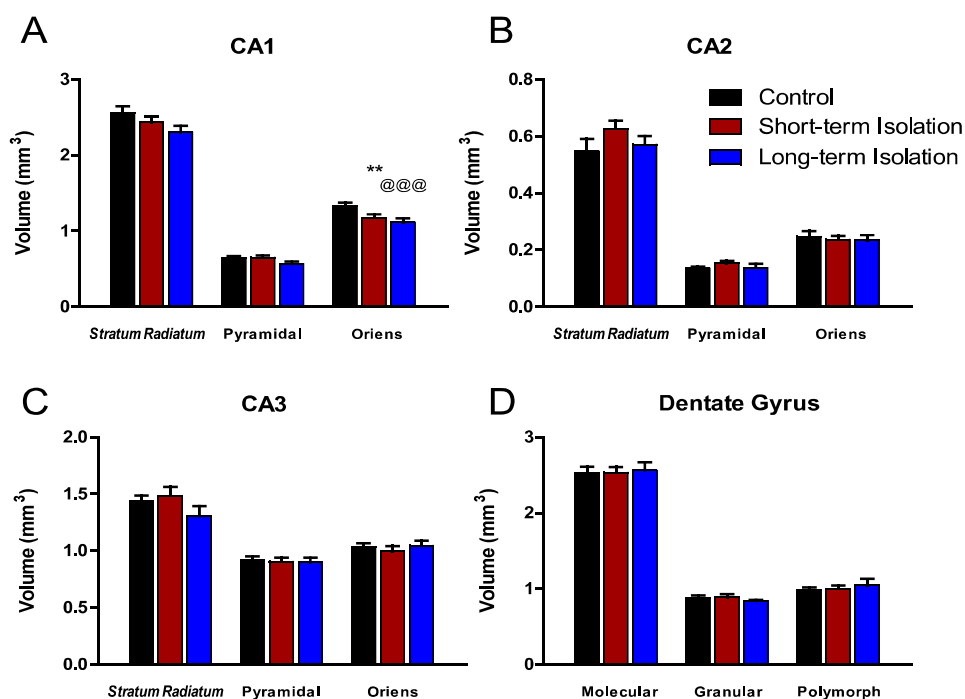
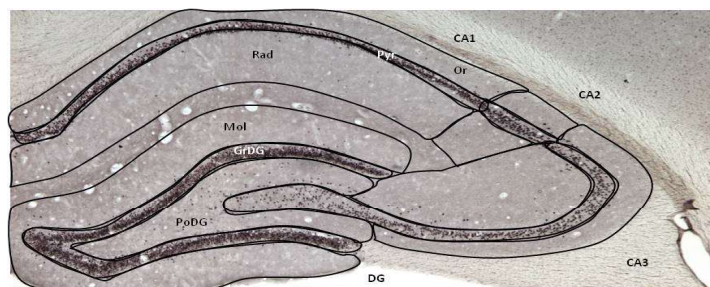


Figure 25. Hippocampal volume in control (n=8), STI (n=10) and LTI (n=6) animals. **A)** Volume of CA1. **B)** Volume of CA2. **C)** Volume of CA3. **D)** Volume of DG.

Mean and SEM are shown. *p<0.05 STI vs control group, @@p<0.01 LTI vs control group.

Experiment 4: Relative adrenal gland weight, morning plasma corticosterone levels, and structural plasticity changes induced by social isolation

In order to analyze whether chronic social isolation can affect structural plasticity of hippocampal neurons, we performed an independent experiment using the same experimental design as before. Old male Wistar rats were randomly assigned to 3 experimental groups, keeping animal weights balanced across groups: Controls; STI, animals exposed to 1 month of social isolation and LTI; animals exposed to 3 months of social isolation. In order to measure plasma corticosterone

Results

levels after social isolation, blood samples were collected from tail right before animals were sacrificed at the end of the experimental procedure (**Figure 26**) (**Experiment 4**).

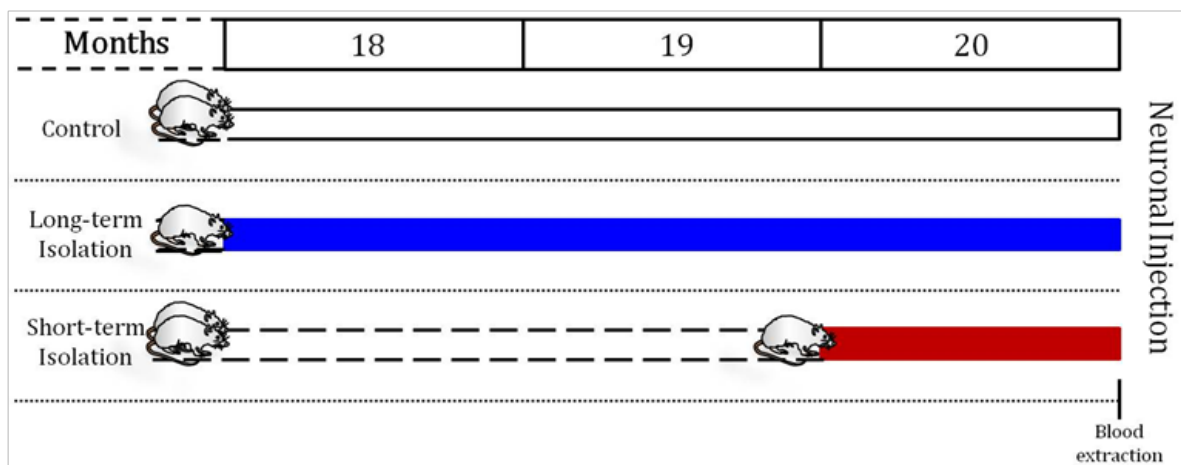


Figure 26. Design of Experiment 4. After the isolation period, blood tail samples were taken before animals were perfused intracardially. The brain was removed and sliced in order to inject hippocampal granular and pyramidal neurons with Alexa Fluor 594 dye and to evaluate spine density (see Materials and Methods). Control (n=8), STI (n=8), LTI (n=8).

1. Relative adrenal gland weight

After the isolation period, animals were sacrificed and adrenal glands were weighted. The **relative adrenal gland weight** (adrenal gland to body weight ratio) was significantly different between groups (Wald $X^2(2) = 6.703$, $p < 0.05$). Further analysis revealed that relative adrenal weight was higher in LTI animals compared with controls ($p < 0.05$) (**Figure 27A**).

2. Morning plasma corticosterone levels and weight of adrenal glands

In order to analyze whether STI and LTI altered the stress response, plasma **corticosterone levels**, (**experiment 4**) and **adrenal glands weight** (**experiment 5 and 6**) were evaluated. At the end of the experimental procedure blood samples were obtained by tail cuts at the beginning of the light phase in order to measure morning plasma corticosterone levels.

The statistical analysis of morning plasma **corticosterone levels** showed a significant group effect (Wald $X^2(2) = 8.025$, $p < 0.05$). Further analysis showed that LTI group had higher plasma corticosterone levels compared with controls ($p < 0.01$) (**Figure 27B**).

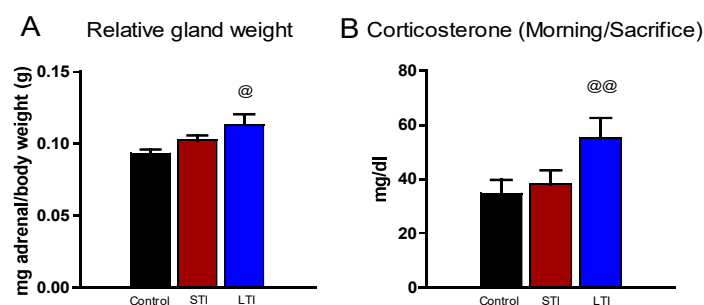


Figure 27. A) Relative adrenal weight (mg adrenal/g body weight) and **B)** morning corticosterone levels at sacrifice.

Mean and SEM are shown. @p<0.05, @@ p<0.01 LTI vs control group.

3. Sholl analysis of spine density by neuronal injection

Once animals were perfused, and brain slices were obtained, hippocampal neurons of the GD and CA1 were injected with Alexa Fluor 594 dye and spine density was evaluated by *sholl* analysis (see details in Materials and Methods).

Sholl analysis of spine density of granular cells of DG (Figure 28A) showed significant effects for group and distance (Wald $X^2(2) = 69.37$, $p < 0.001$; Wald $X^2(17) = 287.064$, $p < 0.001$, respectively), but not for group x distance interaction. Further analysis showed a decrease in spine density in the STI and LTI groups compared to control group (both $p < 0.001$).

Statistical analysis of the **total spine density of the proximal zone** of the dendritic tree of granule cells did show significant differences across groups (Wald $X^2(2) = 6.725$, $p < 0.05$) (**Figure 28B**). Further analysis showed that, compared to control group, STI and LTI groups showed a decrease in total spine density (both; $p < 0.05$).

Total spine density of the distal zone was significantly different between groups (Wald $X^2(2) = 9.652$, $p < 0.005$) (**Figure 28C**). Further analysis showed that, compared to control group, there was a decrease in total spine density in the STI ($p < 0.05$) and LTI groups ($p < 0.005$).

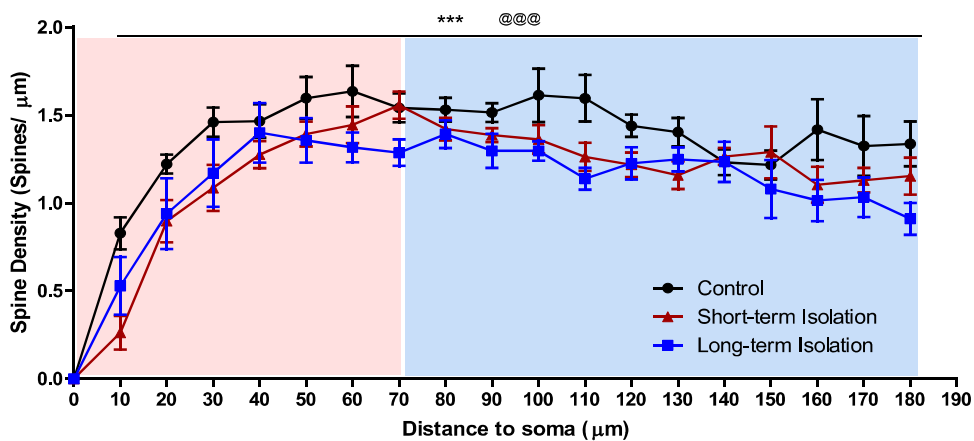
There were significant differences in **total spine density** across groups (Wald $X^2(2) = 12.081$, $p < 0.01$) (**Figure 28D**). Further analysis showed a decrease in total spine density in the STI ($p < 0.005$) and LTI groups ($p < 0.005$) compared to control group.

Spine density using Sholl analysis in the *stratum oriens* of CA1 (**Figure 29A**) showed significant effects for group and distance (Wald $X^2(2) = 21.538$, $p < 0.001$; Wald $X^2(13) = 468.79$, $p < 0.001$, respectively), but not for group x distance interaction. Further analysis showed a decrease in spine

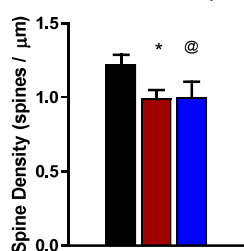
DG

A

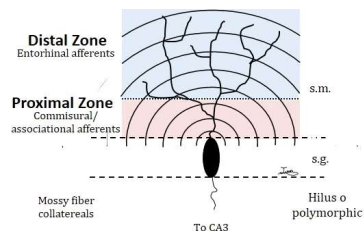
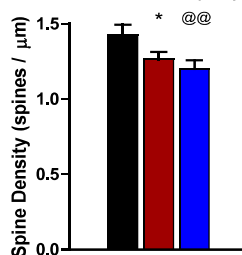
(DG) Sholl Analysis



B Proximal Zone (1/3)



C Distal Zone (2/3)



D Total

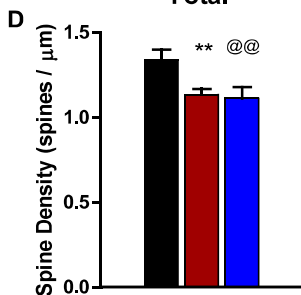


Figure 28. Effects of short- and long-term social isolation on spine density on granular cells of the hippocampus. **A)** Sholl analysis showing spine density as a function of distance from the soma. **B)** Spine density in proximal zone. **C)** Spine density in distal zone. **D)** Total spine density.

Means and S.E.M. are shown. *p<0.05 STI vs control group; **p<0.01 STI vs control group; ***p<0.001 STI vs control group; @@ p<0.01 LTI vs control group; @@@ p<0.001 LTI vs control group; @ p<0.05 LTI vs control group.

density in the LTI group compared to control group ($p < 0.001$). No significant differences were found in STI group compared with control group.

Analysis of total spine density in the *stratum oriens* of CA1 did not show significant differences between the three experimental groups (Wald $X^2(2) = 4.04$, $p=0.133$) (**Figure 29B**).

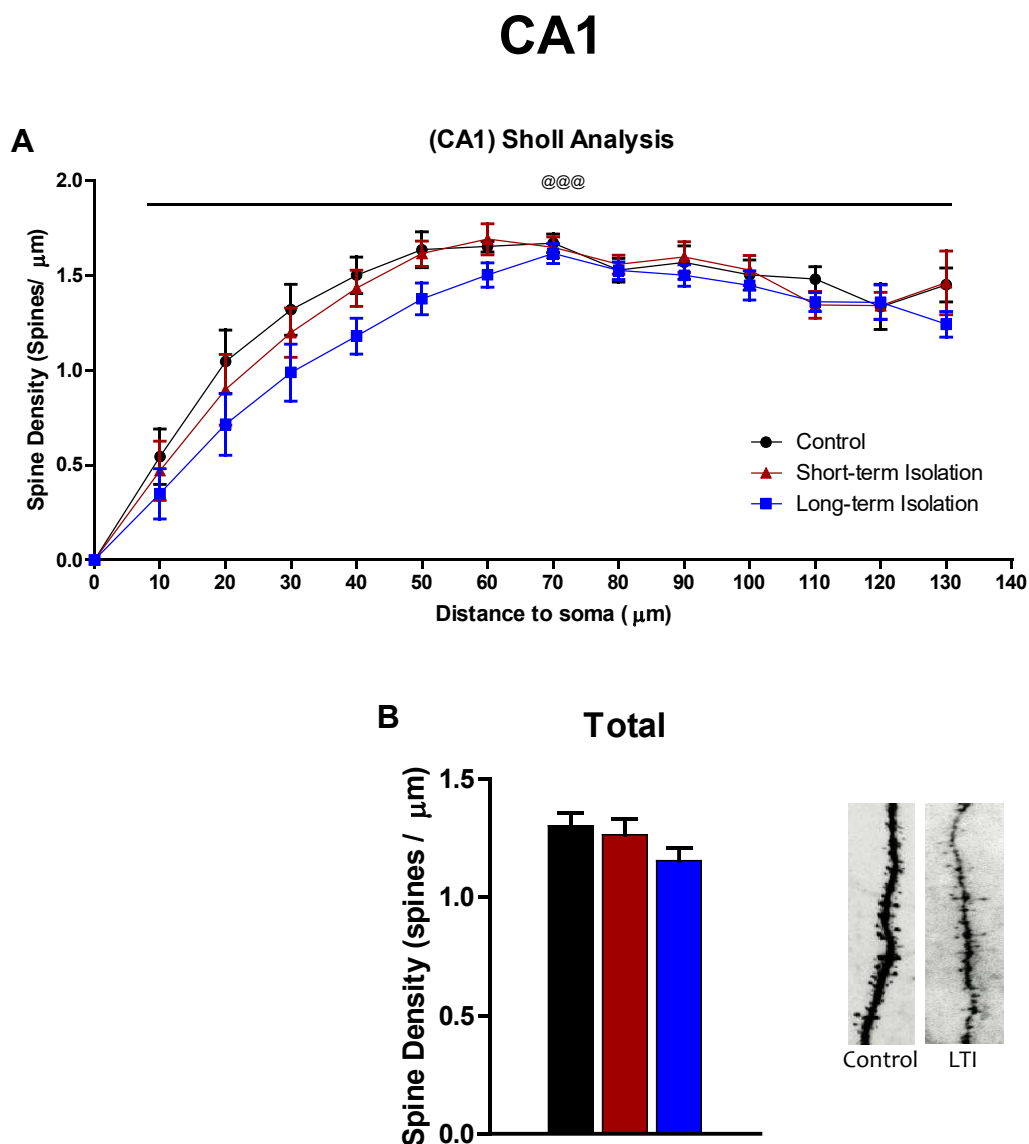


Figure 29. Effects of short- and long-term social isolation on **spine density in CA1 pyramidal neurons** of the hippocampus. A) Sholl analysis showing spine density as a function of the distance from the soma. B) Total spine density (scale 5 μm)

Means and S.E.M. are shown. *** $p < 0.001$ LTI vs control group.

Experiment 5. Activity related plasticity changes induced by social isolation

In order to investigate whether chronic social isolation can affect **activity-related plasticity in the hippocampus (Experiment 5)**, animals were assigned to one of the experimental groups: Control, STI and LTI using the same experimental design as before. After the SI period, animals were anesthetized and *in vivo* electrophysiological recording performed in the *stratum oriens* of CA1 pyramidal cells and in the molecular layer of DG cells. Immediately following electrophysiological recording, animals were sacrificed and the adrenal glands were extracted (**Figure 30**).

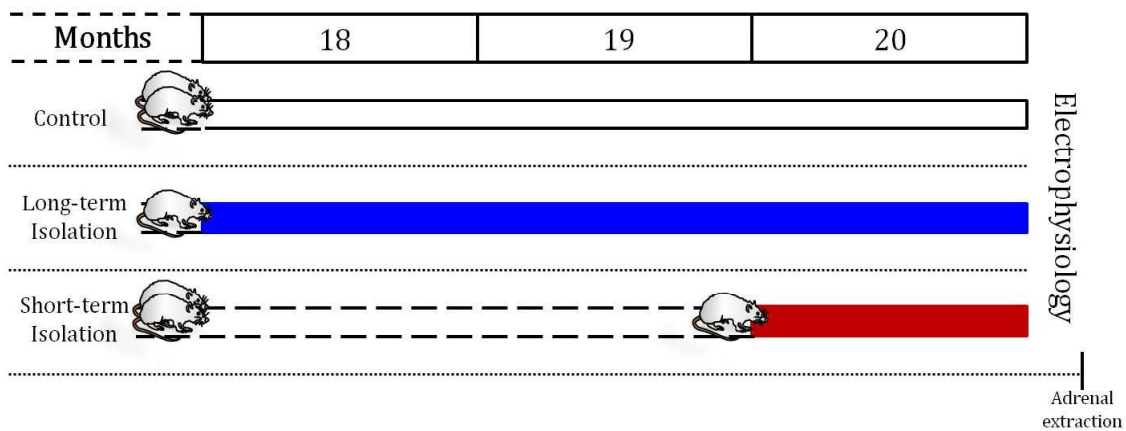


Figure 30. Fifth experimental design. After the isolation period animals were anesthetized and electrophysiological recording performed. Controls (n=7), STI (n=6), LTI (n=5).

The **analysis of the electrophysiological results obtained after *in vivo* LTP induction in DG** indicated significant differences between STI, LTI and control animals (Wald $X^2(2) = 12.738$, $p < 0.01$). **LTP induction in DG** was observed in controls and STI animals, but not in LTI animals. Further analysis showed that LTI group presented a lower fEPSP than control animals ($p < 0.01$) (**Figure 31B**).

The **analysis of electrophysiological data after *in vivo* LTP induction in CA1** indicated that LTP was induced in control and STI groups, but not in LTI group (**Figure 31D**). **Statistical analysis of electrophysiological data obtained in CA1** showed the existence of significant differences between STI, LTI and control animals (Wald $X^2(2) = 21.38$, $p < 0.001$). Further analysis showed that LTI group presented a lower fEPSP than control animals ($p < 0.001$) (**Figure 31E**).

Electrophysiology in the Hippocampus

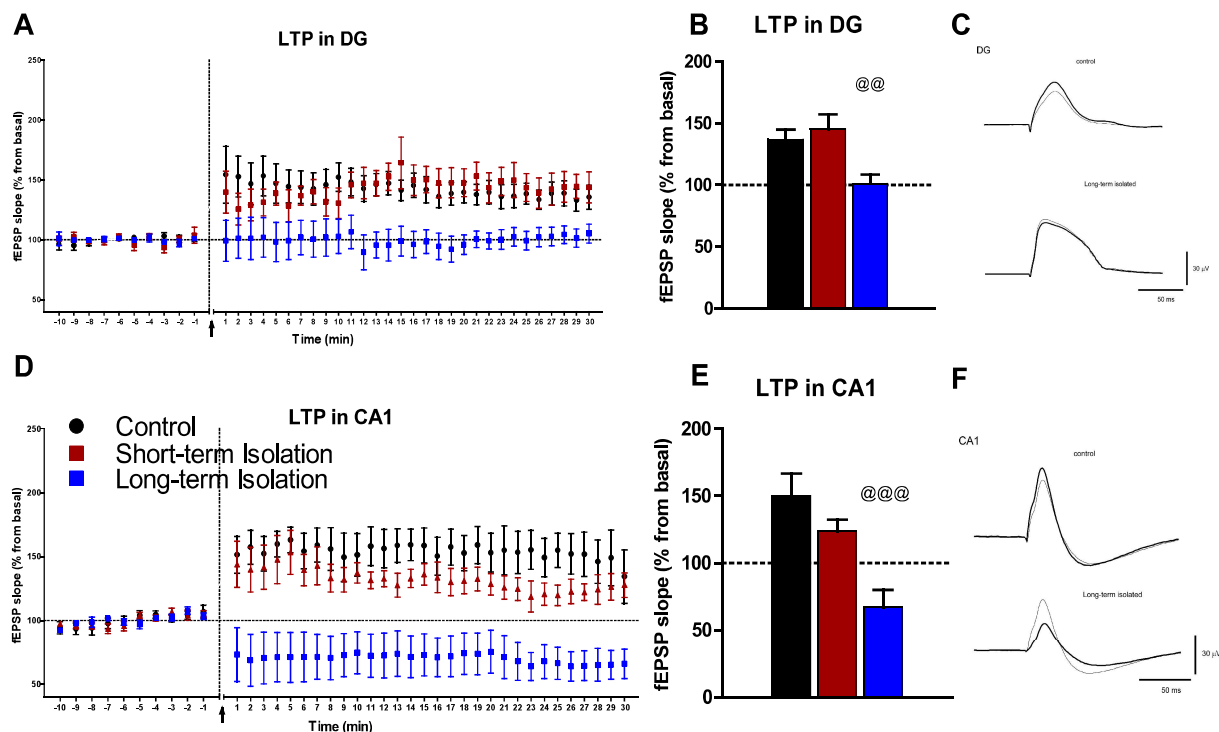


Figure 31. Effect of short- and long-term social isolation on in vivo LTP induction in the hippocampus. **A)** LTP induction in DG region; Vertical arrow indicates the application of a stimulation train at the perforant pathway. **B)** Mean % fEPSP calculated during the 10 last minutes of recording respect to basal activity in DG; black bar shows data from control animals, red bar from short-term isolation and blue bar from long-term isolation. **C)** Representative averages for DG region calculated during the 10 min previous to the onset of the stimulation (basal activity; gray trace) and during the 10 last minutes of recording (black trace). **D-E)** Same plots as in A-C by LTP induction in CA1 region.

Means and S.E.M. are shown. @@ $p < 0.01$ and @@@ $p < 0.001$ LTI vs control group.

Experiment 6. Effects of social isolation on learning and memory related proteins in the hippocampus

An independent experiment was performed in order to analyze the effects of SI on certain proteins related to learning and memory (**Experiment 6**). Animals were randomly assigned to the following three groups: Control, STI and LTI. After the SI period, animals were sacrificed, adrenal glands and brains were removed and hippocampi dissected out. Subsequently, the hippocampi were processed to obtain homogenates and synaptosomes (**Figure 32**).

1. Synaptic content of PSA-NCAM, but not NCAM, is down regulated in the hippocampus of long-term socially isolated male Wistar rats

Western blot assays were performed to evaluate the relative amount of the three main **NCAM isoforms** in hippocampal crude synaptosomes, using an antibody that recognizes all NCAM isoforms. No significant differences were found between groups in any of the main NCAM isoforms (NCAM 180 kDa, Wald $X^2(2) = 0.238$, $p = 0.888$; NCAM 140 kDa, Wald $X^2(2) = 2.259$, $p = 0.323$; NCAM 120 kDa, Wald $X^2(2) = 0.459$, $p = 0.795$) (**Figure 33A**).

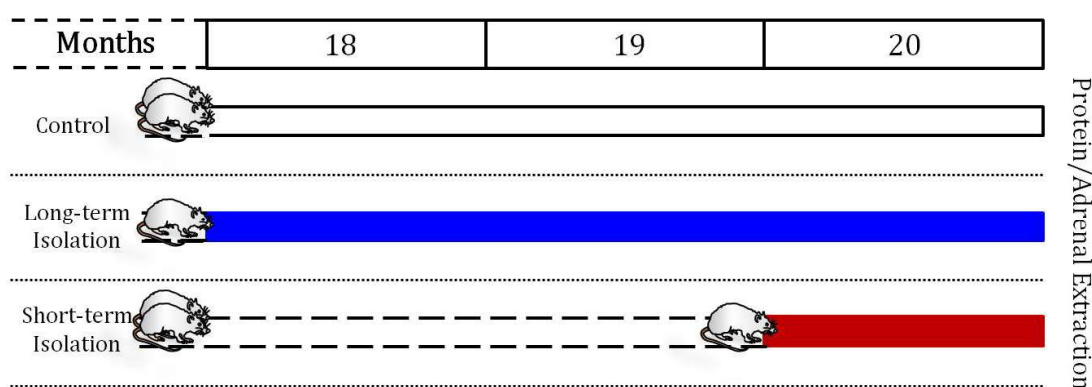


Figure 32. Sixth experimental design. After the isolation period, animals were sacrificed and hippocampi were taken for protein analysis. Controls ($n=8$), STI ($n=7$), LTI ($n=7$).

PSA-NCAM levels in the hippocampus were evaluated in hippocampal homogenates by ELISA. We found significant differences between groups in the hippocampal levels of PSA-NCAM (Wald $X^2(2) = 11.956$, $p < 0.01$). Further statistical analysis showed that, compared to undisturbed animals, rats submitted to LTI showed reduced hippocampal PSA-NCAM levels ($p < 0.01$; **Figure 33B**).

2. Chronic social isolation affects FGF2 and FGFR1 hippocampal levels in a time-dependent manner

FGF2 levels were measured in hippocampal homogenates using an ELISA assay. Significant differences between groups in hippocampal FGF2 levels were found (Wald $X^2(2) = 6.4664$, $p < 0.05$). Further statistical analysis showed a significant increase in STI rats compared to group-housed animals ($p < 0.05$; **Figure 33C**).

FGFR1 levels were measured in hippocampal homogenates using an ELISA assay. A significant group effect was found in hippocampal FGFR1 levels (Wald $X^2(2) = 7.118$, $p < 0.05$). Further statistical analysis showed that, compared to group-housed animals, LTI rats showed elevated hippocampal FGFR1 levels ($p < 0.05$; **Figure 33D**).

3. Social isolation does not affect synaptic levels of NR1 and GluR1 of the hippocampus

NR1 levels were measured in hippocampal synaptosomes using western blot technique. No significant differences between groups were observed in NR1 synaptic levels of the hippocampus (Wald $X^2(2) = 1.971$, $p = 0.373$) (**Figure 33E**).

GluR1 levels were measured in hippocampal synaptosomes using western blot technique. No significant differences in hippocampal GluR1 synaptic levels were observed between groups (Wald $X^2(2) = 2.423$, $p = 0.298$) (**Figure 33E**).

Hippocampal Biochemistry

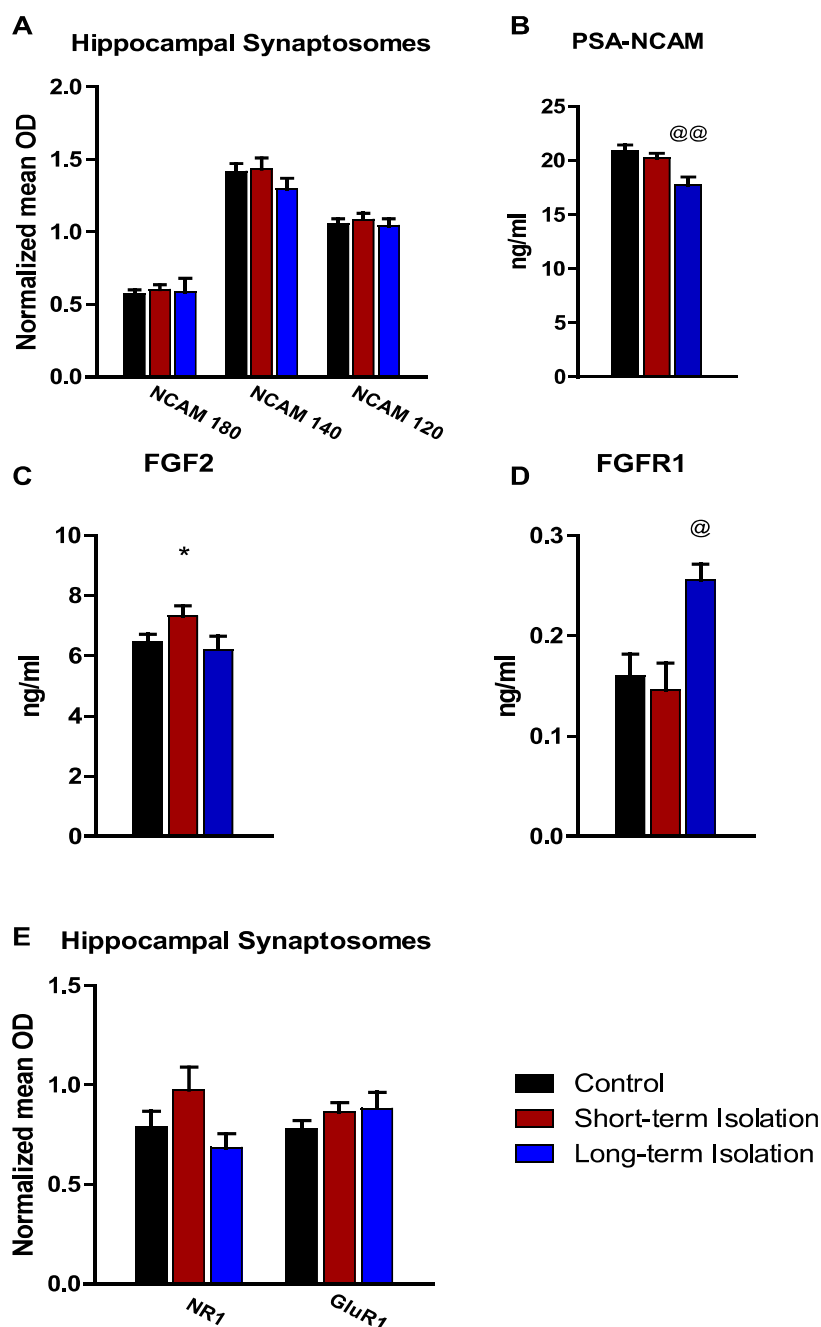


Figure 33. A) Effects of chronic social isolation on protein levels of the three major NCAM isoforms (NCAM-120, -140, and -180) in hippocampal synaptosomes. B) Effects of chronic social isolation on PSA-NCAM levels in hippocampal homogenates. C) Effects of chronic social isolation on hippocampal FGF2 levels. D) Effects of chronic social isolation on the expression of FGFR1 in hippocampal homogenates. E) Effects of chronic social isolation on synaptic levels of GluR1 and NR1 in the hippocampus.

Means and S.E.M. are shown. *p<0.05 STI vs control group; @p<0.05; @@p<0.01 LTI vs control group.

Conclusions

Using independent experiments, we evaluated the consequences of exposing aged male Wistar rats to short and long-term chronic social isolation. Our data showed that:

i) Morning plasma corticosterone levels and the relative weight of adrenal glands were significantly increased by long-term social isolation. Furthermore, anxiety-like behaviour was enhanced in the two socially isolated groups compared to control group.

ii) LTI rats displayed a slower acquisition of spatial reference in the Morris water maze compared to paired housed animals. In addition, LTI rats exhibited spatial memory impairment compared to group-housed animals.

iii) Stereological analysis of the volume of different hippocampal layers showed a reduction in the *stratum oriens* of CA1 pyramidal cells in STI and LTI rats compared to paired housed rats. No significant differences between groups were found in other layers of the hippocampus.

iv) A reduction in spine density on the molecular granular layer cells was observed in animals submitted to short- and long-term isolation procedures. In the *stratum oriens* of CA1 pyramidal cells, long-term, but not short-term, isolated rats showed a lower spine density compared to group-housed controls.

v) LTP in the dentate gyrus of the hippocampus was absent in LTI rats, but it was not affected in STI animals. In CA1, LTP was reduced in short-term isolated animals compared to group-housed rats, while LTP was absent in animals exposed to long-term isolation.

vi) The hippocampal levels of different molecules involved in learning and memory processes such as NCAM, PSA-NCAM, FGF2, FGFR1 and constituent subunits of AMPA and NMDA receptors were evaluated after chronic social isolation. The results showed a decrease in hippocampal levels of PSA-NCAM in the hippocampus that was not paralleled with a reduction in any of the main NCAM isoforms. Concerning hippocampal FGF2, there was a significant increase in STI rats that was not observed in LTI animals. Hippocampal FGFR1 levels were increased in LTI compared to controls. No significant differences in hippocampal synaptic levels of either NR1 or GluR1 were observed.

Study 3. Chronic FGL treatment reverses spatial memory impairment induced by long-term isolation

Continued exposure to stressful situations can cause cognitive impairment, which is believed to be connected with stress-induced neural damage in the hippocampus, a cerebral structure essential to learning and memory processes. Moreover, chronic stress has been postulated as one of the main epigenetic factors that can accelerate normal and pathological aging. Amongst the possible mechanisms underlying the neuronal damage caused by stress, the existence of a complex modulation of neurotrophic factors has been suggested, given that these molecules play a fundamental role in synaptic plasticity and neuronal survival. Thus, the FGF system appears to play an important role in neural mechanisms underlying memory formation and neural damage caused by stress. In prior studies carried out in rats, we confirmed that administration of a synthetic peptide that binds to fibroblast growth factor (FGF) receptors prevents spatial learning and memory deficit induced by chronic unpredictable stress. *In vitro*, FGL is capable of stimulating neurite outgrowth and promote neuronal survival. In this chapter the main objective was to study whether *in vivo* administration of FGL could prevent the cognitive deficit induced by long-term social isolation.

Experiment 7. Time-course plasma corticosterone levels during long-term social isolation and effects of FGL treatment on spatial learning and memory

The last experiment was designed to investigate whether a chronic pharmacological administration of FGL during twelve days after long-term social isolation might revert the deficit in spatial cognitive abilities observed in aged isolated animals. Before starting the experiment, groups were balanced according to animal weight. Initially, 18 month-old rats were randomly assigned to the following two groups: Control and LTI. In order to analyze time-course changes in plasma corticosterone levels induced by LTI, morning blood samples were collected by tail cuts across the three months of isolation procedure and before FGL treatment. When animals were 21 months old, they were divided into four different experimental groups: i) pair-housed animals treated with vehicle, ii) pair housed animals + FGL treatment, iii) LTI + vehicle and; iv) LTI + FGL treatment. Every two days during 12 consecutive days, animals received a subcutaneous injection with vehicle or FGL (Figure 34).

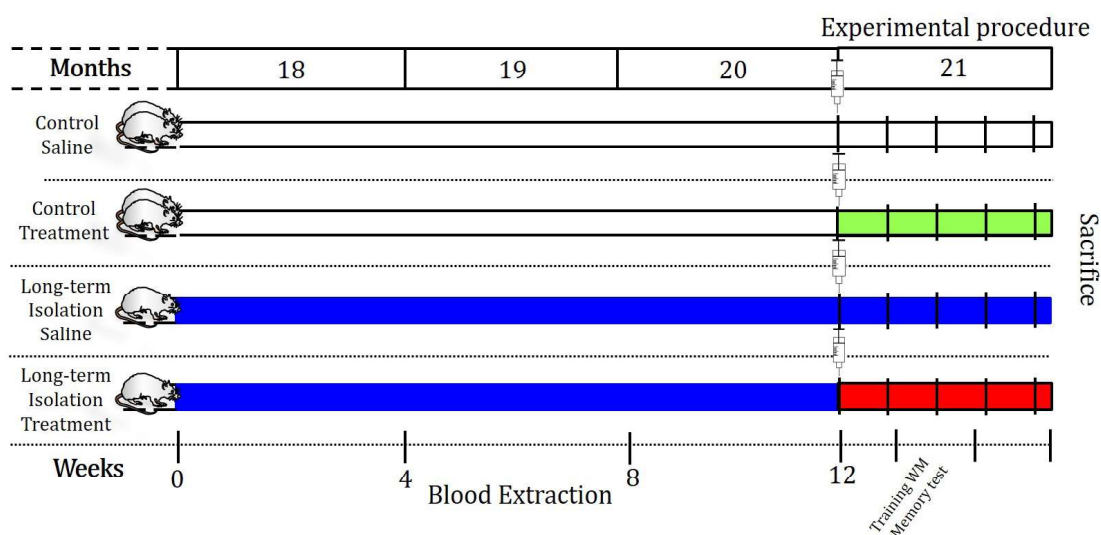


Figure 34: Seventh experimental design. Three months after social isolation started, animals were treated with FGL peptide or saline during twelve days. After one week of treatment, spatial learning and memory abilities of the animals were evaluated in the Morris water maze. Control+vehicle (n=10), Control+FGL (n=10), Long-term isolation+vehicle (n=9), Long-term Isolation+FGL (n=8).

1. Time course morning plasma corticosterone levels during long-term social isolation

Statistical analysis of morning plasma **corticosterone levels** in control and long-term isolation groups showed a significant group effect (Wald $X^2(1) = 7.477$, $p < 0.01$). There were no significant time or interaction (group x time) effects (Wald $X^2(3) = 7.236$, $p = 0.065$; Wald $X^2(3) = 3.732$,

$p=0.292$, respectively). Further analysis showed that LTI group had higher plasma corticosterone levels compared to controls in the 8th and 12th weeks (both $p < 0.05$) (**Figure 35**).

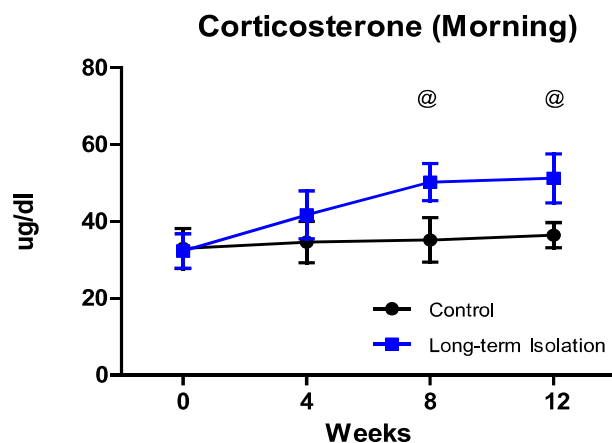


Figure 35. Morning plasma corticosterone levels of undisturbed (Control) and long-term isolated animals.

Means and S.E.M. are shown. LTI vs control group; @ $p < 0.05$

2. Effects of FGL treatment on spatial learning and memory in the MWM after long-term social isolation

Analysis of the latency to find the platform during the acquisition phase in the **MWM** after long-term chronic social isolation indicated the existence of significant differences in trial and (trial x group) interaction (Wald $X^2(10) = 38.83$, $p < 0.001$; Wald $X^2(30) = 1141.794$, $p < 0.001$, respectively). Further analysis of interaction showed that LTI+FGL animals needed more time to find the hidden platform vs control-veh at trial 5 ($p < 0.01$, respectively). In addition, LTI-vehicle animals needed more time to find the hidden platform vs control-veh at trial 11 ($p < 0.05$) (**Figure 36A**).

Statistical analysis of spatial memory of the animals revealed a significant group effect (Wald $X^2(3) = 18.476$, $p < 0.001$) in the first 1 min (**Figure 36B**). Further analysis revealed that LTI-vehicle animals spent less time in the target quadrant as compared with control vehicle animals ($p = 0.001$) as well as with control + FGL and LTI + FGL (both $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively).

Morris Water Maze: FGL Treatment

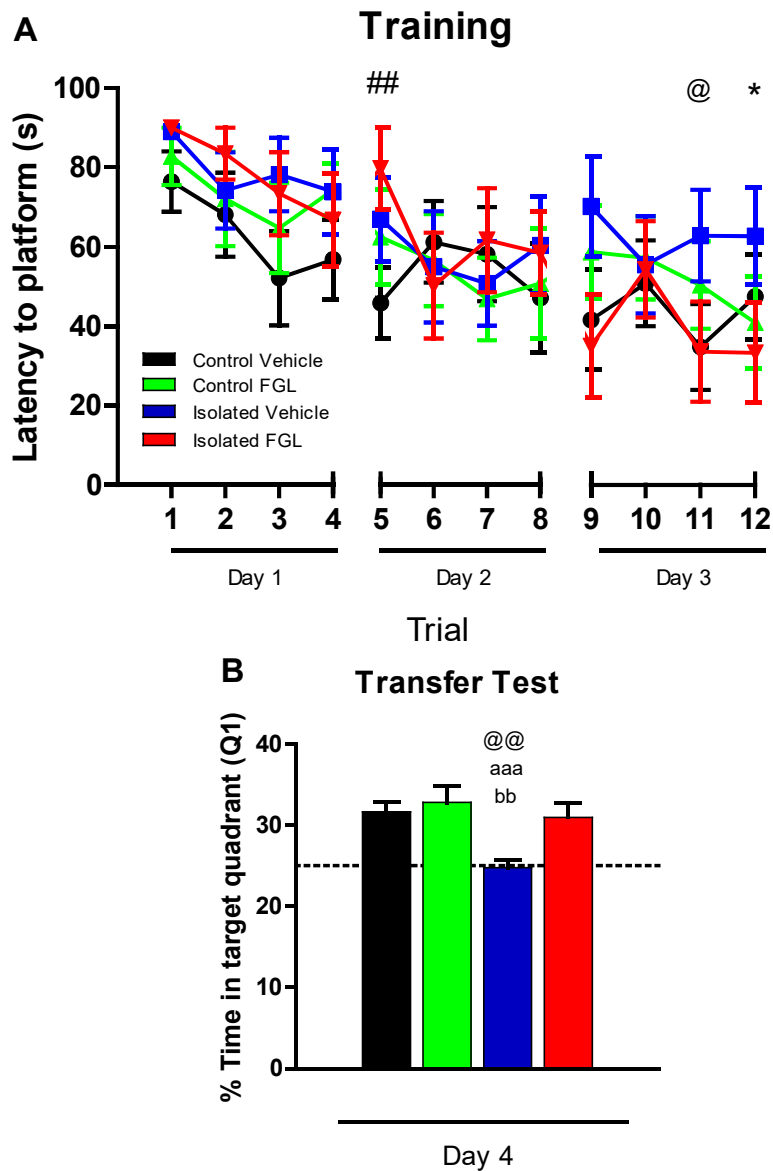


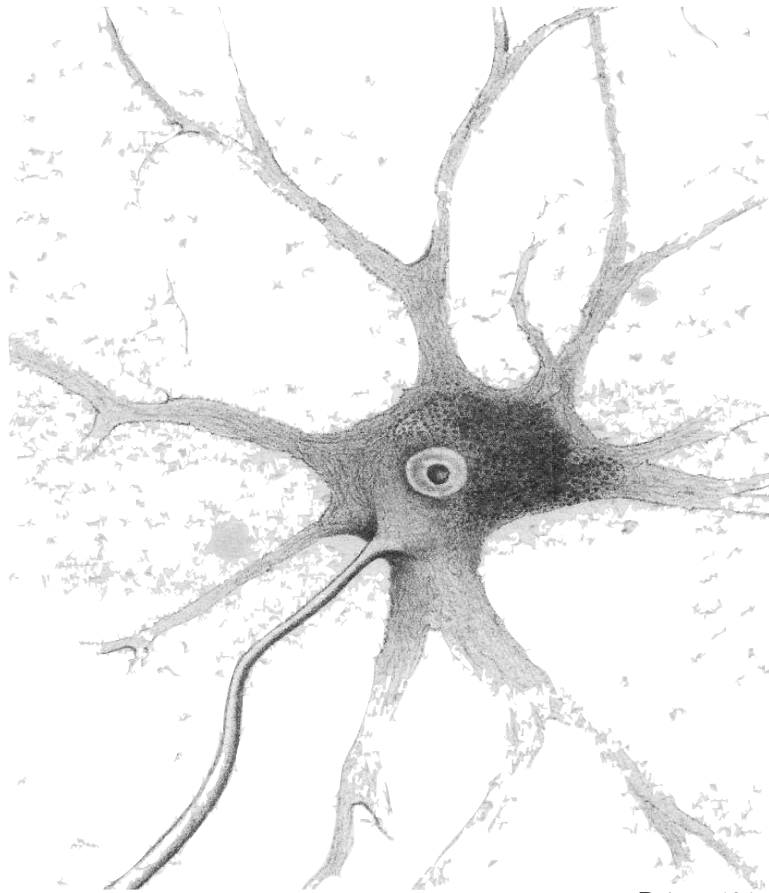
Figure 36. MWM performance of vehicle injected undisturbed animals (Control-vehicle), FGL treated-undisturbed animals (Control-FGL), animals exposed to long-term social isolation plus FGL treatment (isolated-FGL) or vehicle injection (isolated vehicle). **A**) Training scape latency. **B**) Transfer memory test.

Means and S.E.M. are shown. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$ LTI-vehicle vs control-vehicle group; ## $p < 0.01$ LTI+FGL vs control+vehicle group; aaa $p < 0.001$ LTI+vehicle vs control+FGL; bb $p < 0.01$ LTI vehicle vs LTI+FGL.

Conclusions

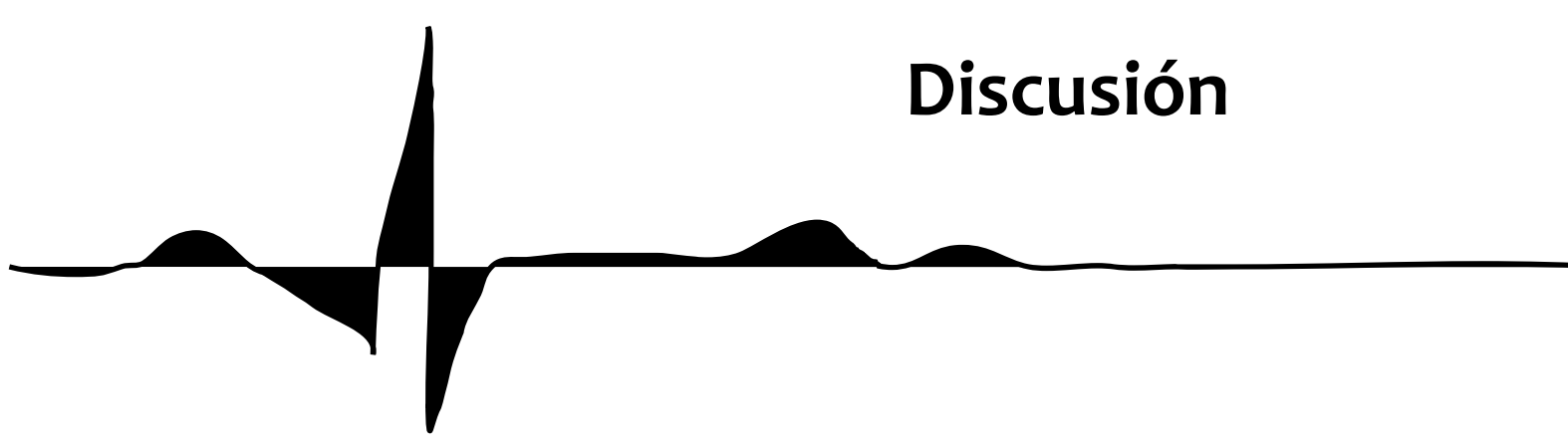
Our data showed that during morning, plasma corticosterone levels were increased from the 8th and the 12th week of social isolation.

In addition, long-term social isolation induced an impairment in spatial memory of aged rats that can be reverted by subchronic systemic administration with FGL.



Deiters, 1865

Discusión



Capítulo 1. El aislamiento social crónico en hembras de *Octodon degus*

En este primer capítulo, estudiamos los efectos a largo plazo del aislamiento social en hembras adultas de la especie *Octodon degus* utilizando un diseño experimental en el que se evaluaron parámetros fisiológicos, comportamentales, neuroanatómicos y bioquímicos.

El aislamiento social produce déficits en la memoria del miedo condicionado al contexto

Las hembras *degus* sometidas a un aislamiento social prolongado mostraron un déficit significativo en la memoria del miedo condicionado al contexto. Durante la fase de entrenamiento del condicionamiento del miedo, las hembras *degus* aisladas mostraron una reducción en el comportamiento de inmovilización tras la descarga eléctrica, que puede ser utilizado como una medida de memoria a corto plazo o “inmediata” del miedo al contexto (Fanselow, 1980; Wood & Anagnostaras, 2011). Además, los animales aislados mostraron un déficit en la memoria duradera del miedo condicionado al contexto (amígdala e HP dependiente), pero no en el recuerdo del miedo condicionado al tono (dependiente del control de la amígdala). Hasta donde sabemos, sólo hay un estudio en el que se ha evaluado con animales hembra el efecto de aislamiento social en la edad adulta sobre el condicionamiento del miedo al contexto. Este trabajo no mostró diferencias significativas en el condicionamiento del miedo entre hembras aisladas en comparación con las que vivían en grupo (Martin & Brown, 2010). En otros estudios realizados en ratones machos adultos se han obtenido resultados contradictorios después del aislamiento social, mostrando desde un déficit (Hsiao, Chen, Chen, & Gean, 2011), hasta la mejora de la memoria del miedo condicionado al contexto (Pibiri, Nelson, Guidotti, Costa, & Pinna, 2008). Curiosamente, se ha encontrado que el aislamiento social después del destete afecta de una manera más severa al condicionamiento del miedo (Chida, Sudo, Mori, & Kubo, 2006; Weiss, Pryce, Jongen-Rêlo, Nanz-Bahr, & Feldon, 2004; Yusufshaq & Rosenkranz, 2013). Las razones de estas diferencias no están claras, pero pueden deberse a diferentes factores como la edad de los animales en el momento de aislamiento, el tipo de especie o, incluso, la cepa utilizada en cada estudio.

Implicación y regulación de las moléculas de adhesión celular NCAM en el aislamiento social a largo plazo

La memoria del condicionamiento del miedo al contexto es una tarea dependiente del correcto funcionamiento hipocampal. Así pues, decidimos evaluar si las hembras *degus* adultas aisladas podrían mostrar alguna alteración en los niveles de NCAM y PSA-NCAM, moléculas involucradas

en la plasticidad sináptica del HP y en los procesos aprendizaje y memoria (Schachner, 1997). Los resultados obtenidos en esta tesis indicaron que, después del aislamiento social, los niveles sinápticos de PSA-NCAM en el HP se encuentran reducidos. Curiosamente, esta reducción en el contenido hipocampal de PSA-NCAM se restringió a los contactos sinápticos, pero no pudo ser atribuida a una reducción en los niveles sinápticos de NCAM en ninguna de las tres isoformas principales de NCAM. Existen estudios previos en los que se ha evidenciado que la exposición crónica a situaciones de estrés puede disminuir el contenido de PSA-NCAM en el HP (Bisaz, Schachner, & Sandi, 2011; Cordero et al., 2005; Foley, Rønn, Murphy, & Regan, 2003; Murphy, O'Connell, & Regan, 1996; Murphy & Regan, 1999; Sandi et al., 2003; Touyarot, Venero, & Sandi, 2004; Venero et al., 2002; Wielgat, Walesiuk, & Braszko, 2011). A diferencia de nuestros resultados, un trabajo previo en ratas machos adultas indicó que tras un mes de aislamiento social, los niveles sinápticos de PSA-NCAM se incrementaban en el HP y disminuían en la corteza frontal (Djordjevic, Djordjevic, Adzic, & Radjovic, 2012). Hay varias razones que pueden explicar estas discrepancias: en primer lugar, se debe tener en cuenta que la duración del aislamiento es sustancialmente más larga en nuestro estudio, 6½ meses frente a un mes en el estudio de Djordjevic y cols (2012). En segundo lugar, en nuestro estudio hemos utilizado hembras *degus* adultas en lugar de ratas macho adultas, y el aislamiento social podría afectar al estado de polisialización de NCAM de manera diferente dependiendo del género, así como de la especie animal investigada.

La reducción del contenido sináptico de PSA-NCAM en el HP que encontramos en las hembras aisladas *degus* podría estar relacionado con el deterioro en la memoria del miedo al contexto que se muestra en estos animales. Varias líneas de investigación indican el papel crítico de PSA-NCAM en el miedo condicionado al contexto: (i) Los niveles hipocampales de PSA-NCAM se modulan después del condicionamiento del miedo al contexto (López-Fernández et al., 2007; Merino, Cordero, & Sandi, 2000; Sandi et al., 2003); (ii) los estudios interventivos, en los que se añade PSA-NCAM o se usa endoneuraminidasa para escindir PSA de NCAM en el HP, modulan la consolidación de la memoria del miedo al contexto (López-Fernández et al., 2007; Senkov et al., 2006). Las propiedades de unión de PSA-NCAM y su capacidad para interactuar con otros receptores asociados a factores de crecimiento proporciona a esta molécula características especiales en la plasticidad sináptica (es decir, en la formación de sinapsis, selección y eliminación de contactos sinápticos), y afecta a la consolidación de diferentes destrezas en el aprendizaje, incluyendo el condicionamiento del miedo al contexto (Dityatev, Dityateva, & Schachner, 2000; Dityatev et al., 2004; Rutishauser, 2008; Sandi, 2004).

Cabe indicar que los ratones *knockout* para la polisialiltransferasa (ST8SialV/PST), la enzima responsable de la unión de PSA a NCAM, muestran un déficit en el condicionamiento del miedo al contexto, pero no en el condicionamiento del miedo al tono (Senkov et al., 2006). En consecuencia, los autores sugirieron que el PSA-NCAM no es relevante en la formación de tareas dependientes de la amígdala pero que, sin embargo, juega un papel fundamental en los procesos relacionados con el aprendizaje y en aquellos dependientes de la función del HP.

La molécula de PSA-NCAM puede modular la plasticidad sináptica y la memoria del miedo condicionado al contexto mediante la interacción con los receptores NMDA constituidos por las subunidades NR1/NR2B (Kochlamazashvili et al., 2010). Por ello, decidimos investigar qué subunidades podrían haberse alterado en el HP después del aislamiento social a largo plazo. Ambos grupos, tanto las hembras *degus* aisladas como las agrupadas, mostraron niveles sinápticos hipocampales de NR1 y NR2B similares. Dado que el PSA asociado a NCAM regula el aprendizaje y la plasticidad regulando la actividad de los receptores NMDA compuestos por NR1/NR2B (Kochlamazashvili et al., 2010), aunque los niveles sinápticos de estas subunidades en el HP no se hayan visto afectados por el aislamiento social a largo plazo, es posible especular que la disminución de los niveles sinápticos de PSA-NCAM observada en el HP de las hembras *degus* aisladas podría aumentar la transmisión mediada por NR1/NR2B, lo que resultaría en un deterioro de la memoria del condicionamiento del miedo al contexto.

El aislamiento social a largo plazo y su relación con los cambios en el volumen hipocampal

En el presente estudio se analizó el volumen total del HP en hembras *degus* y no se observó que estuviera afectado significativamente por el aislamiento social a largo plazo. No obstante, un análisis detallado de las distintas áreas hipocampales indicó que se producía una reducción significativa en el volumen de la región CA1, pero no de la región CA3 del HP. Teniendo en cuenta que la integridad y el funcionamiento de la región CA1 del HP es crítica para la memoria contextual (Hunsaker & Kesner, 2008; Hunsaker, Tran, & Kesner, 2009), consideramos que la atrofia de CA1 observada en el HP de las hembras *degus* aisladas podría estar relacionada con el deterioro de la memoria del miedo condicionado al contexto mostrado por estos animales. Aunque existe en la literatura una amplia información que indica que la exposición crónica a situaciones estresantes puede inducir cambios morfológicos en la arborización dendrítica y en las espinas de neuronas en el HP de animales macho (Uno, Tarara, Else, Suleman, & Sapolsky, 1989; Vyas, Mitra, Shankaranarayana Rao, & Chattarji, 2002), pocos estudios se han centrado en el análisis de los efectos del aislamiento en la morfología del HP u otras estructuras neurales de hembras. Por otro lado, cuando se ha contrastado el efecto entre ambos géneros se ha observado que el estrés crónico induce alteraciones en la morfología cerebral de ratas macho, pero no en hembras (Lin et al., 2008) (para revisión, ver McLaughlin, Baran, & Conrad, 2009). Además, se ha descrito que el estrés crónico no induce pérdida neuronal en ratones hembra (Takuma et al., 2012). Por lo tanto, la retracción en la región de CA1 observada en el presente estudio probablemente se deba a una atrofia dendrítica de las neuronas piramidales y/o a pérdida de la glía. Existe un estudio en el que se observó que las ratas criadas en aislamiento después del destete mostraron cambios neuroanatómicos en el HP de ratas hembra similares a los mostrados en el presente trabajo aunque, sin embargo, los animales machos mostraron un HP total menor, con reducción del volumen en el GD y CA2/CA3 (Fabricius, Helboe, Steiniger-Brach, Fink-Jensen, & Pakkenberg, 2010). Nuestros resultados actuales indican, por primera vez, que el aislamiento social a largo plazo en hembras adultas induce una reducción de la región CA1 del HP.

El aislamiento social crónico provoca un descenso en la ganancia de peso corporal y granulocitopenia, sin alterar los niveles de cortisol plasmático, ni del peso de las glándulas suprarrenales.

En este estudio observamos una reducción significativa en el aumento de peso corporal después del aislamiento social a largo plazo. Convencionalmente, una disminución en la ganancia del peso corporal se considera un marcador fisiológico de estrés psicosocial crónico, y se ha observado que ocurre en diferentes situaciones estresantes (Armario, Restrepo, Castellanos, & Balasch, 1985; Sachser & Lick, 1989). Sin embargo, en relación a la ganancia de peso corporal después del aislamiento social, los resultados son controvertidos porque se ha indicado que pueden variar en función de la especie, del género y del tiempo de aislamiento. De esta manera, algunos grupos de investigación han observado una reducción en la ganancia de peso corporal en ratas macho (Pere-lló, Chacon, Cardinali, Esquifino, & Spinedi, 2006), mientras que otros estudios no han encontrado alteraciones del peso en ratas y cobayas (Hull, Rosselli, & Langan, 1973; Pérez et al., 1997) o, incluso, han descrito un incremento de peso en ratones (Martin & Brown, 2010) y hámsters (Castro & Matt, 1997).

Aunque la ganancia de peso corporal se redujo en las hembras *degus* aisladas a largo plazo, el peso de las glándulas adrenales y de los niveles plasmáticos de cortisol en estos animales fueron similares a los que mostraron los animales que vivían en grupo. A este respecto, en los roedores se han observado cambios inconsistentes en cuanto a la concentración plasmática de los glucocorticoides después de un aislamiento social crónico en la edad adulta. Así, algunos estudios indicaron que los niveles plasmáticos de corticosterona se vieron incrementados en los animales aislados socialmente (Brain & Benton, 1979; Dronjak, Gavrilović, Filipović, & Radojčić, 2004; Ehlers, Kaneko, Owens, & Nemeroff, 1993), mientras que otros grupos encontraron que no se alteraban sus niveles (Grippe, Gerena, et al., 2007; Pournajafi-Nazarloo et al., 2011; Scaccianoce et al., 2006), o incluso se veían disminuidos (Djordjevic, Djordjevic, Adzic, & Radojicic, 2010). La inconsistencia entre estos resultados probablemente sea debida a las divergencias metodológicas existentes entre los diferentes estudios, que presentan una variabilidad notable en la cepa, sexo, tiempo de aislamiento, así como la fase del ciclo circadiano en el que se obtienen las muestras. Cabe indicar que diversos laboratorios coinciden en señalar que la respuesta del eje HHA aumenta en animales aislados respecto a animales estabulados en grupo (Baldwin, Wilcox, & Bayliss, 1995; Ehlers et al., 1993; Giralt & Armario, 1989).

Por otra parte, en nuestro estudio, el hemograma indicó que los animales aislados mostraron una reducción en los niveles de granulocitos, en comparación con los animales agrupados. En un estudio previo (Wilson, Terosky, Stull, & Stricklin, 1999) se indicó que el aislamiento social durante 4 o 18 semanas no alteraba, en plasma, el número de neutrófilos; los granulocitos más abundantes y principales fagocitos que forman la primera barrera en la defensa celular contra la infección microbiana. Nuestros datos indican que la reducción en el número de granulocitos observada tras el aislamiento social podría suponer una reducción en la resistencia a infecciones bacterianas y fúngicas del cuerpo (Tunkel & Sepkowitz, 2002).

Capítulo 2. El aislamiento social a corto y largo plazo en ratas macho Wistar

En este segundo capítulo hemos estudiado los efectos a corto y largo plazo del aislamiento social en ratas Wistar viejas utilizando un diseño experimental multidisciplinar (fisiológico, comportamental, morfológico, electrofisiológico y molecular).

A su vez, hemos investigado si la administración sistémica del FGL, un péptido mimético de NCAM, puede tener utilidad terapéutica para revertir los efectos que tiene el aislamiento social a largo plazo en el deterioro cognitivo.

El aislamiento social como situación de estrés

A lo largo de este segundo bloque hemos observado que los animales viejos aislados socialmente, ya fuera durante un periodo de un mes o de tres meses, muestran diversos signos de haber estado sometidos a una situación estresante, destacando los siguientes puntos:

i) El aislamiento social, al igual que en las hembras *degus*, produjo un descenso en el peso corporal de los animales, un efecto que se observa frecuentemente en situaciones de estrés, y que ya indicó Selye en 1936 al describir el Síndrome General de Adaptación. Aunque los animales aislados socialmente durante tres meses presentaron una recuperación de su peso corporal, al finalizar el periodo de aislamiento no llegaron a alcanzar la misma ganancia de peso que los animales control. Este resultado coincide con algunos estudios de investigación realizados en roedores que fueron sometidos a estrés crónico, tanto por aislamiento social como por otros tipos de estresores (Chida, Sudo, & Kubo, 2005; Miklós & Kovács, 2012; Zelena et al., 2003). No obstante, cabe mencionar, como ya apuntamos en el capítulo anterior, que existe controversia respecto a tales resultados. En este sentido, además de los ya mencionados, otro ejemplo destacable es el trabajo realizado por Grippo y colaboradores. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los pesos corporales de topillos de la pradera hembras sometidas a aislamiento social (Grippo, Trahanas, Zimmerman, Porges, & Carter, 2009). Sin embargo, es necesario remarcar que en este trabajo se emplearon hembras adultas de una especie diferente a las ratas, y con la peculiaridad de presentar además algunas diferencias respecto a nuestro modelo, como el hecho de que los topillos tienen ciclos circadianos de actividad y tasa cardíaca poco definidos, lo cual supone diferencias interespecie importantes a tener en cuenta a la hora de comparar resultados.

Es importante destacar que, dada la relación entre el metabolismo y la respuesta al estrés, las modulaciones en el estado metabólico debidas a las pérdidas de peso inducidas por el estrés crónico pueden representar un componente sustancial de la respuesta fisiológica a la exposición prolongada al estresor (Joseph-Bravo & de Gortari, 2014). Así, cabría esperar que la pérdida en el

peso corporal, y finalmente la menor ganancia de peso corporal, provocara un menor peso de las glándulas adrenales, y atenuara la expresión de CRH en el PVN, lo que reduciría la activación del eje HHS (Flak, Jankord, Solomon, Krause, & Herman, 2011). Sin embargo, hemos encontrado que el peso relativo de las glándulas suprarrenales (peso de las glándulas suprarrenales en relación al peso corporal) se ha visto incrementado en las ratas macho aisladas durante un largo periodo de tiempo, de manera similar a lo que se ha descrito en otros estudios con animales sometidos a estrés crónico (Gómez, Lahmame, de Kloet, & Armario, 1996; Rygula et al., 2005; Ulrich-Lai et al., 2006).

ii) Al finalizar la octava semana de aislamiento, las ratas macho aisladas mostraron un incremento en los valores matutinos de corticosterona en comparación con sus controles. Este incremento se mantuvo hasta la última semana del aislamiento a largo plazo. Por tanto, nuestros resultados indican que los animales expuestos a un aislamiento social prolongado liberan mayor cantidad de glucocorticoides, posiblemente debido a una activación del eje HHS en respuesta al aislamiento social, que puede ser considerado una situación de estrés. A este respecto, y como ya indicamos en el capítulo anterior, existen resultados contradictorios en la literatura. Así, algunos autores han indicado que el aislamiento social produce una disminución en los niveles basales de corticosterona cuando aquél se prolonga trece semanas (Miachon, Rochet, Mathian, Barbagli, & Claustrat, 1993); otros no encuentran diferencias con una semana de aislamiento (Niesink & van Ree, 1983) y otros describen, incluso, un incremento en los niveles de esta hormona en ratones aislados (Misslin, Herzog, Koch, & Ropartz, 1982; Miyashita et al., 2006). Este hecho puede ser debido a la multitud de variables a tener en cuenta en cada estudio, entre las que cabe destacar la especie, el género y la duración del periodo de aislamiento.

Junto al incremento en los niveles matutinos de corticosterona plasmática observado en los animales aislados, también debemos tener en cuenta que se produjo un incremento del peso relativo de las glándulas suprarrenales lo cual es indicativo de un incremento en la actividad del eje HHS y posiblemente del SMA. El incremento en la actividad del eje HHS fue gradual, estando los niveles plasmáticos de corticosterona significativamente elevados en los animales aislados desde la octava semana de aislamiento. Además, como discutiremos más adelante, es importante señalar que en las dos primeras semanas también se observó un incremento en la actividad locomotora durante su periodo de menor actividad y una desregulación de la actividad cardíaca a lo largo de la fase diurna, lo cual hace suponer que el aislamiento social produce una alteración progresiva del funcionamiento del SNS-HHS.

iii) Las ratas aisladas mostraron un menor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, lo cual es indicativo de un mayor estado ansiogénico. Este hecho ha sido descrito de manera similar por otros autores (Serra, Pisu, Floris, & Biggio, 2005) y también en nuestro laboratorio (Cruces, Venero, Pereda-Pérez, & De la Fuente, 2014), aunque existe un trabajo en donde se ha descrito el efecto opuesto que ha sido interpretado como una mayor curiosidad y actividad exploratoria en los animales (Thorsell, Slawecki, El Khoury, Mathe, & Ehlers, 2006).

En el experimento de radiotelemedría el aumento en los índices de ansiedad en los animales aislados no fue significativo, pero se constató que la tasa cardíaca se vio afectada como consecuencia del aislamiento. Las ratas controles presentaron una mayor tasa cardíaca respecto a las aisladas. Los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado son una región en donde los animales suelen presentar un aumento en su estado ansiogénico. Así, al acercarse a los brazos abiertos, los animales desarrollan comportamientos de evaluación del riesgo, y se ha descrito que los niveles plasmáticos de corticosterona correlacionan con dicha conducta (Rodgers et al., 1999). Además, se ha observado que si los animales son confinados en los brazos abiertos del laberinto en cruz se produce un mayor incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona en comparación con animales confinados en los brazos cerrados (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). Así pues, es de esperar que los animales que permanecen más tiempo expuestos en la zona de los brazos abiertos muestren una mayor frecuencia cardíaca (Grippio, Lamb, Carter, & Porges, 2007). Además, la actividad total de las ratas aisladas resultó ser significativamente más alta en comparación con la del grupo control. Estos resultados van en consonancia con lo descrito por otros grupos de investigación que observaron un aumento en la actividad locomotora en la prueba de campo abierto en animales aislados (Gentsch, Lichtsteiner, Frischknecht, Feer, & Siegfried, 1988; Ishikawa, Ogawa, Owada, & Ishikawa, 2014).

lv) El aislamiento social favoreció que los animales mostraran una mayor conducta de tipo depresiva en la prueba de natación forzada; que fue desarrollada en 1978 por Porsolt y colaboradores. Utilizando la telemetría, hemos comprobado que durante la prueba de Porsolt se produce una actividad cardíaca elevada que puede ser debida tanto a la actividad física asociada a la natación, como a la situación altamente estresante que supone para el animal nadar y no encontrar escapatoria. Este hecho se ha visto reflejado en los valores elevados de la tasa cardíaca tanto el primer día de la prueba como el segundo, lo cual puede ser motivo para que no se hayan observado diferencias significativas en la tasa cardíaca entre los animales controles y los aislados. Sin embargo, cuando se estudiaron los niveles de actividad física durante el primer día de la prueba, sí se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el primer minuto de la misma. El primer día, las ratas controles manifestaron una alta capacidad de lucha y mayor comportamiento para tratar de escapar del recipiente cilíndrico con agua al comienzo de la prueba, en comparación con las ratas aisladas. Durante el segundo día, los comportamientos de lucha y escape se vieron atenuados, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos.

En conjunto, los resultados fisiológicos obtenidos por telemetría, junto con los estudios comportamentales, apuntan a que hay un aprendizaje de la prueba tras la primera exposición al test. Son varios los autores que han defendido la validez conductual de la primera sesión de exposición al recipiente cilíndrico con agua, pero no de la segunda, dado que tras la primera sesión los animales aprenden que no hay escapatoria. Como consecuencia, cuando los animales son expuestos a la segunda sesión, ya ha habido un aprendizaje de la situación experimentada en la primera sesión y, por tanto, luchan menos por escapar del recipiente cilíndrico (Borsini & Meli, 1988; De Pablo, Parra, Segovia, & Guillamón, 1989; West, 1990). Por tanto, el hecho de que durante el primer día de la prueba de Porsolt los animales aislados socialmente durante un mes presentasen una me-

nor actividad y un mayor tiempo de inmovilización es indicativo de que el aislamiento social induce un comportamiento de tipo depresivo. Nuestros resultados están en consonancia con lo descrito por otros autores que indicaron que después de un corto y/o largo periodo de aislamiento social se produce un mayor comportamiento de tipo depresivo en los animales (Bourke & Neigh, 2011; Martin & Brown, 2010; Mathews, Wilton, Styles, & McCormick, 2008; Parmigiani, Palanza, Rogers, & Ferrari, 1999; Yates, Panksepp, Ikemoto, Nelson, & Conner, 1991).

Por otra parte, en nuestro estudio observamos que la temperatura corporal en la primera y segunda sesión del test de Porsolt fue significativamente inferior en las ratas aisladas en comparación con las controles. Cabe señalar que en este resultado puede haber influido que existen diferencias de peso corporal entre ambos grupos de animales. Posiblemente la pérdida de peso y, por tanto, de grasa corporal en los animales aislados haya podido reducir su aislamiento térmico (Young, 1976), favoreciendo que hubiera una mayor pérdida de calor durante la ejecución de esta prueba.

Tasa cardíaca y ciclo circadiano: Activación simpática en el aislamiento social a corto plazo

En nuestro estudio hemos observado que, a partir de la primera semana de aislamiento, el grupo de ratas aisladas mostró una tasa cardíaca superior a la del grupo de animales controles durante la fase de luz, manteniéndose esta diferencia en la segunda semana del aislamiento. En la literatura no hemos encontrado ningún estudio que haya estudiado los efectos cardiovasculares del aislamiento social en ratas viejas. No obstante, los análisis realizados en el presente estudio han puesto de manifiesto resultados similares a los mostrados por otros trabajos de investigación previos en otras especies animales, según los cuales, el aislamiento social produce cambios cardiovasculares similares a los que se observan en situaciones de estrés crónico *moderado* (con aumento de tasa cardíaca, y descenso de HRV). Así, el aislamiento social da lugar a alteraciones en el sistema autónomo, incluyendo disfunciones cardíacas, y en el estado de ánimo (Grippe et al., 2009). Cabe señalar que un estudio previo (Grippe, Beltz, & Johnson, 2003) indicó que un grupo de ratas sometidas a un estrés crónico moderado durante cuatro semanas mostró anhedonia, reducción de la actividad locomotora y, al igual que lo que hemos observado en nuestros animales aislados, elevación de la tasa cardíaca y reducción de su variabilidad. Aunque en este trabajo mostraron que en las 4 semanas posteriores de recuperación del estrés la anhedonia y la actividad locomotora revirtieron a los niveles normales, los cambios cardiovasculares siguieron siendo patentes durante este tiempo. El incremento en la actividad cardíaca y la reducción en la variabilidad de la tasa cardíaca que hemos observado en las ratas aisladas podría reflejar una activación simpática (para revisión ver Stein & Kleiger, 1999). Se ha descrito que en el envejecimiento la actividad simpática aumenta en distintos órganos, incluido el corazón (Esler et al., 1995; Seals & Esler, 2000) y que un incremento en dicha actividad está relacionado con diversas alteraciones cardiovasculares cuya incidencia aumenta con la edad como el fallo cardíaco o la arritmia ventricular (Esler & Kaye, 2000). Por tanto,

nuestros datos sugieren que el aislamiento social en el envejecimiento produce un incremento en la actividad simpática que podría dar lugar a alteraciones cardiovasculares asociadas a la edad.

En nuestro estudio hemos observado que, a lo largo de todo el periodo de aislamiento social, la actividad locomotora de las ratas en sus jaulas de estabulación fue similar en el grupo aislado y control durante la fase oscura. Sin embargo, durante la fase de luz observamos un aumento progresivo de la actividad total de las ratas aisladas con respecto a las ratas controles, siendo significativa esta diferencia durante las tres primeras semanas de aislamiento. La mayor actividad física de las ratas aisladas durante la fase de luz puede deberse a un aumento de trastornos asociados al estrés como la ansiedad o la alteración en los patrones circadianos de actividad y sueño (Grippe, Wu, Hassan, & Carter, 2008). A este respecto, en la literatura existen varios trabajos que indican que el estrés crónico produce un mayor comportamiento de tipo ansioso y depresivo, alteraciones en el ritmo circadiano, así como deficiencias cognitivas (Aslani et al., 2014; para revisión ver McEwen, 2012).

Por el contrario, la temperatura corporal mostró únicamente diferencias significativas durante la primera semana de aislamiento en la fase diurna, aunque se mantuvo inalterable en el resto de las semanas de aislamiento, tanto en la fase de luz, como de oscuridad. *A priori*, el aumento de la temperatura corporal de las ratas aisladas podría explicarse como signo de la activación simpática producida por el estrés que supone el aislamiento social (Nijssen et al., 1998).

En conjunto, las alteraciones cardiovasculares, de temperatura corporal y de actividad física apuntan a que el aislamiento social produce una activación simpática general que puede haber contribuido a la menor ganancia de peso corporal observada en los animales aislados. En un estudio realizado por Flak y colaboradores (2011), se observó que en roedores sometidos a estrés crónico variable se produce una activación del SNS y del HHS, cuya consecuencia final es la liberación de glucosa desde los almacenes de energía, lo que puede afectar el equilibrio energético. Como indicamos en la introducción, los cambios metabólicos activan el eje HHS y el SNS y, sumado a ello, en las respuestas conductuales al estrés, se incrementa la probabilidad de producirse un desequilibrio en la variabilidad de la tasa cardíaca hacia la activación simpática. Según Flak y cols. (2011), una menor ganancia de peso corporal ayuda a contrarrestar un efecto cardiovascular más severo del estrés.

El aislamiento social produce un déficit en las capacidades de aprendizaje espacial

Los resultados obtenidos en el laberinto acuático de Morris mostraron que el grupo de animales aislados presentaban un déficit en las capacidades de aprendizaje espacial de referencia. Hoy en día existe un gran consenso en la literatura al considerar que el estrés es un potente modulador de la función cognitiva y, más concretamente, de los procesos de aprendizaje y memoria (Conrad,

2010). Diversos estudios de experimentación animal han puesto de manifiesto que cuando el aislamiento social se produce en el periodo postnatal induce cambios psicopatológicos en los roedores (Heim & Nemeroff, 1999). Además, apoyando nuestros resultados, se ha visto que las alteraciones cognitivas observadas en animales tras la exposición a situaciones de estrés crónico incluyen, entre otras, un déficit en las capacidades de aprendizaje y memoria espacial (Sandí, Venero, & Cordero, 2001). Por otra parte, nuestros resultados coinciden con los del primer estudio que encontramos al comienzo del proceso de documentación al inicio de esta Tesis, en el que se investigó el efecto del aislamiento social durante la vejez en las capacidades de aprendizaje y memoria espacial (Arranz, Giménez-Llort, De Castro, Baeza, & De la Fuente, 2009), si bien este estudio fue realizado en ratones hembra.

El aislamiento social induce cambios en el volumen hipocampal

El HP es una de las principales estructuras cerebrales diana del estrés y los glucocorticoides, pudiendo verse afectada no solo su estructura, sino también su función. En nuestro estudio, el análisis volumétrico de la capa oriens de CA1 reveló que los grupos de animales aislados socialmente, tanto a corto como largo plazo, mostraban un menor volumen en esta región en comparación con los animales controles. Existen diversos trabajos de investigación en la literatura en los que se ha descrito que la exposición crónica a situaciones de estrés produce alteraciones en el volumen de distintas áreas del HP (para revisión ver Kim, Pellman, & Kim, 2015; Sousa, Lukoyanov, Madeira, Almeida, & Paula-Barbosa, 2000; Watanabe, Gould, & McEwen, 1992). Asimismo, se ha estudiado que el aislamiento social durante 15 semanas tras el destete produce una disminución en el número de células del GD y de las áreas CA2/3 en el HP (Fabricius et al., 2010). Otros estudios en roedores han indicado que la exposición crónica a una situación de estrés también provoca la pérdida de neuronas en CA3 y en el GD del HP (McEwen, 1999). Más aún, en nuestro laboratorio se ha descrito que, en ratas, el estrés crónico impredecible durante la edad adulta reduce el número de células granulares en el GD del HP cuando los animales son viejos (Borcel et al., 2008).

Los resultados mostrados en el presente capítulo van en consonancia con lo publicado por nuestro laboratorio en el año 2013 en hembras *degus* y que ya indicamos en el primer capítulo. Este hecho es importante teniendo en cuenta que el correcto funcionamiento de CA1 es necesario para la recuperación de recuerdos contextuales (Hunsaker & Kesner, 2008; Hunsaker et al., 2009), si bien la capacidad de aprendizaje y memoria espacial depende de la función de toda la estructura hipocampal en su totalidad (Moser, Moser, & Andersen, 1994). Recientemente Fabricius y colaboradores describieron que en las ratas criadas en aislamiento social después del destete se producen cambios neuroanatómicos similares a los obtenidos en el presente estudio, y destacados anteriormente. Sin embargo, en aquél, aunque los animales macho aislados en comparación a los correspondientes controles mostraron un descenso en el volumen hipocampal con cambios significativos en la región de CA3, los cambios significativos en la región de CA1 se observaron en las ratas hembra (Fabricius et al., 2010).

Por todo esto, la hipótesis de la hiperactivación del eje HHS, que hemos propuesto en el apartado anterior, podría explicar, al menos en parte, la disminución del volumen de áreas cerebrales concretas que tienen una alta concentración de receptores para los glucocorticoides como el hipocampo, en donde los glucocorticoides ejercen acciones críticas sobre la morfología y la supervivencia neuronal (McEwen & Gianaros, 2010), lo cual permitiría entender los efectos morfológicos mostrados en este estudio.

Análisis de la densidad de espinas en neuronas granulares del GD y piramidales de CA1 tras el aislamiento social a corto y largo plazo

Los efectos observados en los grupos de aislamiento social durante la vejez en relación a la densidad de espinas dendríticas de las neuronas del GD indican que se produce una disminución en la densidad de aquéllas a lo largo del árbol dendrítico que proyecta hacia la capa molecular, tanto en la región proximal como distal. Por otra parte, los cambios producidos en la densidad de espinas en las dendritas de la capa *oriens* de CA1 parecen ser persistentes únicamente en los animales aislados durante un largo periodo de tiempo. En la literatura, únicamente hemos encontrado dos trabajos que, coincidiendo con nuestros resultados, muestran un descenso en la densidad de espinas dendríticas en la región de CA1 en animales aislados bien cuando eran jóvenes (Moser, Trommald, Egeland, & Andersen, 1997) o después del destete (Silva-Gómez, Rojas, Juárez, & Flores, 2003). Estos hechos apoyan la idea de la existencia de un déficit en la plasticidad sináptica observada y, a su vez, de un déficit funcional, como el deterioro cognitivo mostrado por los animales aislados en las pruebas de aprendizaje y memoria realizadas durante la prueba del laberinto acuático.

Como mencionamos anteriormente, la menor densidad de espinas, tanto en la región proximal como distal del árbol dendrítico de las neuronas granulares del GD, podría suponer una alteración en la entrada de información al HP desde la CE, así como del paso de la misma hacia las células piramidales del área CA3 del HP, que terminan en el *stratum oriens* de CA1 (Szirmai, Buzsáki, & Kamondi, 2012). A su vez, el descenso en la densidad de espinas de las dendritas de las neuronas de CA1 en los animales aislados a largo plazo puede inducir a suponer que las proyecciones del HP a la región entorrinal se encuentren afectadas o que la información que llega es menos precisa y, por tanto, la información relativa al aprendizaje y la memoria no pueda ser procesada de manera correcta según lo reflejado en la prueba del laberinto acuático de Morris.

En concreto, numerosos estudios han demostrado la relación que existe entre el estrés crónico y la retracción dendrítica (Bartesaghi, Raffi, & Ciani, 2006; Bartesaghi, Severi, & Guidi, 2003; Kassem et al., 2013; Lucassen et al., 2014; Uno et al., 1989; Vyas et al., 2002). Por tanto, el declive en las capacidades cognitivas y la disminución del volumen de la capa *oriens* de CA1 observado en nuestros animales aislados podría guardar relación con alteraciones en la morfología neural (tanto en número de espinas, como en la ramificación del árbol dendrítico) y/o pérdida de la glía, dado que, tradicionalmente se ha asumido que el déficit cognitivo que produce la exposición crónica a situa-

ciones de estrés está relacionado con alteraciones morfológicas. Sin embargo, hay otros trabajos que han hallado resultados contradictorios al respecto (Conrad, LeDoux, Magariños, & McEwen, 1999; Conrad, 2006; Luine, Villegas, Martinez, & McEwen, 1994; Pawlak et al., 2005); ello nos aporta nuevas consideraciones que apoyarían los resultados obtenidos en nuestra investigación, es decir, el comportamiento de tipo ansioso observado en los animales podría ir en consonancia con la modificación dendrítica parcial o total de las neuronas del HP.

Por tanto, y a modo de resumen, destacamos que en el aislamiento social a corto plazo se produce un descenso en la densidad de espinas de la región del GD, pero no en CA1. Sin embargo, con el trascurso del tiempo en aislamiento social, la disminución en la densidad de las espinas se ve agravada hasta llegar a afectar también a las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1.

Por todo lo expuesto anteriormente, podríamos argumentar que la disminución en el volumen de la capa *oriens* de CA1 del HP que induce el aislamiento social haya podido ser debida, al menos en parte, a una atrofia significativa de las dendritas de las neuronas piramidales, además de una disminución en la densidad de sus espinas. Si esto fuera así, una menor arborización y/o densidad de las espinas dendríticas implicaría una menor capacidad del HP para enviar información neocortical alterando el balance excitatorio/inhibitorio de todo el circuito intrahipocampal (Ahmed & Mehta, 2009).

Efectos del aislamiento social sobre la plasticidad hipocampal

Los estudios electrofisiológicos de nuestro trabajo indicaron que, tanto en la región de CA1 como del GD del HP, la potenciación fue más débil en el grupo de ratas aisladas a largo plazo en comparación con los controles. Por el contrario, en el grupo de ratas aisladas a corto plazo, la potenciación se mantuvo sin diferencias relevantes respecto a los del grupo control.

Aunque no hemos encontrado ningún trabajo en el que relacionen el aislamiento social y la plasticidad en la vejez, en la literatura específica destacamos una investigación (Bartesaghi et al., 2006) en la que se estudiaron, en cobayas, los efectos del aislamiento en la edad temprana sobre el procesamiento de la señal a lo largo del sistema de la CE-GD-CA3-CA1; un circuito que resulta importante para la formación de la memoria. En dicha investigación que mencionamos, a los 6-7 días de edad, cobayas machos y hembras fueron distribuidos en dos grupos; animales agrupados y aislados socialmente. A los 90-100 días de edad se hicieron los registros electrofisiológicos, y el análisis de la función de entrada-salida del potencial postsináptico excitatorio poblacional en las diferentes estructuras cerebrales mostró que en los machos aislados tuvieron una pequeña reducción en la función de entrada-salida del potencial postsináptico excitatorio poblacional, así como en los potenciales evocados en la capa II de la CE. Sin embargo, en su estudio no encontraron cambios electrofisiológicos en la CE de las hembras aisladas. El análisis de la función de entrada-salida en los potenciales postsinápticos excitatorios y en los potenciales evocados de la población de neuronas

del GD, CA3 y CA1 se redujo tanto en los machos como en las hembras aisladas, si bien el efecto fue mayor en machos. Este trabajo proporciona evidencias de que el mal funcionamiento de la red del HP puede ser la base de los déficits de aprendizaje inducidos por un entorno de aislamiento durante la vida temprana (Bartezaghi et al., 2006).

Por otra parte, en nuestro trabajo mostramos por primera vez que el aislamiento social en la vejez resulta ser también una fase crítica en la que el circuito GD-CA1 se ve fuertemente influenciado no solo por el aislamiento *per se*, sino por la temporalidad que tenga éste sobre el organismo. Esto es así porque nuestros resultados ponen de manifiesto que la progresión en el deterioro de la plasticidad en el HP se produce inicialmente con una tendencia, aunque no significativa, en la región de CA1 (aislamiento a corto plazo), para terminar afectando también a la región del GD tras un largo periodo de aislamiento.

Es posible que este avance en el deterioro de ciertas regiones del HP pueda ser explicado porque los efectos causados por el tipo y duración del estrés probablemente difieran de unas áreas cerebrales a otras. Por ejemplo, en CA1 se ha observado que bajo condiciones de estrés, tanto predecible como impredecible, la LTP se ve reducida (Joëls & Krugers, 2007), mostrando ser un área especialmente vulnerable a sufrir mayores cambios electrofisiológicos que otras regiones. Además, en la línea de nuestros resultados, esta reducción en la LTP guarda una estrecha relación con el aumento de la corticosterona mostrada en los animales, resultando ser los GCs moduladores de la plasticidad de CA1 y del GD (Sharvit, Segal, Kehat, Stork, & Richter-Levin, 2015). Más aún, Kavushansky y colaboradores han demostrado que la activación de la amígdala basolateral es la responsable de reducir los niveles de LTP en CA1 bajo condiciones de estrés (Kavushansky, Vouimba, Cohen, & Richter-Levin, 2006). En conjunto, los resultados publicados en la bibliografía en relación a los efectos de los GCS y el estrés pueden ayudar a explicar que el grupo de animales aislados socialmente a corto plazo muestre una tendencia a una disminución de la LTP en CA1, y que cuando las condiciones de aislamiento social se prolongan, el deterioro de la plasticidad del sistema se haga evidente tanto en CA1 como en DG, tal y como hemos observado en los animales aislados socialmente a largo plazo.

De acuerdo con los datos obtenidos en la densidad de espinas dendríticas y en relación con los resultados mostrados en la plasticidad sináptica, se podría especular que la transmisión y/o los contactos en la entrada de información comienzan a verse afectados, en primera instancia, tras un corto periodo de aislamiento. Esta variación inicial no sería suficiente para producir efectos significativos en la memoria espacial, para la cual mantener la capacidad de inducción de la LTP en CA1 parece ser más crucial que en el GD (Okada et al., 2003).

De la misma forma, en los animales aislados durante un largo periodo de tiempo, las áreas de CA1 y del GD se encuentran afectadas de manera más severa tanto en la densidad de espinas de sus neuronas, como en la inducción de la LTP, reflejando una reducción de la función sináptica del sistema GD-CA1 que puede estar relacionada con el déficit de memoria espacial que muestran

estos animales. Esta suposición se basa en que, como hemos indicado, las neuronas piramidales de la región de CA1 constituyen una red de interconexiones en ambos sentidos, que involucra no sólo a conexiones axonales, sino también interneuronales, que conectan con la CE, así como con amplias regiones de la corteza prefrontal, jugando un papel fundamental en el balance excitatorio/inhibitorio (Admed y Mehta, 2009). Además, es importante destacar que tanto la región dorsal de CA1 como el *subiculum* están involucrados en el procesamiento de la información espacial y la memoria (McNaughton et al., 1996; Morris, Schenk, Tweedie, & Jarrard, 1990; O'Mara, Sanchez-Vives, Brotons-Mas, & O'Hare, 2009; Shansky & Morrison, 2009). Por tanto, es razonable postular que las alteraciones en la plasticidad sináptica en ambas regiones del circuito del HP encontradas en los animales aislados a largo plazo contribuyan a los déficits de la memoria espacial observados, de manera similar a como se ha descrito que ocurre tras la exposición a una situación de estrés (Fa et al., 2014; Joëls & Krugers, 2007).

En resumen, los animales aislados a largo plazo muestran un déficit de memoria espacial, dependiente del HP, que puede ser el resultado de alteraciones concurrentes en la LTP tanto de la entrada de información, como de la salida por CA1 (Macdougall & Howland, 2013).

El sistema del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), moléculas de adhesión y receptores sinápticos: su regulación en el aislamiento social

En el presente estudio hemos observado que tras un mes de aislamiento social se produce un incremento en los niveles de FGF2 en el HP que es transitorio, pues al cabo de tres meses de aislamiento los niveles hipocampales de FGF2 son similares a los mostrados por los animales que viven en grupo. Se ha sugerido que la familia de los FGF juega un papel neuromodulador durante la vida de un organismo y hace frente a los cambios del medio (Joly, Pernet, Chemtob, Di Polo, & Lachapelle, 2007; Powell & Abraham, 1993; Schaffer & Gage, 2004). Además, los factores de crecimiento son modulados por el estrés y están implicados en procesos de aprendizaje, resultando ser buenos candidatos para mediar los procesos de atrofia dendrítica inducidos por estrés. Así se ha observado que, en ratas adultas, la exposición a una situación de estrés agudo induce una regulación al alza de los niveles de FGF2 en el HP y otras estructuras cerebrales (Bland et al., 2007), probablemente para tratar de prevenir o paliar los efectos perjudiciales del estrés en la morfología neuronal. En contraposición con lo que hemos observado en nuestro estudio, en la literatura se ha descrito que, en los casos en los que la situación de estrés se prolonga durante varios días, se produce un descenso en los niveles de FGF2 en el HP y la corteza prefrontal (Fumagalli, Di Pasquale, Caffino, Racagni, & Riva, 2008; Turner, Gula, Taylor, Watson, & Akil, 2008). Estos efectos también se han encontrado en cerebros *post mortem* de sujetos con DM, así como en modelos animales que muestran un comportamiento de tipo depresivo (Kollack-Walker et al., 1997; Kollack-Walker et al., 1999).

En la actualidad apenas existen estudios de investigación en los que se haya estudiado el efecto de la modulación del FGF2 en situaciones de estrés prolongado. Uno de estos ejemplos lo

encontramos en el trabajo de Kuroda y McEwen en el que describieron que, tras someter a ratas a un estrés crónico por inmovilización durante tres semanas, se producía una atrofia de las dendritas apicales de la región CA3 del HP que podía ser bloqueado mediante la administración de tianeptina; un fármaco antidepresivo. En este estudio, comprobaron que el estrés crónico no indujo cambios en la expresión hipocampal de varios factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 la (NT-3) y el FGF2 (Kuroda & McEwen, 1998). Por tanto, el presente estudio es el primero en describir que el aislamiento social durante un mes aumenta significativamente los niveles hipocampales de FGF2. Es posible que dicho aumento no sea generalizado y solo se produzca en regiones específicas del HP.

Además del incremento transitorio en los niveles de FGF2 en el hipocampo, cabía la posibilidad de que otros componentes asociados al sistema del FGF2, como alguno de sus receptores, pudieran estar afectados por el aislamiento social. Así pues, decidimos centrarnos en el estudio del FGFR1 dado que juega un papel muy importante en la LTP y en la memoria espacial (Knafo et al., 2012; Zhao et al., 2007). Observamos que, en comparación con el grupo control, los niveles hipocampales de FGFR1 estaban elevados en el grupo de animales aislados a largo plazo, pero no en el grupo aislado durante un mes.

Como hemos visto hasta ahora, el impacto del estrés sobre la expresión de FGF2 parece ser dinámico en el marco de una ventana temporal concreta. En general, las moléculas neuroprotectoras como el FGF2 son inducidas por el estrés a corto plazo o por la exposición a los glucocorticoides (Chadi et al., 1993), posiblemente para amortiguar el posible impacto negativo de la exposición a niveles elevados de estas hormonas (Molteni et al., 2001). De esta forma, el FGF2 podría desempeñar un papel importante para hacer frente al estrés agudo protegiendo a las neuronas de daños excitotóxicos, metabólicos y oxidativos (Marcos et al., 1997). Sin embargo, varios autores han descrito que con el estrés repetido, o sostenido, esta inducción no es constante, y la expresión de FGF2 y sus receptores se reduce de manera significativa; (Fumagalli, Bedogni, Slotkin, Racagni, & Riva, 2005; Turner, Calvo, Frost, Akil, & Watson, 2008; Turner, Watson, & Akil, 2012), probablemente contribuyendo a las alteraciones comportamentales y cognitivas que puede producir el estrés crónico.

De esta manera, lo que proponemos en esta tesis es que, después de un mes de aislamiento, el incremento en los niveles hipocampales de FGF2 puede ayudar a evitar las alteraciones conductuales que produce el aislamiento social; pero que, sin embargo, cuando la exposición se prolonga durante un periodo de tiempo más largo, los niveles de FGF2 vuelven a los mostrados por los controles, probablemente como consecuencia del incremento de la corticosterona plasmática. De manera paralela, los FGFR1 se regulan al alza en el hipocampo tras 3 meses de aislamiento, lo cual puede ser un intento de compensación del sistema del FGF, aunque resulte insuficiente para evitar las alteraciones en el comportamiento de tipo ansioso y depresivo, así como el déficit de memoria espacial que hemos observado en estos animales.

Es importante destacar el papel que puede desempeñar el FGFR1, dado que investigaciones recientes han demostrado el papel crítico de este receptor en la función hipocampal como modulador, por ejemplo, de la consolidación de la memoria o la LTP en un modelo de aprendizaje y memoria cuando interacciona con otro tipo de moléculas específicas como PSA-NCAM (Zhao et al., 2007).

Siguiendo esta línea, a partir de diversos experimentos previos sugerimos que el aislamiento social en ratas Wistar podría afectar a ciertas moléculas como NCAM y PSA-NCAM, que participan en la plasticidad sináptica del HP y en los procesos de aprendizaje y memoria (Conboy, Bisaz, Markram, & Sandi, 2010; Schachner, 1997). En este estudio, al igual que el realizado en hembras de *de-gus* (Pereda-Pérez et al., 2013), hemos observado que el aislamiento social a largo plazo disminuye los niveles de PSA-NCAM en el HP. Este efecto, de la misma forma que destacamos en el capítulo anterior, no se puede atribuir a una reducción en los niveles de ninguna de las tres isoformas principales de NCAM. Sin embargo, una reducción en los niveles de PSA-NCAM puede estar relacionada con un deterioro de la LTP (Dityatev et al., 2004; Senkov et al., 2006) y de memoria, dado que PSA-NCAM juega un papel crítico en la consolidación de la memoria en distintas pruebas cognitivas (Foley et al., 2003; Knafo et al., 2005; Lopez-Fernandez et al., 2007; Sandi et al., 2003; Seymour, Foley, Murphy, & Regan, 2008; Venero et al., 2006).

Además, las propiedades de adhesión de PSA-NCAM y su capacidad para interactuar con otros receptores de factores de crecimiento como el FGFR1, proporciona a esta molécula características especiales para promover la actividad dependiente de la plasticidad sináptica; es decir, la formación de sinapsis, así como su selección y eliminación (Dityatev et al., 2000; Dityatev et al., 2004).

En conjunto, estos hechos indican que, probablemente, el FGF2, el FGFR1 y el PSA-NCAM sean tres de los sustratos moleculares implicados en las alteraciones neurales y el deterioro cognitivo inducido por el aislamiento social. De tal forma que, a pesar de que en el aislamiento a largo plazo los FGFR1 hipocampales se regulen al alza, los niveles de PSA-NCAM son insuficientes para el correcto funcionamiento de la vía trisináptica del HP y, por tanto, para la consolidación de la memoria.

Por otra parte, en este trabajo se han medido los niveles de expresión de NR1, estructura base de la organización funcional del receptor de NMDA donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos, pertenecientes a una de las subunidades del heterodímero NR1-NR2 de NMDA (Flores-Soto et al., 2012). Además, también se han analizado los niveles sinápticos de la subunidad GluR1 del receptor de glutamato tipo AMPA. Ambas subunidades son claves en la LTP y las sinapsis del HP; además de ser cruciales en los procesos celulares básicos para la formación del aprendizaje y la memoria (Riedel, 1996; Riedel, Platt, & Micheau, 2003; Sanderson et al., 2008). Concretamente, la LTP es dependiente del receptor de NMDA en la vía excitatoria del HP en la región del GD y la región de CA1 (Bliss & Collingridge, 1993; Nicoll & Malenka, 1995). Dado que no hemos encontrado cambios

significativos en los niveles de estas proteínas en sinaptosomas hipocampales, es posible que los cambios observados en la LTP *in vivo* sean debidos, fundamentalmente, al descenso en los niveles hipocampales de PSA-NCAM, que es un modulador directo de la actividad del receptor AMPA (Dalva, McClelland, & Kayser, 2007).

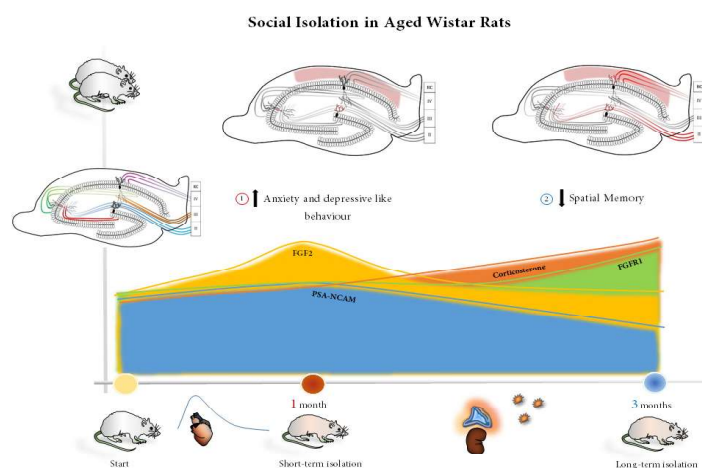
Tratamiento con FGL: reversión del deterioro cognitivo inducido por el aislamiento social a largo plazo.

En nuestro laboratorio habíamos constatado previamente que la administración sistémica del péptido sintético FG loop (FGL), mimético de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) y que tiene propiedades agonistas sobre el FGFR1, posee efectos neuroprotectores cuando es administrado durante un estrés crónico (Borcel et al., 2008), y tiene además capacidad nootrópica cuando se administra a ratas jóvenes (Cambon et al., 2004; Knafo et al., 2012). Esto nos hizo suponer que el uso de este tipo de péptidos, con capacidad para imitar la acción del FGF2 sobre el FGFR1, pudiese tener una aplicabilidad terapéutica para prevenir el deterioro cognitivo inducido por el aislamiento social en animales viejos.

El FGL es un potenciador cognitivo que aumenta la LTP *in vivo* en el DG (Dallérac et al., 2011) y en el área CA1 de rodajas hipocampales (Knafo et al., 2012). Se sabe que un hecho importante para la potenciación sináptica durante la LTP es la incorporación de nuevos receptores de glutamato de tipo AMPA en las sinapsis excitatorias a través de la actividad dependiente del tráfico de proteínas (Malinow & Malenka, 2002). Las vías de transducción de señales que regulan la incorporación de receptores AMPA en las sinapsis durante la LTP han demostrado ser múltiples, entre las que destacan; i) las vías controladas por Ca^{2+} /calmodulina dependiente de la proteína quinasa II (CaMKII) [20]; ii) *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Lisman, Schulman, & Cline, 2002); iii) proteína quinasa C (PKC) (Zhu, Qin, Zhao, Van Aelst, & Malinow, 2002) y; iv) la phosphoinositide-3-quinasa (PI3K) (Arendt et al., 2010; Qin et al., 2005). Estas últimas tres vías (MAPK, PKC, y PI3K) forman parte de la señalización dependiente del FGFR (Dailey, Ambrosetti, Mansukhani, & Basilico, 2005) y, por lo tanto, son las principales vías candidatas que pueden estar implicadas en los efectos del FGL sobre la función cognitiva (Knafo et al., 2012). En el trabajo que publicamos en 2012 se describieron por primera vez los mecanismos sinápticos específicos y vías de señalización responsables de la mejora cognitiva inducida por el FGL al mimetizar el sitio de unión de NCAM con el FGFR. En particular, se mostró que el FGL activa procesos de señalización relacionados con la interacción NCAM-FGFR, concretamente PKC, y que esto facilitaba la localización de los receptores AMPA en las sinapsis tras la activación de los receptores NMDA.

En resumen, creemos que es lógico postular que la administración sistémica de FGL tras el aislamiento social a largo plazo haya podido favorecer la localización de los receptores AMPA en las sinapsis hipocampales al interactuar con los FGFR1 de manera mimética a como lo hace NCAM. De esta manera, el FGL resulta ser un tratamiento farmacológico eficaz para revertir el déficit cog-

nitivo causado por el aislamiento social a largo plazo. Dado que este péptido atraviesa la barrera hematoencefálica y que su administración sistémica ha resultado ser útil para revertir el deterioro cognitivo inducido por el aislamiento social, sería interesante seguir investigando en futuros estudios la capacidad terapéutica del FGL en otros modelos animales o situaciones experimentales asociados a deterioro cognitivo.



Modelo dinámico temporal de los efectos fisiológicos, morfológicos, y conductuales producidos por el aislamiento social en el envejecimiento: En el primer mes de aislamiento los animales aislados muestran una menor ganancia de peso corporal en comparación con los animales controles, efecto que se mantiene durante todo el tiempo de aislamiento. Durante las primeras 4 semanas de aislamiento se produce un incremento de la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal, así como del comportamiento de tipo ansioso y depresivo.

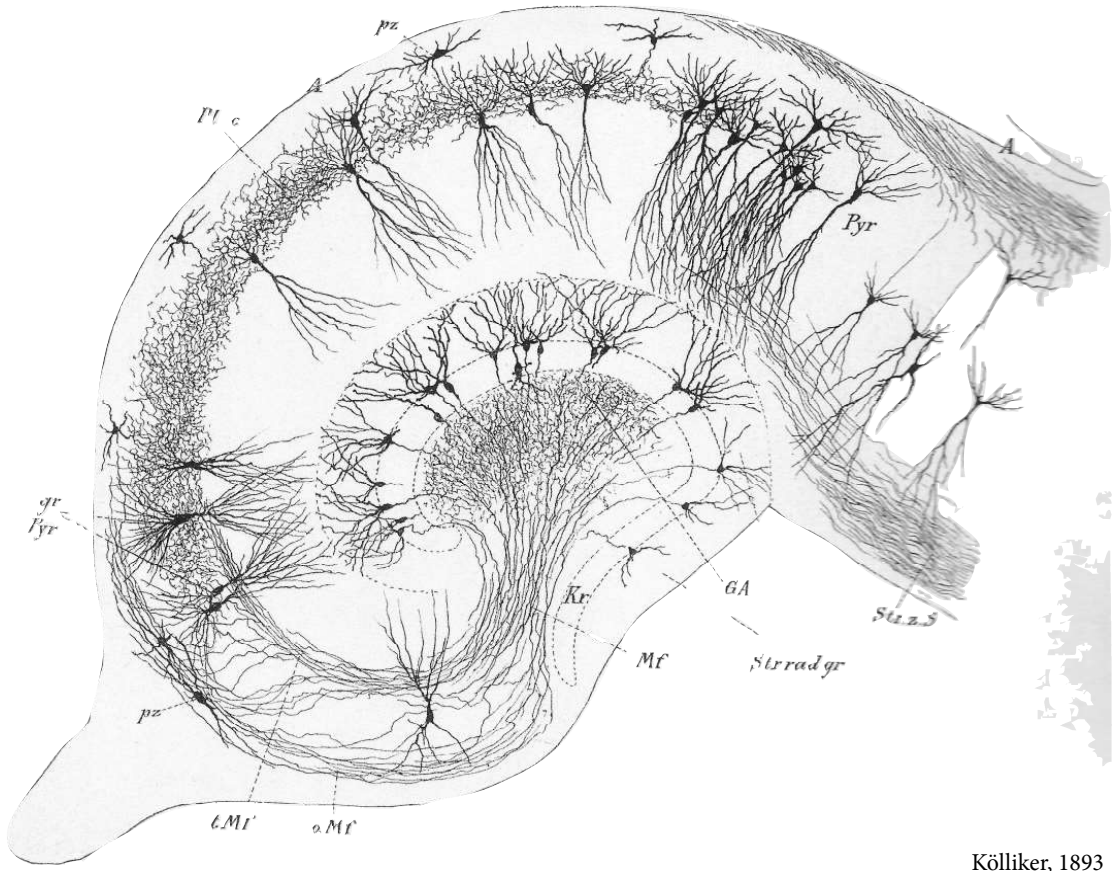
La exposición al aislamiento social durante un mes también produce cambios morfológicos; disminución de la densidad total de las espinas a lo largo de las dendritas de las células granulares del giro dentado, así como una reducción en el volumen del *stratum oriens* de CA1 del hipocampo. Los niveles hipocampales de FGF2 aumentaron durante las primeras semanas de aislamiento, posiblemente como una medida compensatoria, pero volvieron a los niveles normales al cabo de tres meses.

Los niveles de corticosterona en plasma aumentan conforme avanza el tiempo de aislamiento, siendo significativamente elevados desde el segundo mes de aislamiento y hasta finalizar el aislamiento. Asimismo, el peso relativo de las glándulas suprarrenales aumenta al cabo de 3 meses de aislamiento. Es posible que a partir del segundo mes de aislamiento, la elevación en los niveles de glucocorticoides pueda estar contribuyendo a que se produzca una disminución en la densidad en las espinas dendríticas tanto en las células granulares del hipocampo como en las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, manteniéndose un menor volumen del *stratum oriens* de CA1 del hipocampo.

Los cambios morfológicos observados en los animales aislados a largo plazo pueden estar relacionados con el deterioro de la LTP *in vivo* en el giro dentado y CA1 mostrado por estos animales.

Por otra parte, los niveles sinápticos hipocampales de FGFRI aumentan y los de PSA-NCAM disminuyen tras tres meses de aislamiento social, lo cual puede afectar a los procesos de plasticidad sináptica relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria espacial.

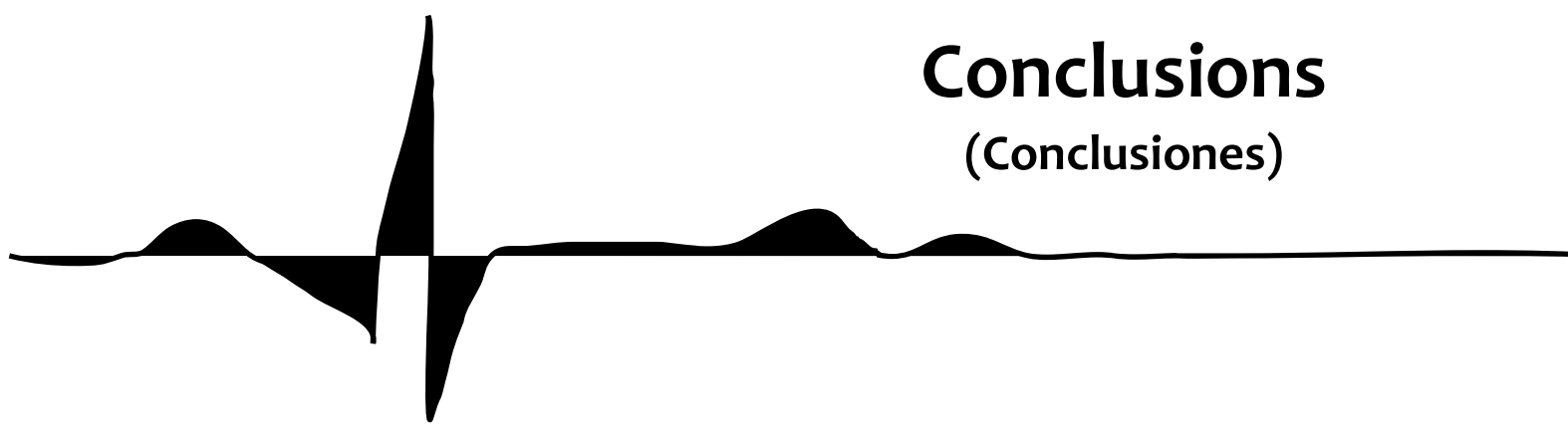
En conjunto, los cambios morfológicos, electrofisiológicos y bioquímicos inducidos por el aislamiento social a lo largo del tiempo pueden estar relacionados con los distintos cambios conductuales y cognitivos que se observan al cabo de 1 o 3 meses de aislamiento social.



Kölliker, 1893

Conclusions

(Conclusiones)

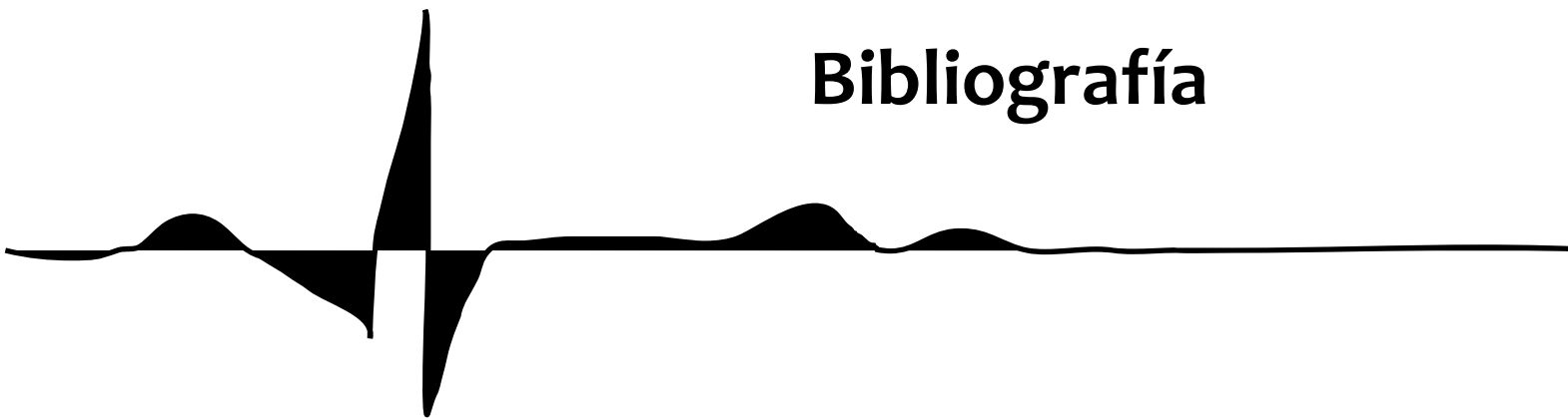


1. Long-term social isolation in adult female *Octodon degus* impaired contextual, but not auditory-cued, fear conditioning.
2. Socially isolated adult female degus showed a specific shrinkage of the hippocampal CA1 subfield, with no changes in the volume of the CA3 subregion or the whole hippocampal formation. In addition, chronic social isolation induced a reduction in hippocampal synaptic levels of PSA-NCAM without affecting any of the three main isoforms of NCAM (NCAM180, NCAM140 and NCAM120). These changes may be related to the deficit in contextual fear memory observed in isolated animals.
3. Isolated adult female *degus* displayed granulocytopenia and a reduction in body weight gain, suggesting that social isolation in adulthood may be considered a psychological stressor.
4. Aged male Wistar rats submitted to short-term chronic isolation showed reduced body weight gain and a significant predominance in sympathetic nervous activity during the light phase, as indicated by an enhanced heart rate and body temperature. In addition, plasma corticosterone levels were elevated after 2 months of isolation, while relative adrenal weight was increased in long-term isolated animals. These physiological and endocrine changes induced by chronic isolation resembles a stress state.
5. One month of social isolation induced anxiety and depressive-like behavior in aged male Wistar rats. Enhanced anxiety levels were also found in animals isolated for three months.
6. Long-term, but not short-term, social isolation in old male Wistar rats impaired spatial learning and memory in the Morris water maze, a hippocampal-dependent task.
7. Short-term social isolation led to a decrease in total spine density of dentate granular cells and to a reduction in the volume of *stratum oriens* of CA1. Three months of social isolation not only induced these morphological changes, but also a decrease in spine density along the basal dendrites of CA1 pyramidal neurons.
8. Long-term, but not short-term social isolation in aged male Wistar rats, impaired *in vivo* LTP induction in dentate granule cells and CA1 pyramidal neurons of the hippocampus.
9. Chronic social isolation induced a dynamic temporal modulation of hippocampal levels of FGF2, FGFR1 and PSA-NCAM; three synaptic plasticity-related proteins involved in learning and memory processes.
10. Systemic administration of FGL, a synthetic NCAM mimetic peptide, resulted an efficient pharmacological treatment to revert spatial memory impairment induced by long-term social isolation.



Pereda-Pérez, 2015

Bibliografía



- Adam, E. K. (2006). Transactions among adolescent trait and state emotion and diurnal and momentary cortisol activity in naturalistic settings. *Psychoneuroendocrinology*, 31(5), 664–79. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.01.010>
- Ahmed, O. J., & Mehta, M. R. (2009). The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends in Neurosciences*, 32(6), 329–38. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.009>
- Alvarez, D. N., De Simoni, A., Velzing, E. H., Bracey, E., Joëls, M., Edwards, F. A., & Krugers, H. J. (2009). Corticosterone reduces dendritic complexity in developing hippocampal CA1 neurons. *Hippocampus*, 19(9), 828–36. <http://doi.org/10.1002/hipo.20566>
- Altimiras, J. (1999). Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 124(4), 447–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682243>
- Amaral, Scharfman, and L. (2012). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Changes*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>
- Anderson, B., & Rutledge, V. (1996). Age and hemisphere effects on dendritic structure. *Brain: A Journal of Neurology*, 119 (Pt 6, 1983–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010002>
- Andreatini, R., & Leite, J. R. (1994). The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and to pentylene-tetrazol-induced convulsions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 18(8), 1333–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7863020>
- Arakawa, H. (2005). Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behavioural Processes*, 70(3), 223–34. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.07.002>
- Ardayfio, P., & Kim, K.-S. (2006). Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice. *Behavioral Neuroscience*, 120(2), 249–56. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.120.2.249>
- Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R., & Esteban, J. A. (2010). PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nature Neuroscience*, 13(1), 36–44. <http://doi.org/10.1038/nn.2462>
- Armario, A., Restrepo, C., Castellanos, J. M., & Balasch, J. (1985). Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sciences*, 36(22), 2085–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2987634>
- Arranz, L., Giménez-Llort, L., De Castro, N. M., Baeza, I., & De la Fuente, M. (2009). [Social isolation during old age worsens cognitive, behavioral and immune impairment]. *Revista Española de Geriatria Y Gerontología*, 44(3), 137–42. <http://doi.org/10.1016/j.regg.2008.12.001>
- Aslani, S., Harb, M. R., Costa, P. S., Almeida, O. F. X., Sousa, N., & Palha, J. A. (2014). Day and night: diurnal phase influences the response to chronic mild stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 82. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00082>
- Baddeley, A., Bueno, O., Cahill, L., Fuster, J. M., Izquierdo, I., McGaugh, J. L., ... Da Cunha, C. (2000). The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 33(9), 993–1002. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973129>
- Bailey, S. L., & Heitkemper, M. M. (2001). Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. *Chronobiology International*, 18(2), 249–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11379665>
- Baldwin, D. R., Wilcox, Z. C., & Bayliss, R. C. (1995). Impact of differential housing on humoral immunity following exposure to an acute stressor in rats. *Physiology & Behavior*, 57(4), 649–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7777598>

- Barnes, L. L., Mendes de Leon, C. F., Wilson, R. S., Bienias, J. L., & Evans, D. A. (2004). Social resources and cognitive decline in a population of older African Americans and whites. *Neurology*, 63(12), 2322–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623694>
- Bartasaghi, R., Raffi, M., & Ciani, E. (2006). Effect of early isolation on signal transfer in the entorhinal cortex-dentate-hippocampal system. *Neuroscience*, 137(3), 875–90. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.028>
- Bartasaghi, R., Severi, S., & Guidi, S. (2003). Effects of early environment on pyramidal neuron morphology in field CA1 of the guinea-pig. *Neuroscience*, 116(3), 715–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573714>
- Bassuk, S. S., Glass, T. A., & Berkman, L. F. (1999). Social disengagement and incident cognitive decline in community-dwelling elderly persons. *Annals of Internal Medicine*, 131(3), 165–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428732>
- Benjamins, M. R. (2004). Religion and Functional Health Among the Elderly: Is There a Relationship and Is It Constant? *Journal of Aging and Health*, 16(3), 355–374. <http://doi.org/10.1177/0898264304264204>
- Berezin, V., & Bock, E. (2004). NCAM mimetic peptides: Pharmacological and therapeutic potential. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 22(1-2), 33–39. <http://doi.org/10.1385/JMN:22:1-2:33>
- Berkman, L. F., & Syme, S. L. (1979). Social networks, host resistance, and mortality: a nine-year follow-up study of Alameda County residents. *American Journal of Epidemiology*, 109(2), 186–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/425958>
- Bisaz, R., Schachner, M., & Sandi, C. (2011). Causal evidence for the involvement of the neural cell adhesion molecule, NCAM, in chronic stress-induced cognitive impairments. *Hippocampus*, 21(1), 56–71. <http://doi.org/10.1002/hipo.20723>
- Blanchard, R. J., Hebert, M., Sakai, R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., ... Blanchard, D. C. (1998). Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive Behavior*, 24(4), 307–321. Retrieved from http://www.safetylit.org/citations/index.php?fuseaction=citations.viewdetails&citationIds%5B%5D=citjournalarticle_48790_20
- Bland, S. T., Tamlyn, J. P., Barrientos, R. M., Greenwood, B. N., Watkins, L. R., Campeau, S., ... Maier, S. F. (2007). Expression of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor mRNA in the medial prefrontal cortex and hippocampus after uncontrollable or controllable stress. *Neuroscience*, 144(4), 1219–28. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.026>
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–9. <http://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–56. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1350458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Borcel, E., Pérez-Alvarez, L., Herrero, A. I., Brionne, T., Varea, E., Berezin, V., ... Venero, C. (2008). Chronic stress in adulthood followed by intermittent stress impairs spatial memory and the survival of newborn hippocampal cells in aging animals: prevention by FGL, a peptide mimetic of neural cell adhesion molecule. *Behavioural Pharmacology*, 19(1), 41–9. <http://doi.org/10.1097/FBP.ob013e3282f3fca9>
- Borsini, F., & Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, 94(2), 147–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127840>
- Bourke, C. H., & Neigh, G. N. (2011). Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Hormones and Behavior*, 60(1), 112–120. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.03.011>
- Bourke, C. H., & Neigh, G. N. (2012). Exposure to repeated maternal aggression induces depressive-like be-

- havior and increases startle in adult female rats. *Behavioural Brain Research*, 227(1), 270–275. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.001>
- Boyar, R. M., Witkin, M., Carruth, A., & Ramsey, J. (1979). Circadian cortisol secretory rhythms in Cushing's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 48(5), 760–5. <http://doi.org/10.1210/jcem-48-5-760>
- Brain, P., & Benton, D. (1979). The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. *Life Sciences*, 24(2), 99–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33316>
- Brown, S., & Schafer, E. A. (1888). An Investigation into the Functions of the Occipital and Temporal Lobes of the Monkey's Brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 179(0), 303–327. <http://doi.org/10.1098/rstb.1888.0011>
- Brummett, B. H., Barefoot, J. C., Siegler, I. C., Clapp-Channing, N. E., Lytle, B. L., Bosworth, H. B., ... Mark, D. B. (2001). Characteristics of socially isolated patients with coronary artery disease who are at elevated risk for mortality. *Psychosomatic Medicine*, 63(2), 267–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292274>
- Buchanan, T. W., Tranel, D., & Adolphs, R. (2006). Impaired memory retrieval correlates with individual differences in cortisol response but not autonomic response. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(3), 382–7. <http://doi.org/10.1101/lm.206306>
- Buckmaster, P. S., & Amaral, D. G. (2001). Intracellular recording and labeling of mossy cells and proximal CA3 pyramidal cells in macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 430(2), 264–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135261>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 30–40. <http://doi.org/10.1038/nrn1809>
- Butte, J. C., Kakihana, R., & Noble, E. P. (1976). Circadian rhythm of corticosterone levels in rat brain. *The Journal of Endocrinology*, 68(02), 235–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1255040>
- Cacioppo, J. T. (2002). Social neuroscience: understanding the pieces fosters understanding the whole and vice versa. *The American Psychologist*, 57(11), 819–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12564179>
- Cacioppo, J. T., Ernst, J. M., Burleson, M. H., McClintock, M. K., Malarkey, W. B., Hawkley, L. C., Berntson, G. G. (2000). Lonely traits and concomitant physiological processes: the MacArthur social neuroscience studies. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 35(2-3), 143–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677643>
- Cacioppo, J. T., & Hawkley, L. C. (2003). Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms. *Perspectives in Biology and Medicine*, 46(3 Suppl), S39–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563073>
- Cacioppo, J. T., & Hawkley, L. C. (2009). Perceived social isolation and cognition. *Trends in Cognitive Sciences*, 13(10), 447–54. <http://doi.org/10.1016/j.tics.2009.06.005>
- Cacioppo, J. T., Hughes, M. E., Waite, L. J., Hawkley, L. C., & Thisted, R. A. (2006). Loneliness as a specific risk factor for depressive symptoms: cross-sectional and longitudinal analyses. *Psychology and Aging*, 21(1), 140–51. <http://doi.org/10.1037/0882-7974.21.1.140>
- Cahill, L., Gorski, L., & Le, K. Enhanced human memory consolidation with post-learning stress: interaction with the degree of arousal at encoding. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(4), 270–4. <http://doi.org/10.1101/lm.62403>
- Cambon, K., Hansen, S. M., Venero, C., Herrero, A. I., Skibo, G., Berezin, V., ... Sandi, C. (2004). A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Soci-*

- ety for Neuroscience, 24(17), 4197–204. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0436-04.2004>
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S., & Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal of Cell Biology*, 86(3), 831–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2110694&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Carnevali, L., Mastorci, F., Graiani, G., Razzoli, M., Trombini, M., Pico-Alfonso, M. A., ... Sgoifo, A. (2012). Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats. *Physiology & Behavior*, 106(2), 142–50. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.022>
- Carney, R. M., Saunders, R. D., Freedland, K. E., Stein, P., Rich, M. W., & Jaffe, A. S. (1995). Association of depression with reduced heart rate variability in coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 76(8), 562–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677077>
- Castro, W. L., & Matt, K. S. (1997). Neuroendocrine correlates of separation stress in the Siberian dwarf hamster (*Phodopus sungorus*). *Physiology & Behavior*, 61(4), 477–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108564>
- Chao, H. M., & McEwen, B. S. (1994). Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 26(1-2), 271–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854057>
- Chen, Y., Rex, C. S., Rice, C. J., Dubé, C. M., Gall, C. M., Lynch, G., & Baram, T. Z. (2010). Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13123–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1003825107>
- Chida, Y., Sudo, N., & Kubo, C. (2005). Social isolation stress exacerbates autoimmune disease in MRL/lpr mice. *Journal of Neuroimmunology*, 158(1-2), 138–144. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.09.002>
- Chida, Y., Sudo, N., Mori, J., & Kubo, C. (2006). Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Research*, 1067(1), 201–8. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.10.042>
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews. Endocrinology*, 5(7), 374–81. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Cohen, N. J., & Eichenbaum, H. (1991). The theory that wouldn't die: a critical look at the spatial mapping theory of hippocampal function. *Hippocampus*, 1(3), 265–8. <http://doi.org/10.1002/hipo.450010312>
- Cole, S. W. (2008). Social regulation of leukocyte homeostasis: the role of glucocorticoid sensitivity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(7), 1049–55. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.02.006>
- Cole, S. W., Hawkley, L. C., Arevalo, J. M., Sung, C. Y., Rose, R. M., & Cacioppo, J. T. (2007). Social regulation of gene expression in human leukocytes. *Genome Biology*, 8(9), R189. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r189>
- Conboy, L., Bisaz, R., Markram, K., & Sandi, C. (2010). Role of NCAM in emotion and learning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 663, 271–96. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1170-4_18
- Conrad, C. D. (2006). What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 5(1), 41–60. <http://doi.org/10.1177/1534582306289043>
- Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(5), 742–55. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.003>
- Conrad, C. D., LeDoux, J. E., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates

- fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*, 113(5), 902–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10571474>
- Cordero, M. I., Rodríguez, J. J., Davies, H. A., Peddie, C. J., Sandi, C., & Stewart, M. G. (2005). Chronic restraint stress down-regulates amygdaloid expression of polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neuroscience*, 133(4), 903–10. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.046>
- Cornwell, B., Laumann, E. O., & Schumm, L. P. (2008). The Social Connectedness of Older Adults: A National Profile*. *American Sociological Review*, 73(2), 185–203. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2583428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cornwell, E. Y., & Waite, L. J. (2009a). Measuring social isolation among older adults using multiple indicators from the NSHAP study. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 64 Suppl 1, i38–46. <http://doi.org/10.1093/geronb/gbp037>
- Cornwell, E. Y., & Waite, L. J. (2009b). Social disconnectedness, perceived isolation, and health among older adults. *Journal of Health and Social Behavior*, 50(1), 31–48. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Costoli, T., Bartolomucci, A., Graiani, G., Stilli, D., Laviola, G., & Sgoifo, A. (2004). Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(6), H2133–40. <http://doi.org/10.1152/ajp-heart.00869.2003>
- Couillard-Després, S. (2013). Hippocampal neurogenesis and ageing. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15, 343–55. http://doi.org/10.1007/7854_2012_232
- Cruces, J., Venero, C., Pereda-Pérez, I., & De la Fuente, M. (2014). The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Current Pharmaceutical Design*, 20(29), 4608–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24588822>
- Cruces, J., Venero, C., Pereda-Pérez, I., & De la Fuente, M. (2014). A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. *Journal of Neuroimmunology*, 277(1-2), 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.09.011>
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 233–47. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.007>
- Dallérac, G., Zerwas, M., Novikova, T., Callu, D., Leblanc-Veyrac, P., Bock, E., ... Doyère, V. (2011). The neural cell adhesion molecule-derived peptide FGL facilitates long-term plasticity in the dentate gyrus in vivo. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(5), 306–13. <http://doi.org/10.1101/lm.215431>
- Dallman, M. F. (2007). Modulation of stress responses: how we cope with excess glucocorticoids. *Experimental Neurology*, 206(2), 179–82. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.002>
- Dalva, M. B., McClelland, A. C., & Kayser, M. S. (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(3), 206–20. <http://doi.org/10.1038/nrn2075>
- Day, T. A. (2005). Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: no help from allostasis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(8), 1195–200. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.005>
- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(6), 463–75. <http://doi.org/10.1038/nrn1683>
- de Kloet, E. R., Rots, N. Y., & Cools, A. R. (1996). Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 16(3), 345–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818401>

- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301. <http://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331>
- De Pablo, J. M., Parra, A., Segovia, S., & Guillamón, A. (1989). Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiology & Behavior*, 46(2), 229–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2602464>
- De Roo, M., Klauser, P., Mendez, P., Poglia, L., & Muller, D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 18(1), 151–61. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhm041>
- Delgado y Palacios, R., Campo, A., Henningsen, K., Verhoye, M., Poot, D., Dijkstra, J., ... Van der Linden, A. (2011). Magnetic resonance imaging and spectroscopy reveal differential hippocampal changes in anhedonic and resilient subtypes of the chronic mild stress rat model. *Biological Psychiatry*, 70(5), 449–57. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.014>
- Dias-Ferreira, E., Sousa, J. C., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A. R., Cerqueira, J. J., ... Sousa, N. (2009). Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5940), 621–5. <http://doi.org/10.1126/science.1171203>
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 517–549. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- Dityatev, A., Dityateva, G., & Schachner, M. (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron*, 26(1), 207–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798405>
- Dityatev, A., Dityateva, G., Sytnyk, V., Dellinger, M., Toni, N., Nikonenko, I., ... Schachner, M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(42), 9372–82. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1702-04.2004>
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., & Radojicic, M. B. (2010). Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male wistar rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(5), 693–700. <http://doi.org/10.1007/s10571-009-9493-0>
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., & Radojicic, M. B. (2012). Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology*, 66(2), 112–9. <http://doi.org/10.1159/000338605>
- Doane, L. D., & Adam, E. K. (2010). Loneliness and cortisol: momentary, day-to-day, and trait associations. *Psychoneuroendocrinology*, 35(3), 430–41. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.08.005>
- Doherty, P., Fazeli, M. S., & Walsh, F. S. (1995). The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *Journal of Neurobiology*, 26(3), 437–46. <http://doi.org/10.1002/neu.480260315>
- Dronjak, S., Gavrilović, L., Filipović, D., & Radojčić, M. B. (2004). Immobilization and cold stress affect sympathetic-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior*, 81(3), 409–15. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.01.011>
- Dumas, T. C., Gillette, T., Ferguson, D., Hamilton, K., & Sapolsky, R. M. (2010). Anti-glucocorticoid gene therapy reverses the impairing effects of elevated corticosterone on spatial memory, hippocampal neuronal excitability, and synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(5), 1712–20. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-09.2010>
- Eastwood, S. L., Burnet, P. W., Beckwith, J., Kerwin, R. W., & Harrison, P. J. (1994). AMPA glutamate receptors and their flip and flop mRNAs in human hippocampus. *Neuroreport*, 5(11), 1325–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919190>

- Ehlers, C. L., Kaneko, W. M., Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1993). Effects of gender and social isolation on electroencephalogram and neuroendocrine parameters in rats. *Biological Psychiatry*, 33(5), 358–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471694>
- Esler, M. D., Thompson, J. M., Kaye, D. M., Turner, A. G., Jennings, G. L., Cox, H. S., ... Seals, D. R. (1995). Effects of aging on the responsiveness of the human cardiac sympathetic nerves to stressors. *Circulation*, 91(2), 351–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805237>
- Esler, M., & Kaye, D. (2000). Sympathetic nervous system activation in essential hypertension, cardiac failure and psychosomatic heart disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35(7 Suppl 4), S1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346214>
- Fa, M., Xia, L., Anunu, R., Kehat, O., Kriebel, M., Volkmer, H., & Richter-Levin, G. (2014). Stress modulation of hippocampal activity—spotlight on the dentate gyrus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 53–60. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.04.008>
- Fabricius, K., Helboe, L., Steiniger-Brach, B., Fink-Jensen, A., & Pakkenberg, B. (2010). Stereological brain volume changes in post-weaned socially isolated rats. *Brain Research*, 1345, 233–9. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.040>
- Fanselow, M. S. (1980). Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian Journal of Biological Science*, 15(4), 177–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7208128>
- Fanselow, M. S., & Poulos, A. M. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual Review of Psychology*, 56, 207–34. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070213>
- Ferrari, E., Mirani, M., Barili, L., Falvo, F., Solerte, S. B., Cravello, L., ... Magri, F. (2004). Cognitive and affective disorders in the elderly: a neuroendocrine study. *Archives of Gerontology and Geriatrics. Supplement*, (9), 171–82. <http://doi.org/10.1016/j.archger.2004.04.024>
- Ferraro, K. F., Mutran, E., & Barresi, C. M. (1984). Widowhood, health, and friendship support in later life. *Journal of Health and Social Behavior*, 25(3), 246–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6501837>
- Fiala, J. C., & Harris, K. M. (1999). Dendrite Structure. *Dendrites*, 57351, 1–31. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198566564.001.0001>
- Filipović, D., Gavrilović, L., Dronjak, S., & Radojčić, M. B. (2005). Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology*, 51(2), 107–14. <http://doi.org/10.1159/000084168>
- Finsterwald, C., & Alberini, C. M. (2014). Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: From adaptive responses to psychopathologies. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 17–29. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.017>
- Flak, J. N., Jankord, R., Solomon, M. B., Krause, E. G., & Herman, J. P. (2011). Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiology & Behavior*, 104(2), 228–34. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.002>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 27(5), 301–10. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Foley, A. G., Rønn, L. C. B., Murphy, K. J., & Regan, C. M. (2003). Distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat septal nuclei and septohippocampal pathway: transient increase of polysialylated interneurons in the subtriangular septal zone during memory consolidation. *Journal of Neuroscience Research*, 74(6), 807–17. <http://doi.org/10.1002/jnr.10820>
- Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., & Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life

- might protect against dementia. *The Lancet. Neurology*, 3(6), 343–53. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00767-7](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00767-7)
- Fratiglioni, L., Wang, H. X., Ericsson, K., Maytan, M., & Winblad, B. (2000). Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet*, 355(9212), 1315–9. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02113-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02113-9)
- Fulk, G. (1976). Notes on the activity, reproduction, and social behavior of *Octodon degus*. *Journal of Mammalogy*, 57(3), 495–505.
- Fumagalli, F., Bedogni, F., Slotkin, T. A., Racagni, G., & Riva, M. A. (2005). Prenatal stress elicits regionally selective changes in basal FGF-2 gene expression in adulthood and alters the adult response to acute or chronic stress. *Neurobiology of Disease*, 20(3), 731–7. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.05.005>
- Fumagalli, F., Di Pasquale, L., Caffino, L., Racagni, G., & Riva, M. A. (2008a). Stress and cocaine interact to modulate basic fibroblast growth factor (FGF-2) expression in rat brain. *Psychopharmacology*, 196(3), 357–364. <http://doi.org/10.1007/s00213-007-0966-x>
- Fumagalli, F., Di Pasquale, L., Caffino, L., Racagni, G., & Riva, M. A. (2008b). Stress and cocaine interact to modulate basic fibroblast growth factor (FGF-2) expression in rat brain. *Psychopharmacology*, 196(3), 357–64. <http://doi.org/10.1007/s00213-007-0966-x>
- Galea, L. A., McEwen, B. S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R. L., & Dhabhar, F. S. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*, 81(3), 689–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9316021>
- Gamallo, A., Villanua, A., Tranco, G., & Fraile, A. (1986). Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiology & Behavior*, 36(2), 217–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3960993>
- Gambardella, P., Greco, A. M., Sticchi, R., Bellotti, R., & Di Renzo, G. (1994). Individual housing modulates daily rhythms of hypothalamic catecholaminergic system and circulating hormones in adult male rats. *Chronobiology International*, 11(4), 213–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954904>
- Garrido, P. (2011). Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging and Disease*, 2(1), 80–99. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3295041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Garrido, P., De Blas, M., Ronzoni, G., Cordero, I., Antón, M., Giné, E., ... Mora, F. (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 120(5), 829–43. <http://doi.org/10.1007/s00702-012-0935-3>
- Gaughran, F., Payne, J., Sedgwick, P. M., Cotter, D., & Berry, M. (2006). Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Research Bulletin*, 70(3), 221–7. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.04.008>
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., & Feer, H. (1981). Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiology & Behavior*, 27(1), 183–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7196593>
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Frischknecht, H.-R., Feer, H., & Siegfried, B. (1988). Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiology & Behavior*, 43(1), 13–16. [http://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90091-1](http://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90091-1)
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Kraeuchi, K., & Feer, H. (1982). Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments. *Behavioural Brain Research*, 4(1), 45–54.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7055501>

- Geyer, M. A., Wilkinson, L. S., Humby, T., & Robbins, T. W. (1993). Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 34(6), 361–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8218603>
- Gianaros, P. J., Sheu, L. K., Matthews, K. A., Jennings, J. R., Manuck, S. B., & Hariri, A. R. (2008). Individual differences in stressor-evoked blood pressure reactivity vary with activation, volume, and functional connectivity of the amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(4), 990–9. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-07.2008>
- Giralt, M., & Armario, A. (1989). Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiology & Behavior*, 45(3), 477–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2756039>
- Giustino, T. F., & Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 298. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>
- Goldstein, D. S. (1995). Stress, Catecholamines, and Cardiovascular Disease. *BMJ*, 311(7019), 1580–1581. <http://doi.org/10.1136/bmj.311.7019.1580a>
- Goldwater, D. S., Pavlides, C., Hunter, R. G., Bloss, E. B., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2009). Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience*, 164(2), 798–808. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.053>
- Gómez, F., Lahmame, A., de Kloet, R., & Armario, A. (1996). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Chronic Stress in Five Inbred Rat Strains: Differential Responses Are Mainly Located at the Adrenocortical Level. *Neuroendocrinology*, 63(4), 327–337. <http://doi.org/10.1159/000126973>
- Gómez-Pinilla, F., So, V., & Kesslak, J. P. (1998). Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience*, 85(1), 53–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607702>
- Gow, A. J., Corley, J., Starr, J. M., & Deary, I. J. (2013). Which social network or support factors are associated with cognitive abilities in old age? *Gerontology*, 59(5), 454–463. <http://doi.org/10.1159/000351265>
- Grippe, A. J., Beltz, T. G., & Johnson, A. K. (2003). Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiology & Behavior*, 78(4-5), 703–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782226>
- Grippe, A. J., Gerena, D., Huang, J., Kumar, N., Shah, M., Ughreja, R., & Carter, C. S. (2007). Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10), 966–80. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.07.004>
- Grippe, A. J., Lamb, D. G., Carter, C. S., & Porges, S. W. (2007). Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biological Psychiatry*, 62(10), 1162–70. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.011>
- Grippe, A. J., Trahanas, D. M., Zimmerman, R. R., Porges, S. W., & Carter, C. S. (2009). Oxytocin protects against negative behavioral and autonomic consequences of long-term social isolation. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1542–53. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.017>
- Grippe, A. J., Wu, K. D., Hassan, I., & Carter, C. S. (2008). Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. *Depression and Anxiety*, 25(6), E17–E26. <http://doi.org/10.1002/da.20375>
- Hackett, R. A., Hamer, M., Endrighi, R., Brydon, L., & Steptoe, A. (2012). Loneliness and stress-related inflammatory and neuroendocrine responses in older men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 37(11), 1801–9. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.016>

- Håkansson, K., Rovio, S., Helkala, E.-L., Vilks, A.-R., Winblad, B., Soininen, H., ... Kivipelto, M. (2009). Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 339, b2462. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hampson, R. E., Simeral, J. D., & Deadwyler, S. A. (1999). Distribution of spatial and nonspatial information in dorsal hippocampus. *Nature*, 402(6762), 610–4. <http://doi.org/10.1038/45154>
- Hatch, A. M., Wiberg, G. S., Zawadzka, Z., Cann, M., Airth, J. M., & Grice, H. C. (1965). Isolation syndrome in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 7(5), 737–745. [http://doi.org/10.1016/0041-008X\(65\)90132-8](http://doi.org/10.1016/0041-008X(65)90132-8)
- Hawley, L. C., Cole, S. W., Capitano, J. P., Norman, G. J., & Cacioppo, J. T. (2012). Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals. *Hormones and Behavior*, 62(3), 314–323. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.05.011>
- Hawley, L. C., Masi, C. M., Berry, J. D., & Cacioppo, J. T. (2006). Loneliness is a unique predictor of age-related differences in systolic blood pressure. *Psychology and Aging*, 21(1), 152–164. <http://doi.org/10.1037/0882-7974.21.1.152>
- Hawley, L. C., Preacher, K. J., & Cacioppo, J. T. (2010). Loneliness impairs daytime functioning but not sleep duration. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 29(2), 124–9. <http://doi.org/10.1037/a0018646>
- Hawthorne, G. (2008). Perceived social isolation in a community sample: its prevalence and correlates with aspects of peoples' lives. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 43(2), 140–50. <http://doi.org/10.1007/s00127-007-0279-8>
- Heikkinen, R.-L., & Kauppinen, M. (2004). Depressive symptoms in late life: a 10-year follow-up. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 38(3), 239–50. <http://doi.org/10.1016/j.archger.2003.10.004>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (1999). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biological Psychiatry*, 46(11), 1509–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599479>
- Hellems, K. G. C., Benge, L. C., & Olmstead, M. C. (2004). Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 150(2), 103–15. <http://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.003>
- Helmer, C., Damon, D., Letenneur, L., Fabrigoule, C., Barberger-Gateau, P., Lafont, S., ... Dartigues, J. F. (1999). Marital status and risk of Alzheimer's disease: a French population-based cohort study. *Neurology*, 53(9), 1953–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599764>
- Herry, C., Ferraguti, F., Singewald, N., Letzkus, J. J., Ehrlich, I., & Lüthi, A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. *The European Journal of Neuroscience*, 31(4), 599–612. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07101.x>
- Hiroi, N., & White, N. M. (1991). The lateral nucleus of the amygdala mediates expression of the amphetamine-produced conditioned place preference. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(7), 2107–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2066777>
- Hoebel, B. G. (1997). Neuroscience and appetitive behavior research: 25 years. *Appetite*, 29(2), 119–33. <http://doi.org/10.1006/appe.1997.0126>
- Holson, R. R., Scallet, A. C., Ali, S. F., Sullivan, P., & Gough, B. (1988). Adrenocortical, beta-endorphin and behavioral responses to graded stressors in differentially reared rats. *Physiology & Behavior*, 42(2), 125–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2966964>
- Holson, R. R., Scallet, A. C., Ali, S. F., & Turner, B. B. (1991). "Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiology & Behavior*, 49(6), 1107–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1896492>

- House, J. S. (2001). Social isolation kills, but how and why? *Psychosomatic Medicine*, 63(2), 273–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292275>
- House, J. S., Landis, K. R., & Umberson, D. (1988). Social relationships and health. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4865), 540–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3399889>
- House, J. S., Robbins, C., & Metzner, H. L. (1982). The association of social relationships and activities with mortality: prospective evidence from the Tecumseh Community Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 116(1), 123–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7102648>
- Hsiao, Y.-H., Chen, P. S., Chen, S.-H., & Gean, P.-W. (2011). The involvement of Cdk5 activator p35 in social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit in the transgenic mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(9), 1848–58. <http://doi.org/10.1038/npp.2011.69>
- Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2133–41. <http://doi.org/10.1172/JCI46043>
- Hull, E. M., Rosselli, L., & Langan, C. J. (1973). Effects of isolation and grouping on guinea pigs. *Behavioral Biology*, 9(4), 493–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4795608>
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2008). Dissociations across the dorsal–ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(1), 61–69. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.016>
- Hunsaker, M. R., Tran, G. T., & Kesner, R. P. (2009). A behavioral analysis of the role of CA3 and CA1 subcortical efferents during classical fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 123(3), 624–630. <http://doi.org/10.1037/a0015455>
- Hyndman, B. W., Kitney, R. I., & Sayers, B. M. (1971). Spontaneous rhythms in physiological control systems. *Nature*, 233(5318), 339–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4940430>
- Ishikawa, J., Ogawa, Y., Owada, Y., & Ishikawa, A. (2014). Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. *Behavioural Brain Research*, 264, 197–206. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.007>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. <http://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jankord, R., & Herman, J. P. (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 64–73. <http://doi.org/10.1196/annals.1410.012>
- Jeanneteau, F., & Chao, M. V. (2013). Are BDNF and glucocorticoid activities calibrated? *Neuroscience*, 239, 173–95. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.017>
- Joëls, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V. M., Qin, Y., van Riel, E., ... Krugers, H. J. (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 7(4), 221–31. <http://doi.org/10.1080/10253890500070005>
- Joëls, M., & Krugers, H. J. (2007). LTP after stress: up or down? *Neural Plasticity*, 2007, 93202. <http://doi.org/10.1155/2007/93202>
- Joëls, M., Sarabdjitsingh, R. A., & Karst, H. (2012). Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacological Reviews*, 64(4), 901–38. <http://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & LeDoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147(3), 509–24. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>

- Joly, S., Pernet, V., Chemtob, S., Di Polo, A., & Lachapelle, P. (2007). Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(5), 2311–20. <http://doi.org/10.1167/iovs.06-1205>
- Jones, D. C. (1983). Development maturation and aging of synapses. *Adv Cell Neurob*, 4, 163–221.
- Joseph-Bravo, P., & de Gortari, P. (2014). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biocología*, 14, 65–76.
- Juraska, J. M., Henderson, C., & Müller, J. (1984). Differential rearing experience, gender, and radial maze performance. *Developmental Psychobiology*, 17(3), 209–15. <http://doi.org/10.1002/dev.420170302>
- Kalsbeek, A., van Heerikhuizen, J. J., Wortel, J., & Buijs, R. M. (1996). A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(17), 5555–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757267>
- Kanitz, E., Puppe, B., Tuchscherer, M., Heberer, M., Viergutz, T., & Tuchscherer, A. (2009). A single exposure to social isolation in domestic piglets activates behavioural arousal, neuroendocrine stress hormones, and stress-related gene expression in the brain. *Physiology & Behavior*, 98(1-2), 176–85. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.05.007>
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1657–62. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018375108>
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S. M., Bowles, N. P., Weil, Z. M., Pfaff, D. W., & McEwen, B. S. (2010). Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*, 151(5), 2117–27. <http://doi.org/10.1210/en.2009-1436>
- Karst, H., Berger, S., Erdmann, G., Schutz, G., & Joels, M. (2010). Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14449–14454. <http://doi.org/10.1073/pnas.0914381107>
- Kassem, M. S., Lagopoulos, J., Stait-Gardner, T., Price, W. S., Chohan, T. W., Arnold, J. C., ... Bennett, M. R. (2013). Stress-induced grey matter loss determined by MRI is primarily due to loss of dendrites and their synapses. *Molecular Neurobiology*, 47(2), 645–61. <http://doi.org/10.1007/s12035-012-8365-7>
- Kavushansky, A., Vouimba, R.-M., Cohen, H., & Richter-Levin, G. (2006). Activity and plasticity in the CA1, the dentate gyrus, and the amygdala following controllable vs. uncontrollable water stress. *Hippocampus*, 16(1), 35–42. <http://doi.org/10.1002/hipo.20130>
- Kaye, W. (2008). Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiology & Behavior*, 94(1), 121–35. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.037>
- Kempton, M. J., Salvador, Z., Munafò, M. R., Geddes, J. R., Simmons, A., Frangou, S., & Williams, S. C. R. (2011). Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry*, 68(7), 675–90. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.60>
- Kiecolt-Glaser, J. K., & Newton, T. L. (2001). Marriage and health: his and hers. *Psychological Bulletin*, 127(4), 472–503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439708>
- Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 22(9), 411–6. <http://doi.org/10.1101/lm.037291.114>
- Kiss, J. Z., & Muller, D. (2001). Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Reviews in the Neurosciences*, 12(4), 297–310. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11783716>

- Kleene, R., & Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(3), 195–208. <http://doi.org/10.1038/nrn1349>
- Kleiger, R. E., Miller, J. P., Bigger, J. T., & Moss, A. J. (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 59(4), 256–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3812275>
- Klementiev, B., Novikova, T., Novitskaya, V., Walmod, P. S., Dmytriyeva, O., Pakkenberg, B., ... Bock, E. (2007). A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35. *Neuroscience*, 145(1), 209–24. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.060>
- Kluver, H., & Bucy, P. (1937). Psychic blindness and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol*, 3, 119:352.
- Knafo, S., Barkai, E., Herrero, A. I., Libersat, F., Sandi, C., & Venero, C. (2005). Olfactory learning-related NCAM expression is state, time, and location specific and is correlated with individual learning capabilities. *Hippocampus*, 15(3), 316–25. <http://doi.org/10.1002/hipo.20052>
- Knafo, S., Venero, C., Sánchez-Puelles, C., Pereda-Peréz, I., Franco, A., Sandi, C., ... Esteban, J. A. (2012). Facilitation of AMPA receptor synaptic delivery as a molecular mechanism for cognitive enhancement. *PLoS Biology*, 10(2), e1001262. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001262>
- Kochlamazashvili, G., Senkov, O., Grebenyuk, S., Robinson, C., Xiao, M.-F., Stummeyer, K., ... Dityatev, A. (2010). Neural Cell Adhesion Molecule-Associated Polysialic Acid Regulates Synaptic Plasticity and Learning by Restraining the Signaling through GluN2B-Containing NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*, 30(11), 4171–4183. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5806-09.2010>
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291–301. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., & McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(1), 3–38. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.009>
- Kraev, I., Henneberger, C., Rossetti, C., Conboy, L., Kohler, L. B., Fantin, M., ... Sandi, C. (2011). A peptide mimetic targeting trans-homophilic NCAM binding sites promotes spatial learning and neural plasticity in the hippocampus. *PloS One*, 6(8), e23433. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0023433>
- Kräuchi, K., Cajochen, C., Werth, E., & Wirz-Justice, A. (2000). Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(3), R741–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712296>
- Krause, N. (1987). Chronic strain, locus of control, and distress in older adults. *Psychology and Aging*, 2(4), 375–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3268231>
- Kubo, T., Oyama, I., Nakamura, T., Kunimoto, M., Kadowaki, K., Otomo, H., ... Matsuda, S. (2011). Industry-based retrospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 18(3), 206–11. <http://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2010.02714.x>
- Kumar Jha, P., Challet, E., & Kalsbeek, A. (2015). Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.024>
- Kupfer, D. J., Weiss, B. L., Foster, G., Detre, T. P., & McPartland, R. (1974). Psychomotor activity in affective states. *Archives of General Psychiatry*, 30(6), 765–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4832184>
- Kuroda, Y., & McEwen, B. S. (1998). Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors,

- growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 59(1), 35–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729259>
- la Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., van der Vliet, J., & Buijs, R. M. (2001). Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(12), 1025–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722698>
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4-5), 727–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514027>
- Leuner, B., & Shors, T. J. (2013). Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience*, 251, 108–19. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.021>
- Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 939–46. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.03.013>
- Levine, S., & Mody, T. (2003). The long-term psychobiological consequences of intermittent postnatal separation in the squirrel monkey. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 83–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732225>
- Lillard, L. A., Brien, M. J., & Waite, L. J. (1995). Premarital cohabitation and subsequent marital dissolution: a matter of self-selection? *Demography*, 32(3), 437–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829976>
- Lin, Y., Westenbroek, C., Bakker, P., Termeer, J., Liu, A., Li, X., & Ter Horst, G. J. (2008). Effects of long-term stress and recovery on the prefrontal cortex and dentate gyrus in male and female rats. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 18(12), 2762–74. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhn035>
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(3), 175–90. <http://doi.org/10.1038/nrn753>
- Liston, C., Cichon, J. M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M. V., & Gan, W.-B. (2013). Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nature Neuroscience*, 16(6), 698–705. <http://doi.org/10.1038/nn.3387>
- Liston, C., Miller, M. M., Goldwater, D. S., Radley, J. J., Rocher, A. B., Hof, P. R., ... McEwen, B. S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(30), 7870–4. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1184-06.2006>
- Lopez-Fernandez, M. A., Montaron, M.-F., Varea, E., Rougon, G., Venero, C., Abrous, D. N., & Sandi, C. (2007). Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(17), 4552–61. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0396-07.2007>
- Lucassen, P. J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O. F. X., Van Dam, A. M., Rajkowska, G., ... Czéh, B. (2014). Neuropathology of stress. *Acta Neuropathologica*, 127(1), 109–35. <http://doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5>
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology & Behavior*, 59(1), 27–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8848486>
- Luine, V., Villegas, M., Martinez, C., & McEwen, B. S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Research*, 639(1), 167–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180832>
- Lukkes, J. L., Mokin, M. V., Scholl, J. L., & Forster, G. L. (2009). Adult rats exposed to early-life social isolation

- tion exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Hormones and Behavior*, 55(1), 248–256. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.10.014>
- Lupien, S. J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P., ... Meaney, M. J. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, 1(1), 69–73. <http://doi.org/10.1038/271>
- Lupien, S. J., Fiocco, A., Wan, N., Maheu, F., Lord, C., Schramek, T., & Tu, M. T. (2005). Stress hormones and human memory function across the lifespan. *Psychoneuroendocrinology*, 30(3), 225–42. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.08.003>
- Lupien, S., Lecours, A. R., Lussier, I., Schwartz, G., Nair, N. P., & Meaney, M. J. (1994). Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(5 Pt 1), 2893–903. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182446>
- Lüthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D., & Schachner, M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*, 372(6508), 777–9. <http://doi.org/10.1038/372777a0>
- Macdougall, M. J., & Howland, J. G. (2013). Acute stress and hippocampal output: exploring dorsal CA1 and subicular synaptic plasticity simultaneously in anesthetized rats. *Physiological Reports*, 1(2), e00035. <http://doi.org/10.1002/phy2.35>
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(10), 3534–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627386>
- Magariños, A. M., McEwen, B. S., Saboureau, M., & Pevet, P. (2006). Rapid and reversible changes in intra-hippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18775–80. <http://doi.org/10.1073/pnas.0608785103>
- Mahoney, M. M., Rossi, B. V., Hagenauer, M. H., & Lee, T. M. (2011). Characterization of the estrous cycle in *Octodon degus*. *Biology of Reproduction*, 84(4), 664–71. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087403>
- Makino, S., Gold, P. W., & Schulkin, J. (1994). Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, 640(1-2), 105–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8004437>
- Malik, M., Farrell, T., Cripps, T., & Camm, A. J. (1989). Heart rate variability in relation to prognosis after myocardial infarction: selection of optimal processing techniques. *European Heart Journal*, 10(12), 1060–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2606116>
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–26. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
- Manzanares, J., Corchero, J., & Fuentes, J. A. (1999). Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Research*, 839(1), 173–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482810>
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 897–931. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
- Martin, A. L., & Brown, R. E. (2010). The lonely mouse: Verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behavioural Brain Research*, 207(1), 196–207. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.006>
- Martin, L. J., Crawford, M. H., Koertvelyessy, T., Keeping, D., Collins, M., & Huntsman, R. (2000). The popula-

- tion structure of ten Newfoundland outports. *Human Biology*, 72(6), 997–1016. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11236869>
- Mathews, I. Z., Wilton, A., Styles, A., & McCormick, C. M. (2008). Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behavioural Brain Research*, 190(1), 33–40. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.004>
- McCulloch, C. E., & Searle, S. R. (2001). *Generalized, Linear, and Mixed Models*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629234>
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 105–22. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105>
- McEwen, B. S. (2012). Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 Suppl, 17180–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1121254109>
- McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1186, 190–222. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x>
- McEwen, B. S., & Tucker, P. (2011). Critical biological pathways for chronic psychosocial stress and research opportunities to advance the consideration of stress in chemical risk assessment. *American Journal of Public Health*, 101 Suppl, S131–9. <http://doi.org/10.2105/AJPH.2011.300270>
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12614627>
- McKittrick, C. R., Magariños, A. M., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., & Sakai, R. R. (2000). Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse (New York, N.Y.)*, 36(2), 85–94. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(200005\)36:2<85::AID-SYN1>3.0.CO;2-Y](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(200005)36:2<85::AID-SYN1>3.0.CO;2-Y)
- McLaughlin, K. J., Baran, S. E., & Conrad, C. D. (2009). Chronic stress- and sex-specific neuromorphological and functional changes in limbic structures. *Molecular Neurobiology*, 40(2), 166–82. <http://doi.org/10.1007/s12035-009-8079-7>
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Gerrard, J. L., Gothard, K., Jung, M. W., Knierim, J. J., ... Weaver, K. L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *The Journal of Experimental Biology*, 199(Pt 1), 173–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576689>
- McReynolds, J. R., Donowho, K., Abdi, A., McGaugh, J. L., Roozendaal, B., & McIntyre, C. K. (2010). Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 312–21. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.11.005>
- Mechanic, D. (1976). Stress, illness, and illness behavior. *Journal of Human Stress*, 2(2), 2–6. <http://doi.org/10.1080/0097840X.1976.9936061>
- Meijer, J. H., Rusak, B., & Harrington, M. E. (1989). Photically responsive neurons in the hypothalamus of a diurnal ground squirrel. *Brain Research*, 501(2), 315–323. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90648-3](http://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90648-3)
- Merino, J. J., Cordero, M. I., & Sandi, C. (2000). Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *The European Journal of Neuroscience*, 12(9), 3283–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998112>
- Miachon, S., Rochet, T., Mathian, B., Barbagli, B., & Claustrat, B. (1993). Long-term isolation of Wistar rats al-

- ters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH. *Brain Research Bulletin*, 32(6), 611–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693308>
- Miklós, I. H., & Kovács, K. J. (2012). Reorganization of synaptic inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus during chronic psychogenic stress in rats. *Biological Psychiatry*, 71(4), 301–8. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.10.027>
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annual Review of Psychology*, 63, 129–51. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631>
- Miracle, A. D., Brace, M. F., Huyck, K. D., Singler, S. A., & Wellman, C. L. (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(3), 213–8. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.005>
- Misslin, R., Herzog, F., Koch, B., & Ropartz, P. (1982). Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary–adrenal response in the mouse. *Psychoneuroendocrinology*, 7(2-3), 217–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7178375>
- Miyashita, T., Yamaguchi, T., Motoyama, K., Unno, K., Nakano, Y., & Shimoi, K. (2006). Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(2), 775–80. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.098>
- Molteni, R., Fumagalli, F., Magnaghi, V., Roceri, M., Gennarelli, M., Racagni, G., ... Riva, M. A. (2001). Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 37(1-3), 249–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744090>
- Montano, N., Porta, A., Cogliati, C., Costantino, G., Tobaldini, E., Casali, K. R., & Iellamo, F. (2009). Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(2), 71–80. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.07.006>
- Moore, K. E. (1968). Studies with chronically isolated rats: tissue levels and urinary excretion of catecholamines and plasma levels of corticosterone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 46(4), 553–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5668199>
- Moragrega, I., Carmen Carrasco, M., & Redolat, R. (2005). Effects of housing and nicotine on shuttle-box avoidance in male NMRI mice. *Behavioural Brain Research*, 164(2), 178–87. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.022>
- Moragrega, I., Carrasco, M. C., Vicens, P., & Redolat, R. (2003). Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration. *Behavioural Brain Research*, 147(1-2), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659564>
- Morgan, D. G., May, P. C., & Finch, C. E. (1987). Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: effects of age and neurodegenerative disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 35(4), 334–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549845>
- Morinan, A., & Leonard, B. E. (1980). Some anatomical and physiological correlates of social isolation in the young rat. *Physiology & Behavior*, 24(3), 637–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7375588>
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239–260. [http://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](http://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
- Morris, R. G. M., Schenk, F., Tweedie, F., & Jarrard, L. E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *The European Journal of Neuroscience*, 2(12), 1016–1028. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106063>
- Moser, E. I., Moser, M. B., & Andersen, P. (1994). Potentiation of dentate synapses initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learning & Memory*

- (Cold Spring Harbor, N.Y.), 1(1), 55–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467586>
- Moser, M. B., Trommald, M., Egeland, T., & Andersen, P. (1997). Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 380(3), 373–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087519>
- Mousset, S., Hermann, S., Klein, S. A., Bialleck, H., Duchscherer, M., Bomke, B., ... Martin, H. (2005). Prophylactic and interventional granulocyte transfusions in patients with haematological malignancies and life-threatening infections during neutropenia. *Annals of Hematology*, 84(11), 734–741. <http://doi.org/10.1007/s00277-005-1055-z>
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., ... Kiss, J. Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*, 17(3), 413–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816705>
- Murphy, K. J., O'Connell, A. W., & Regan, C. M. (1996). Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrial spatial training. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1268–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752135>
- Murphy, K. J., & Regan, C. M. (1999). Sequential training in separate paradigms impairs second task consolidation and learning-associated modulations of hippocampal NCAM polysialylation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72(1), 28–38. <http://doi.org/10.1006/nlme.1998.3894>
- Musazzi, L., Racagni, G., & Popoli, M. (2011). Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochemistry International*, 59(2), 138–49. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.002>
- Nagaya, T., Yoshida, H., Takahashi, H., & Kawai, M. (2002). Markers of insulin resistance in day and shift workers aged 30-59 years. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75(8), 562–8. <http://doi.org/10.1007/s00420-002-0370-0>
- Nicholson, N. R. (2009). Social isolation in older adults: an evolutionary concept analysis. *Journal of Advanced Nursing*, 65(6), 1342–52. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2008.04959.x>
- Nicoll, R. A., Eccles, J. C., Oshima, T., & Rubia, F. (1975). Prolongation of hippocampal inhibitory postsynaptic potentials by barbiturates. *Nature*, 258(5536), 625–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1207741>
- Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 377(6545), 115–8. <http://doi.org/10.1038/377115a0>
- Niesink, R. J., & van Ree, J. M. (1983). Involvement of the pituitary-adrenal axis in socio-behavioral disturbances after short-term isolation. *Physiology & Behavior*, 30(6), 825–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6684303>
- Nieto Sampedro, M. (2003). Plasticidad neural | Mente y Cerebro | Investigación y Ciencia. Retrieved October 7, 2015, from <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/mente-y-cerebro/numero/4/plasticidad-neural-3906>
- Nijsen, M. J., Croiset, G., Diamant, M., Broekhoven, M. H., De Wied, D., & Wiegant, V. M. (1998). Vagal activation in novelty-induced tachycardia during the light phase in the rat. *Physiology & Behavior*, 63(2), 233–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9423964>
- Nishijo, H., & Ono, T. (1992). Food memory: neuronal involvement in food recognition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1(1), 3–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322999>
- O'Mara, S. M., Sanchez-Vives, M. V., Brotons-Mas, J. R., & O'Hare, E. (2009). Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33(5), 782–90. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.040>
- Oishi, K., Yamamoto, S., Itoh, N., Miyazaki, K., Nemoto, T., Nakakita, Y., & Kaneda, H. (2014). Disruption of

behavioral circadian rhythms induced by psychophysiological stress affects plasma free amino acid profiles without affecting peripheral clock gene expression in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 880–4. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.083>

- Okada, T., Yamada, N., Tsuzuki, K., Horikawa, H. P. M., Tanaka, K., & Ozawa, S. (2003). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *The European Journal of Neuroscience*, 17(2), 341–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542671>
- Otalora, B. B., Vivanco, P., Madariaga, A. M., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2010). Internal temporal order in the circadian system of a dual-phasing rodent, the *Octodon degus*. *Chronobiology International*, 27(8), 1564–79. <http://doi.org/10.3109/07420528.2010.503294>
- Ouchi, H., Ono, K., Murakami, Y., & Matsumoto, K. (2013). Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research*, 238, 146–53. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.029>
- Pacák, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22(4), 502–48. <http://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>
- Palanza, P., Gioiosa, L., & Parmigiani, S. (2001). Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. *Physiology & Behavior*, 73(3), 411–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438369>
- Parmigiani, S., Palanza, P., Rogers, J., & Ferrari, P. F. (1999). Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), 957–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580310>
- Patel, P. D., Lopez, J. F., Lyons, D. M., Burke, S., Wallace, M., & Schatzberg, A. F. (2000). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *Journal of Psychiatric Research*, 34(6), 383–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165305>
- Pawlak, R., Rao, B. S. S., Melchor, J. P., Chattarji, S., McEwen, B., & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18201–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0509232102>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480>
- Pereda-Pérez, I., Popović, N., Otalora, B. B., Popović, M., Madrid, J. A., Rol, M. A., & Venero, C. (2013). Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 31–9. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.004>
- Perelló, M., Chacon, F., Cardinali, D. P., Esquifino, A. I., & Spinedi, E. (2006). Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. *Life Sciences*, 78(16), 1857–62. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.029>
- Pérez, C., Canal, J. R., Domínguez, E., Campillo, J. E., Guillén, M., & Torres, M. D. (1997). Individual housing influences certain biochemical parameters in the rat. *Laboratory Animals*, 31(4), 357–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350707>
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590953>
- Pibiri, F., Nelson, M., Guidotti, A., Costa, E., & Pinna, G. (2008). Decreased corticolimbic allopregnanolone expression during social isolation enhances contextual fear: A model relevant for posttraumatic stress disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14),

5567–72. <http://doi.org/10.1073/pnas.0801853105>

- Picinato, M. C., Haber, E. P., Carpinelli, A. R., & Cipolla-Neto, J. (2002). Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research*, 33(3), 172–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220333>
- Popov, V. I., Bocharova, L. S., & Bragin, A. G. (1992). Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation. *Neuroscience*, 48(1), 45–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1584424>
- Pournajafi-Nazarloo, H., Partoo, L., Yee, J., Stevenson, J., Sanzenbacher, L., Kenkel, W., ... Carter, C. S. (2011). Effects of social isolation on mRNA expression for corticotrophin-releasing hormone receptors in prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*, 36(6), 780–9. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.10.015>
- Powell, S. N., & Abraham, E. H. (1993). The biology of radioresistance: similarities, differences and interactions with drug resistance. *Cytotechnology*, 12(1-3), 325–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764455>
- Pressman, S. D., Cohen, S., Miller, G. E., Barkin, A., Rabin, B. S., & Treanor, J. J. (2005). Loneliness, Social Network Size, and Immune Response to Influenza Vaccination in College Freshmen. *Health Psychology*, 24(3), 297–306. <http://doi.org/10.1037/0278-6133.24.3.297>
- Qian, X., Droste, S. K., Lightman, S. L., Reul, J. M. H. M., & Linthorst, A. C. E. (2012). Circadian and ultradian rhythms of free glucocorticoid hormone are highly synchronized between the blood, the subcutaneous tissue, and the brain. *Endocrinology*, 153(9), 4346–53. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1484>
- Qin, Y., Zhu, Y., Baumgart, J. P., Stornetta, R. L., Seidenman, K., Mack, V., ... Zhu, J. J. (2005). State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes & Development*, 19(17), 2000–15. <http://doi.org/10.1101/gad.342205>
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., ... Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 125(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.006>
- Rapp, P. R., & Heindel, W. C. (1994). Memory systems in normal and pathological aging. *Current Opinion in Neurology*, 7(4), 294–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952236>
- Reuss, B., & von Bohlen und Halbach, O. (2003). Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 313(2), 139–57. <http://doi.org/10.1007/s00441-003-0756-7>
- Rich, E. L., & Romero, L. M. (2005). Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(6), R1628–36. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00484.2004>
- Riedel, G. (1996). Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends in Neurosciences*, 19(6), 219–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8761955>
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140(1-2), 1–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644276>
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiology & Behavior*, 54(4), 729–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248351>
- Rodgers, R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., & Brain, P. F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, 68(1-2), 47–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627061>
- Rodríguez Martínez J, Hernández Lorente MD, C. (2001). INTRODUCCION A LA EXPERIMENTACION CON ANIMALES. Retrieved August 4, 2015, from <http://www.casadellibro.com/libro-introduccion-a-la-exper>

imentacion-con-animales/9788483712313/789230

- Roozendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559837>
- Rosengren, A., Hawken, S., Ôunpuu, S., Sliwa, K., Zubaid, M., Almahmeed, W. A., ... Yusuf, S. (2004). Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*, 364(9438), 953–962. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17019-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17019-0)
- Rosenkranz, J. A., Venheim, E. R., & Padival, M. (2010). Chronic Stress Causes Amygdala Hyperexcitability in Rodents. *Biological Psychiatry*, 67(12), 1128–1136. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.02.008>
- Rozanski, A., Blumenthal, J. A., & Kaplan, J. (1999). Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, 99(16), 2192–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217662>
- Russell, G. M., Kalafatakis, K., & Lightman, S. L. (2014). The importance of biological oscillators for HPA activity and tissue glucocorticoid response: Coordinating stress and neurobehavioural adaptation. *Journal of Neuroendocrinology*, (0), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/jne.12247>
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 26–35. <http://doi.org/10.1038/nrn2285>
- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rütther, E., & Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 127–34. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.03.009>
- Sachser, N., & Lick, C. (1989). Social stress in guinea pigs. *Physiology & Behavior*, 46(2), 137–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2574889>
- Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Basualdo, M. del C., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One*, 8(4), e60052. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>
- Salvatore, P., Indic, P., Murray, G., & Baldessarini, R. J. (2012). Biological rhythms and mood disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(4), 369–79. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3553575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sánchez, M. M., Aguado, F., Sánchez-Toscano, F., & Saphier, D. (1998). Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology*, 139(2), 579–87. <http://doi.org/10.1210/endo.139.2.5720>
- Sanderson, D. J., Good, M. A., Seeburg, P. H., Sprengel, R., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2008). The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Progress in Brain Research*, 169, 159–78. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00009-X](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00009-X)
- Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(12), 917–30. <http://doi.org/10.1038/nrn1555>
- Sandi, C., Davies, H. A., Cordero, M. I., Rodriguez, J. J., Popov, V. I., & Stewart, M. G. (2003). Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *The European Journal of Neuroscience*, 17(11), 2447–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814376>
- Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Kruyt, N. D., Murphy, K. J., & Regan, C. M. (2003). Modulation of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning. *Biological Psy-*

- chiatry, 54(6), 599–607. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129654>
- Sandi, C., & Pinelo-Nava, M. T. (2007). Stress and Memory: Behavioral Effects and Neurobiological Mechanisms. *Neural Plasticity*, 2007, 1–20. <http://doi.org/10.1155/2007/78970>
- Sandi Pérez, C., Venero, C., & Cordero, M. I. (2001). Estrés, memoria y trastornos asociados: implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento. *Ariel*. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=157083>
- Sapolsky, R. M., Alberts, S. C., & Altmann, J. (1997). Hypercortisolism associated with social subordination or social isolation among wild baboons. *Archives of General Psychiatry*, 54(12), 1137–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400351>
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, 7(3), 284–301. <http://doi.org/10.1210/edrv-7-3-284>
- Sayers, B. M. (1973). Analysis of heart rate variability. *Ergonomics*, 16(1), 17–32. <http://doi.org/10.1080/00140137308924479>
- Scaccianoce, S., Del Bianco, P., Paolone, G., Caprioli, D., Modafferi, A. M. E., Nencini, P., & Badiani, A. (2006). Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behavioural Brain Research*, 168(2), 323–5. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.04.024>
- Schachner, M. (1997). Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), 627–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330865>
- Schaffer, D. V., & Gage, F. H. (2004). Neurogenesis and neuroadaptation. *Neuromolecular Medicine*, 5(1), 1–9. <http://doi.org/10.1385/NMM:5:1:001>
- Scheer, F. A. J. L., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4453–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808180106>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 34, 6–17. <http://doi.org/10.1159/000360925>
- Schwabe, L., Tegenthoff, M., Höffken, O., & Wolf, O. T. (2012). Simultaneous glucocorticoid and noradrenergic activity disrupts the neural basis of goal-directed action in the human brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(30), 10146–55. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1304-12.2012>
- Seals, D. R., & Esler, M. D. (2000). Human ageing and the sympathoadrenal system. *The Journal of Physiology*, 528(Pt 3), 407–17. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270159&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Seamans, J. K., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (1998). D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(4), 1613–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9454866>
- Sebastian, V., Estil, J. B., Chen, D., Schrott, L. M., & Serrano, P. A. (2013). Acute physiological stress promotes clustering of synaptic markers and alters spine morphology in the hippocampus. *PLoS One*, 8(10), e79077. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079077>
- Secher, T., Novitskaia, V., Berezin, V., Bock, E., Glenthøj, B., & Klementiev, B. (2006). A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. *Neuroscience*, 141(3), 1289–99. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.059>
- Seeman, T. E. (2000). Health promoting effects of friends and family on health outcomes in older adults.

- American Journal of Health Promotion : AJHP*, 14(6), 362–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067571>
- Seeman, T. E., Lusignolo, T. M., Albert, M., & Berkman, L. (2001). Social relationships, social support, and patterns of cognitive aging in healthy, high-functioning older adults: MacArthur studies of successful aging. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 20(4), 243–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515736>
- Senkov, O., Sun, M., Weinhold, B., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(42), 10888–10989. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0878-06.2006>
- Serra, M., Pisu, M. G., Floris, I., & Biggio, G. (2005). Social isolation-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 8(4), 259–64. <http://doi.org/10.1080/10253890500495244>
- Seymour, C. M., Foley, A. G., Murphy, K. J., & Regan, C. M. (2008). Intraventricular infusions of anti-NCAM PSA impair the process of consolidation of both avoidance conditioning and spatial learning paradigms in Wistar rats. *Neuroscience*, 157(4), 813–20. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.041>
- Sgoifo, A., De Boer, S. F., Buwalda, B., Korte-Bouws, G., Tuma, J., Bohus, B., ... Koolhaas, J. M. (1998). Vulnerability to arrhythmias during social stress in rats with different sympathovagal balance. *The American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 2), H460–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683433>
- Shansky, R. M., & Morrison, J. H. (2009). Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: Effects of circuit, hormones and rest. *Brain Research*, 1293, 108–113. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.062>
- Sharvit, A., Segal, M., Kehat, O., Stork, O., & Richter-Levin, G. (2015). Differential modulation of synaptic plasticity and local circuit activity in the dentate gyrus and CA1 regions of the rat hippocampus by corticosterone. *Stress*, 18(3), 319–327. <http://doi.org/10.3109/10253890.2015.1023789>
- Sherman, S. M., Cheng, Y.-P., Fingerman, K. L., & Schnyer, D. M. (2015). Social support, stress and the aging brain. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*. <http://doi.org/10.1093/scan/nsv071>
- Sherrington CS. (1906). The integrative action of the nervous system : Sherrington, Charles Scott, Sir, 1857-1952 : Free Download & Streaming : Internet Archive. Retrieved May 19, 2015, from <https://archive.org/details/integrativeacti02shergoog>
- Shirasaka, Y., & Wasterlain, C. G. (1995). The effect of urethane anesthesia on evoked potentials in dentate gyrus. *European Journal of Pharmacology*, 282(1-3), 11–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498264>
- Siegrist, J., Siegrist, K., & Weber, I. (1986). Sociological concepts in the etiology of chronic disease: the case of ischemic heart disease. *Social Science & Medicine (1982)*, 22(2), 247–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3515570>
- Silva-Gómez, A. B., Rojas, D., Juárez, I., & Flores, G. (2003). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Research*, 983(1-2), 128–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12914973>
- Sookoian, S., Castaño, G., Gemma, C., Gianotti, T.-F., & Pirola, C.-J. (2007). Common genetic variations in CLOCK transcription factor are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(31), 4242–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4250625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sousa, N., Lukoyanov, N. V, Madeira, M. D., Almeida, O. F., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization

- of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97(2), 253–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799757>
- Stein, P. K., & Kleiger, R. E. (1999). Insights from the study of heart rate variability. *Annual Review of Medicine*, 50, 249–61. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.249>
- Stephens, A., Owen, N., Kunz-Ebrecht, S. R., & Brydon, L. (2004). Loneliness and neuroendocrine, cardiovascular, and inflammatory stress responses in middle-aged men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 29(5), 593–611. [http://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00086-6](http://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00086-6)
- Stiedl, O., & Spiess, J. (1997). Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. *Behavioral Neuroscience*, 111(4), 703–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267648>
- Stöhr, R., Marx, N., & Federici, M. (2014). Tick-tock: is your cardiometabolic risk on the clock? *Diabetes & Vascular Disease Research*, 11(2), 66–74. <http://doi.org/10.1177/1479164113516348>
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5503), 490–3. <http://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>
- Szirmai, I., Buzsáki, G., & Kamondi, A. (2012). 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*, 22(7), 1508–16. <http://doi.org/10.1002/hipo.22001>
- Takuma, K., Mizoguchi, H., Funatsu, Y., Hoshina, Y., Himeno, Y., Fukuzaki, E., ... Yamada, K. (2012). Combination of chronic stress and ovariectomy causes conditioned fear memory deficits and hippocampal cholinergic neuronal loss in mice. *Neuroscience*, 207, 261–73. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.034>
- Tata, D. A., Marciano, V. A., & Anderson, B. J. (2006). Synapse loss from chronically elevated glucocorticoids: relationship to neuropil volume and cell number in hippocampal area CA3. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(3), 363–74. <http://doi.org/10.1002/cne.21071>
- Thayer, J. F., & Lane, R. D. (2009). Claude Bernard and the heart-brain connection: Further elaboration of a model of neurovisceral integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(2), 81–88. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.08.004>
- Thoits, P. A., & Hewitt, L. N. (2001). Volunteer work and well-being. *Journal of Health and Social Behavior*, 42(2), 115–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467248>
- Thorsell, A., Slawecki, C. J., El Khoury, A., Mathe, A. A., & Ehlers, C. L. (2006). The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 83(1), 28–34. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.12.005>
- Tomaka, J., Thompson, S., & Palacios, R. (2006). The relation of social isolation, loneliness, and social support to disease outcomes among the elderly. *Journal of Aging and Health*, 18(3), 359–84. <http://doi.org/10.1177/0898264305280993>
- Toth, M., Mikics, E., Tulogdi, A., Aliczki, M., & Haller, J. (2011). Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Hormones and Behavior*, 60(1), 28–36. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.02.003>
- Touyarot, K., Venero, C., & Sandi, C. (2004). Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 290–305. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604607>
- Tsamis, I. K., Mytilinaios, G. D., Njau, N. S., Fotiou, F. D., Glaftsi, S., Costa, V., & Baloyannis, J. S. (2010). Properties of CA3 dendritic excrescences in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 7(1), 84–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205674>

- Tunkel, A. R., & Sepkowitz, K. A. (2002). Infections Caused by Viridans Streptococci in Patients with Neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, 34(11), 1524–1529. <http://doi.org/10.1086/340402>
- Turner, C. A., Calvo, N., Frost, D. O., Akil, H., & Watson, S. J. (2008). The fibroblast growth factor system is downregulated following social defeat. *Neuroscience Letters*, 430(2), 147–50. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.10.041>
- Turner, C. A., Gula, E. L., Taylor, L. P., Watson, S. J., & Akil, H. (2008). Antidepressant-like effects of intracerebroventricular FGF2 in rats. *Brain Research*, 1224, 63–8. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.088>
- Turner, C. A., Watson, S. J., & Akil, H. (2012). The fibroblast growth factor family: neuromodulation of affective behavior. *Neuron*, 76(1), 160–74. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.037>
- Turner, R. J., & Lloyd, D. A. (1995). Lifetime traumas and mental health: the significance of cumulative adversity. *Journal of Health and Social Behavior*, 36(4), 360–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719054>
- Uchino, B. N., Cacioppo, J. T., & Kiecolt-Glaser, J. K. (1996). The relationship between social support and physiological processes: a review with emphasis on underlying mechanisms and implications for health. *Psychological Bulletin*, 119(3), 488–531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8668748>
- Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., & Herman, J. P. (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 291(5), E965–73. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2006>
- Uno, H., Tarara, R., Else, J. G., Suleman, M. A., & Sapolsky, R. M. (1989). Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(5), 1705–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2723746>
- Ursin, H. (1991). Psychobiology of stress and attachment: the biobehavioural view. *WHO Regional Publications. European Series*, 37, 173–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1817535>
- Venero, C., Herrero, A. I., Touyarot, K., Cambon, K., López-Fernández, M. A., Berezin, V., ... Sandi, C. (2006). Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *The European Journal of Neuroscience*, 23(6), 1585–95. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04663.x>
- Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M., & Sandi, C. (2002). Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience*, 115(4), 1211–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453492>
- Vincen, T, J, ., & Cristofalo. (1996). Ten Years Later : What Have We Learned About Human Aging from Studies of Cell Cultures? Retrieved September 9, 2015, from <http://gerontologist.oxfordjournals.org/content/36/6/737.full.pdf>
- Viveros, M. P., Hernández, R., Martínez, I., & González, P. (1988). Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Revista Española de Fisiología*, 44(3), 315–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3231885>
- von Bohlen und Halbach, O., Zacher, C., Gass, P., & Unsicker, K. (2006). Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 83(4), 525–531. <http://doi.org/10.1002/jnr.20759>
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6810–8. <http://doi.org/20026655>
- Waite, L. J., & Hughes, M. E. (1999). At risk on the cusp of old age: living arrangements and functional status among black, white and Hispanic adults. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences*

- and *Social Sciences*, 54(3), 5136–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363044>
- Walmod, P. S., Kolkova, K., Berezin, V., & Bock, E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochemical Research*, 29(11), 2015–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15662836>
- Waltz, M., Badura, B., Pfaff, H., & Schott, T. (1988). Marriage and the psychological consequences of a heart attack: a longitudinal study of adaptation to chronic illness after 3 years. *Social Science & Medicine* (1982), 27(2), 149–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3175701>
- Wang, B., He, P., & Dong, B. (2015). Associations between social networks, social contacts, and cognitive function among Chinese nonagenarians/centenarians. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 60(3), 522–7. <http://doi.org/10.1016/j.archger.2015.01.002>
- Wang, Q., Van Heerikhuizen, J., Aronica, E., Kawata, M., Seress, L., Joels, M., ... Lucassen, P. J. (2013). Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age. *Neurobiology of Aging*, 34(6), 1662–73. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.019>
- Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J. A., Christopherson, K. S., & El-Husseini, A. (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(42), 9244–9. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-04.2004>
- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 588(2), 341–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1393587>
- Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 279–95. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.015>
- Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of Neurobiology*, 49(3), 245–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745662>
- West, A. P. (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 14(6), 863–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2277851>
- Wielgat, P., Walesiuk, A., & Braszko, J. J. (2011). Effects of chronic stress and corticosterone on sialidase activity in the rat hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 222(2), 363–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.070>
- Wilson, L. L., Terosky, T. L., Stull, C. L., & Stricklin, W. R. (1999). Effects of individual housing design and size on behavior and stress indicators of special-fed Holstein veal calves. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1341–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375210>
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 307(3), 437–59. <http://doi.org/10.1002/cne.903070308>
- Wongwitdecha, N., & Marsden, C. A. (1996). Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behavioural Brain Research*, 75(1-2), 27–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800657>
- Wood, S. C., & Anagnostaras, S. G. (2011). Interdependence of measures in Pavlovian conditioned freezing. *Neuroscience Letters*, 505(2), 134–139. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.10.006>
- Worth, L. J., & Slavin, M. A. (2009). Bloodstream infections in haematology: Risks and new challenges for prevention. *Blood Reviews*, 23(3), 113–122. <http://doi.org/10.1016/j.blre.2008.10.003>

- Wright, J. W., & Kern, M. D. (1992). Stereotaxic atlas of the brain of *Octodon degus*. *Journal of Morphology*, 214(3), 299–320. <http://doi.org/10.1002/jmor.1052140306>
- Yates, G., Panksepp, J., Ikemoto, S., Nelson, E., & Conner, R. (1991). Social isolation effects on the “behavioral despair” forced swimming test: effect of age and duration of testing. *Physiology & Behavior*, 49(2), 347–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062907>
- Yeh, S.-C. J., & Liu, Y.-Y. (2003). Influence of social support on cognitive function in the elderly. *BMC Health Services Research*, 3(1), 9. <http://doi.org/10.1186/1472-6963-3-9>
- Yi, E.-S., & Hwang, H.-J. (2015). A study on the social behavior and social isolation of the elderly Korea. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 11(3), 125–32. <http://doi.org/10.12965/jer.150215>
- Yoo, S.-S., Gujar, N., Hu, P., Jolesz, F. A., & Walker, M. P. (2007). The human emotional brain without sleep—a prefrontal amygdala disconnect. *Current Biology: CB*, 17(20), R877–8. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.007>
- Yoshiya, M., Komatsuzaki, Y., Hojo, Y., Ikeda, M., Mukai, H., Hatanaka, Y., ... Kawato, S. (2013). Corticosterone rapidly increases thorns of CA3 neurons via synaptic/extranuclear glucocorticoid receptor in rat hippocampus. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 191. <http://doi.org/10.3389/fncir.2013.00191>
- Young, R. A. (1976). Fat, Energy and Mammalian Survival. *Integrative and Comparative Biology*, 16(4), 699–710. <http://doi.org/10.1093/icb/16.4.699>
- Yusufishaq, S., & Rosenkranz, J. A. (2013). Post-weaning social isolation impairs observational fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 242, 142–9. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.050>
- Zelena, D., Mergl, Z., Földes, A., Kovács, K. J., Tóth, Z., & Makara, G. B. (2003). Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 285(5), E1110–E1117. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00219.2003>
- Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Zhou, Y.-X., Lu, B., & Deng, C.-X. (2007). Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biological Psychiatry*, 62(5), 381–90. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.019>
- Zhong, X., Xiao, Y., Huang, R., & Huang, X. (2005). [The effects of overnight sleep deprivation on cardiovascular autonomic modulation]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 44(8), 577–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194407>
- Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., & Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, 110(4), 443–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202034>
- Ziegenhorn, A. A., Schulte-Herbrüggen, O., Danker-Hopfe, H., Malbranc, M., Hartung, H.-D., Anders, D. Hellweg, R. (2007). Serum neurotrophins—a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiology of Aging*, 28(9), 1436–45. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.011>
- Zunzunegui, M.-V., Alvarado, B. E., Del Ser, T., & Otero, A. (2003). Social networks, social integration, and social engagement determine cognitive decline in community-dwelling Spanish older adults. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 58(2), S93–S100. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>