

TESIS DOCTORAL DE
YOLANDA PEÑA OLIVER

El Enriquecimiento Ambiental en ratas: efectos diferenciales en función del sexo

Dept. de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia.
Facultat de Medicina.
Universitat Autònoma de Barcelona.
Bellaterra 2007

Esta tesis ha sido supervisada por la **Dra. Rosa M. Escorihuela Agulló** (Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona).

El tutor de esta tesis ha sido **Antonio Armario García** (Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona).

A mis padres

*Un hombre libre de escoger entre dos manjares
igualmente distantes de él y que exciten con la misma
intensidad su apetito, se moriría de hambre antes de
escoger uno de los dos.*

Dante Alighieri. La divina comedia.

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho esta oportunidad para dar las gracias a todas aquellas personas sin cuya ayuda esta tesis no se podría haber llevado a cabo. En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Rosa M. Escorihuela, por enseñarme todo lo que sé sobre ciencia y por toda la ayuda que me ha prestado durante este tiempo. Primero, quiero agradecerle por la paciencia que mostraste, sobretodo en los primeros momentos, y también por los ánimos que me has ido dando de forma constante. Gracias por los buenos consejos, por los cortaditos de la mañana mientras planificábamos el día, por tu confianza y por tu amistad.

También quisiera aprovechar este momento para agradecer al Dr. Antonio Armario y a la Dra. Roser Nadal por darme la oportunidad de llevar a cabo los experimentos de autoadministración y por integrarnos en su grupo. También gracias a todos los compañeros del departamento de Fisiología, a Xavi, Raul, David, Silvia, Humberto y sobretodo a Núria y Cristina, por su ayuda en los experimentos, y a todos los demás.

Y sobretodo muchas gracias al grupillo de locos y locas que conforman el Psiquiátrico, gracias Marc, porque has compartido conmigo la mayor parte de este camino, por enseñarme a ver los árboles del bosque y por la amistad y la complicidad que compartimos, y gracias Montse, Magda, Toni, Regi, Gloria, Elia y Esther, por ser los mejores compañeros que he tenido nunca y porque sin vosotros el día a día no hubiera sido tan y tan divertido. Muchas gracias a todos por las aventurillas que hemos vivido juntos y por las que nos quedan por vivir.

También gracias al resto de compañeros, a Albert, Rafa, Xavi, Lidia, Adolf, Yolanda y Bea, sobretodo a Yolanda, sin la cual no hubiera conocido nunca a Rosa y no me hubiera embarcado en esta aventura.

Y también quiero dar las gracias a Vago, por ser un compañero genial durante las horas de trabajo en el estabulario, y a Marga, por su alegría y su espontaneidad, por sus sabios juicios y por su amistad.

Gracias también a Ana, por ser una buena amiga y hacerme sentir como en casa desde el primer momento, y a Paula, Paola y Laura, porque vuestra amistad me ha acompañado en algunos de los momentos más difíciles y sobretodo a Cesi y Rocío por acompañarme durante toda la vida y seguir queriéndome, y por supuesto a Jesús, a quien debo tanto.

Y finalmente, quiero agradecer a mi familia por el apoyo y el cariño que siempre me han dado, gracias María, Montse y David, por ser los mejores hermanos del mundo y porque sé que puedo contar con vosotros en todo momento, gracias Yaya, por todas tus historias y por tus caldos reconstituyentes y sobretodo quiero dar las gracias a mis padres, María Oliver y Juan Peña, por ser unas personas excepcionales y haber enriquecido siempre mi ambiente.

A todos, Muchas Gracias.

Para la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado entre los años 2003-2006 de una beca para la formación de investigadores, además de una bolsa de viaje que me permitió hacer una estancia en el Departamento de Psicología Experimental de la Universidad de Cambridge otorgada por la Generalitat de Catalunya (2003FI 00418).

Asimismo, la infraestructura específica del laboratorio de conducta en los que se ha realizado este trabajo y del material utilizado han sido financiados por el Plan Nacional de I+D+I 2000-2003 (BSA2001-2574), por la Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00990), por la DGICYT, Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-00358) y por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad (P1051160).

ÍNDICE

	Página
Resumen/Abstract	13
I. Introducción general	17
1. Enriquecimiento Ambiental (EA)	19
1.1. Enriquecimiento Ambiental en animales	21
1.1.1. Efectos morfológicos	21
1.1.2. Aprendizaje	26
1.1.3. Actividad espontánea, exploración y emotividad	28
1.1.4. Efectos neuroquímicos	31
1.1.5. Efectos en animales con alteraciones del sistema nervioso	33
1.2. Enriquecimiento Ambiental en humanos	36
2. Influencia del sexo sobre algunos aspectos conductuales y cerebrales	41
3. Efectos diferenciales del EA en función del sexo	48
4. Objetivos generales	51
II. Primer bloque experimental: Estudio de los efectos del EA en la conducta emocional, respuesta del eje HPA, exploración, interacción social, filtraje sensoriomotor y aprendizaje	53
1. Introducción	55
1.1. Interacción y memoria social	55
1.2. Exploración y respuesta emocional	57
1.2.1. Laberinto elevado en cruz	57
1.2.2. Respuesta de sobresalto	58
1.2.3. Respuesta hormonal del eje HPA	60

1.3. Evaluación de la atención y del filtraje sensoriomotor	62
1.4. Evaluación de las capacidades de aprendizaje y memoria: el laberinto Hebb-Williams	65
1.5. Planteamiento y objetivos específicos	67
2. Material y Métodos	68
2.1. Sujetos	68
2.2. Procedimiento general	69
2.2.1. Enriquecimiento Ambiental	69
2.2.2. Pruebas	69
2.2.2.1. Pruebas de conducta	69
2.2.2.1.1. Pruebas de exploración y discriminación social	69
2.2.2.1.2. Laberinto elevado en cruz	70
2.2.2.1.3. Tabla de agujeros	70
2.2.2.1.4. Respuesta de Sobresalto e inhibición prepulso	71
2.2.2.1.5. Laberinto Hebb-Williams	72
2.2.2.2. Respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA)	73
2.2.2.2.1. Muestras de sangre	75
2.2.2.2.2. Análisis bioquímicos	75
2.3. Secuencia experimental	76
2.4. Análisis estadístico de los resultados	77
3. Resultados	79
3.1. Estudio I. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad, interacción y memoria social	79
3.1.1. Pesos	79
3.1.2. Pruebas de discriminación social	80
3.1.3. Laberinto elevado en cruz	82
3.2. Estudio II. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad, respuesta del eje HPA, conducta exploratoria, interacción social, filtros sensoriomotores y aprendizaje	83
3.2.1. Pesos	83
3.2.2. Conducta exploratoria en la tabla de agujeros	85
3.2.3. Respuesta del eje HPA	87

3.2.4. Laberinto elevado en cruz	88
3.2.5. Respuesta de sobresalto e inhibición prepulso	90
3.2.6. Discriminación social	91
3.2.7. Laberinto Hebb-Williams	94
4. Discusión	101
5. Conclusiones	119

III. Segundo bloque experimental: Estudio de los efectos del EA en la conducta de autoadministración de cocaína

121

1. Introducción	123
1.1. Generalidades sobre la adicción a drogas	123
1.2. Efectos del EA en la conducta adictiva	125
1.3. Diferencias de sexo en la conducta adictiva	128
1.4. Actividad motora inespecífica	132
1.5. Planteamiento y objetivos específicos	134
2. Material y métodos	135
2.1. Sujetos	135
2.2. Procedimiento general	136
2.2.1. Enriquecimiento ambiental	136
2.2.2. Pruebas	136
2.2.2.1. Actimetría	136
2.2.2.2. Ingesta de comida y peso de los animales	136
2.2.2.3. Cajas de autoadministración operante	136
2.2.2.4. Entrenamiento de refuerzo por comida	137
2.2.2.5. Implantación quirúrgica del catéter	139
2.2.2.6. Autoadministración de cocaína	140
2.3. Secuencia experimental	141
2.4. Análisis estadístico de los resultados	142
3. Resultados	144
3.1. Estudio de la actividad motora basal: Actimetría	144

3.2. Efecto del EA en la ingesta y el peso de los animales	145
3.3. Efecto del EA en la adquisición de autoadministración de cocaína	146
3.3.1. Entrenamiento de refuerzo por comida	146
3.3.2. Efectos del EA en la sesión de razón progresiva por comida	148
3.3.3. Adquisición de la autoadministración de cocaína en el programa de razón fija 1 (FR1)	149
3.3.4. Selección de los animales que alcanzan el criterio de adquisición en FR1 y análisis de la conducta de autoadministración en los programas de FR1, FR3 y FR5	152
3.3.5. Autoadministración de cocaína en el programa de razón progresiva	156
4. Discusión	157
5. Conclusiones	169
IV. Discusión General	171
V. Conclusiones Generales	185
Referencias	189

RESUMEN

El tratamiento de Enriquecimiento Ambiental (EA) incrementa la estimulación y proporciona oportunidades más ricas y variadas de interacción con el entorno social y físico y ha demostrado ejercer una gran variedad de efectos a largo plazo a nivel neuroanatómico, neuroquímico y conductual en varias especies animales. El EA aumenta el tamaño de la corteza cerebral, incrementa las ramificaciones dendríticas y la neurogénesis hipocampal y mejora las capacidades cognitivas en una variedad de tareas. No obstante, aunque algunas investigaciones han descrito efectos diferenciales del EA en función del sexo, la gran mayoría de estudios que han evaluado los efectos del EA se han realizado con sujetos macho. Además, en humanos existen importantes diferencias de sexo en un gran número de psicopatologías, como la depresión, la esquizofrenia o la adicción a drogas, lo cual evidencia la necesidad de incluir a las hembras en los diseños experimentales. La presente tesis se propone estudiar los efectos del EA en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos en pruebas que evalúan exploración y memoria social, reactividad emocional, mecanismos atencionales, aprendizaje y adicción a drogas a lo largo de dos bloques experimentales. El tratamiento se inició después del destete colocando a los animales en grupos de 9-12 individuos en jaulas de enriquecimiento durante 8 o 12 semanas, donde se cambiaban la configuración espacial y los objetos. Las ratas control se estabularon en grupos (2-3 individuos) en jaulas estándar.

En el primer bloque experimental se realizaron dos estudios con el propósito de evaluar los efectos del EA en exploración social mediante la prueba de Discriminación Social; en reactividad emocional, mediante el Laberinto elevado en cruz, la respuesta de sobresalto ante un estímulo acústico y la respuesta del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal en condiciones basales y en respuesta a la exposición a la prueba de la Tabla de agujeros; en mecanismos atencionales, mediante el paradigma de inhibición prepulso; y en aprendizaje espacial, mediante el laberinto Hebb-Williams. Los resultados de este primer bloque mostraron que el EA disminuyó la emotividad en machos y hembras como se observó por la mayor conducta en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz, la mayor exploración en la tabla de agujeros y la menor reactividad del eje HPA en comparación con

los animales control. De manera inesperada, el EA disminuyó el porcentaje de inhibición prepulso en machos y hembras, resultado que contrastó con el efecto de mejora en la ejecución del laberinto Hebb-Williams que produjo el tratamiento en los mismos sujetos experimentales. En las pruebas de exploración y reconocimiento social, el EA mostró un efecto diferencial en función del sexo ya que aumentó la exploración y el reconocimiento social en los machos pero los disminuyó en las hembras.

El segundo bloque experimental constituyó el tercer estudio, donde se evaluaron los efectos del EA en el consumo de cocaína mediante el paradigma de autoadministración intravenosa. Los resultados mostraron efectos de sexo y de tratamiento, de forma que las hembras se autoadministraron más cocaína que los machos, y el EA aumentó la autoadministración en machos y hembras de forma diferencial. Así, el EA afectó predominantemente a las hembras, quienes aumentaron la conducta de búsqueda de cocaína realizando un número mayor de respuestas en la palanca asociada a la droga.

En conjunto, los resultados del presente trabajo indican que el tratamiento de EA produce efectos diferenciales en machos y hembras en función de las tareas evaluadas.

ABSTRACT

Environmental Enrichment (EE) increases stimulation and provides richer sensory, cognitive and motor stimulation through the interaction with the social and physical environment and produces a wide range of neuroanatomical, neurochemical and behavioral effects in several animal species. Various studies have shown that EE increases brain weight and thickness, dendritic branching and length and also increases hippocampal neurogenesis and survival of newly generated neurons. With regard to cognitive function, it has been consistently shown that EE improved spatial learning in several tasks. But the results obtained from the experiments measuring the effects of EE treatment have been done mainly with male rats, though some results clearly showed sex differences in response to EE. Furthermore, a surge of findings from animals and humans have shown sex differences in several psychopathologies, as depression, schizophrenia and drug addiction. The aim of the present thesis was to study sex differential effects of EE in Sprague-Dawley rats in tasks that measure social exploration and memory, emotional reactivity, sensorimotor gating, spatial learning and drug addiction.

The work has been divided in 2 experimental blocks: after weaning, rats were housed in groups of 9 -12 in enriched cages during 8 or 12 weeks, where the spatial configuration and objects were changed frequently. Control rats were housed in groups (2-3 animals) in standard cages.

In the first experimental work we did two studies, where we studied social exploration in the Social discrimination test; emotional reactivity in the Elevated plus maze, Acoustic startle response and responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in response to the Hole board test; we measured attentional mechanisms through the prepulse inhibition paradigm; and spatial learning in the Hebb-Williams maze. The main results indicated that enriched animals appeared less emotional since they increase open arm activity, they showed more exploratory behavior in the hole board and less HPA reactivity than controls. EE showed a significant reduction of prepulse inhibition compared to control rats, in contrast with the improvement showed by the enriched rats in the Hebb-Williams maze. Furthermore, the EE effects in the patterns of social investigation were sex

dependent, and EE treatment increased exploratory behavior and social discrimination in males and decreased social discrimination in females.

In the second experimental block we performed the third study, where we evaluated the effects of EE on cocaine consumption by means of the intravenous self-administration paradigm. The results showed sex and treatment effects, females were more sensitivity to cocaine as shown by the greater amount of cocaine intake. EE increased self-administration in both male and female rats, but females were more affected than males as showed by the higher levels of infusions and the increase in the responses in the active lever.

The results of the present thesis indicate that EE treatment produce differential effects in male and female rats in a task dependent manner.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Desde antes del nacimiento un organismo ya está sometido a las influencias del medio. Diversos estudios indican que el feto humano desarrolla respuestas conductuales a partir del cuarto mes de gestación: responde a sonidos, presenta una respuesta hormonal ante el estrés, se habitúa ante estímulos repetidos, presenta diferentes patrones cardiovasculares y motores en respuesta al estrés, y cuando avanza la gestación aumenta la variabilidad del ritmo cardíaco en respuesta a la estimulación (para revisión ver Austin et al. 2005). En diversos trabajos se ha estudiado una forma básica de aprendizaje como es la respuesta de habituación en fetos humanos, en donde se muestra una disminución de la respuesta tras la presentación repetida de un estímulo. Así, utilizando el paradigma de habituación del ritmo cardíaco a una estimulación vibroacústica administrada a fetos de 32 semanas de gestación, se encontró que los fetos de las madres que presentaban elevados niveles de la hormona corticotropa (CRH) se habituaron y deshabituaron más lentamente que los fetos de las madres que presentaban bajos niveles de CRH, apoyando la idea de que elevados niveles de CRH en la placenta influyen negativamente en el neurodesarrollo del feto (Sandman et al., 1999). También se han encontrado evidencias sobre los efectos a largo plazo de las influencias negativas que comporta el estrés prenatal. Por ejemplo, adolescentes de 14-15 años, cuyas madres presentaron altos niveles de ansiedad durante las semanas 12-22 del embarazo, respondieron de forma más impulsiva en una tarea de atención dividida (Van den Bergh et al., 2005), y a los 17 años continuaron presentando déficit en tareas relacionadas con la activación de la corteza orbitofrontal que requerían un alto grado de control ejecutivo (Mennes et al., 2006).

Este tipo de estudios son ejemplos de la importancia que pueden tener los factores ambientales en la determinación de la conducta, e indican que el producto final será fruto de las interacciones que se produzcan entre el acervo genético y las características del ambiente de crianza en el que el organismo se desarrolle. Más concretamente y en relación al estudio de la interacción ambiente-organismo, los efectos del tratamiento de Enriquecimiento Ambiental han puesto en evidencia el importante papel que juega la experiencia en el desarrollo definitivo del sistema nervioso y su reflejo en la conducta.

El científico italiano MV. Malacarne en el siglo XVIII, observó que los pollos que habían sido criados en un ambiente rico en estímulos tenían un cerebro de mayor tamaño respecto de los que habían vivido en jaulas pequeñas y que provenían de huevos de las mismas

gallinas, postulando entonces que la experiencia podía alterar la estructura cerebral. Charles Darwin, en 1874, ya otorgó una gran importancia al papel de las oportunidades ambientales en la determinación del tamaño cerebral al señalar que los cerebros de los conejos domésticos eran menores que los de los conejos salvajes, y postuló que esas diferencias podrían atribuirse al confinamiento y al relativo empobrecimiento que comporta la vida doméstica durante generaciones, haciendo que los animales no ejerciten el intelecto, el instinto y los sentidos. En 1911, S. Ramón y Cajal sugirió que el ejercicio cerebral podía establecer nuevas y más numerosas conexiones entre neuronas en el cerebro. Posteriormente, Hebb, en 1949 hipotetizó que los animales criados en ambientes enriquecidos durante la infancia podían desarrollar cambios permanentes en el cerebro relacionados con el aumento de las capacidades de solución de problemas, se basaba en el hecho de que las ratas utilizadas como mascotas, y que han experimentado condiciones de vida enriquecidas, eran mejores en la ejecución de laberintos que las ratas de laboratorio confinadas en jaulas (citados en Renner y Rosenzweig, 1987).

A principios de la década de los 60 en el Laboratorio de Psicología de Berkeley (Krech et al., 1962) se realizaron los primeros estudios donde se demostraban claramente los primeros efectos neuroanatómicos del Enriquecimiento Ambiental (EA). El diseño experimental utilizado en estos trabajos pioneros consistía en colocar grupos de 12 ratas macho de 25 días de edad en una jaula grande (64 x 64 x 46 cm) donde había un pequeño laberinto de madera que las ratas utilizaban de nido, y en la que se introducían diariamente juguetes de madera. Además, las ratas exploraban un laberinto con diferentes configuraciones que variaban diariamente durante 30 minutos al día. A los 50 días de edad se realizó el entrenamiento en el laberinto Hebb-Williams, donde las ratas enriquecidas recibieron pellets de glucosa como refuerzo, aunque tenían acceso a comida y agua *ad libitum*. Simultáneamente, a los 25 días edad, ratas de la misma camada que las enriquecidas se colocaron en una condición de empobrecimiento, en una jaula individual de metal (28 x 20 x 20 cm) con acceso a comida y agua *ad libitum*, de manera que recibían un pellet de glucosa cada vez que lo recibía la rata enriquecida. Los análisis histológicos del cerebro de los animales mostraron que estas manipulaciones ambientales provocaban cambios neuroquímicos y de peso cerebral. El resultado más sorprendente fue el incremento de peso de la corteza visual (8%) y de la corteza somatosensorial (3%) en los animales enriquecidos respecto a los aislados. A partir de estos trabajos pioneros, distintos autores fueron demostrando otros efectos neuroanatómicos y conductuales en animales que habían

sido criados en jaulas de enriquecimiento durante períodos que oscilaban desde varios días, hasta semanas o meses (Bennett et al., 1970; Greenough et al., 1973; Rampon et al., 2000a; para revisión ver Van Praag et al., 2000).

En los apartados siguientes se describen los principales efectos que el EA ha mostrado en varios campos: cambios morfológicos derivados del tratamiento, tareas de aprendizaje y memoria, actividad espontánea y exploración, cambios neuroquímicos y efectos del enriquecimiento en animales con alteraciones o lesiones del SNC. Este primer bloque de la Introducción concluirá con algunos apuntes sobre la aplicabilidad de los resultados obtenidos mediante el estudio con animales de laboratorio así como los efectos que pueden producir ambientes enriquecidos en el ámbito humano

1.1. Enriquecimiento Ambiental en animales

1.1.1. Efectos Morfológicos

El cerebro es una estructura que posee la propiedad de la plasticidad, lo cual significa que puede cambiar en función de las señales del entorno, y que tiene una enorme capacidad de adaptación. Los factores ambientales influyen en la función y estructura cerebral, de forma que la experiencia tiene consecuencias más o menos perdurables a diferentes niveles de integración.

Los primeros cambios biológicos contundentes causados por el enriquecimiento en la rata fueron el incremento de peso y de volumen cortical de hasta el 5% (Rosenzweig et al., 1962). Este efecto se observó especialmente en la corteza visual, somatosensorial y frontal posterior mientras que no se apreciaron cambios en otras regiones corticales como la corteza prefrontal o temporal.

Otros trabajos han mostrado un incremento en el grosor de la corteza occipital del 6.2% (Diamond et al., 1964), del volumen del hipocampo de las ratas enriquecidas (Walsh et al., 1969), incrementos significativos en el volumen de la corteza motora y somatosensorial (Rosenzweig et al., 1972) y un aumento del área total cortical (Juraska y Meyer, 1986). Al parecer, el cambio de mayor magnitud se produce en la región occipital siendo las diferencias medias entre sujetos enriquecidos y no enriquecidos típicamente de un 8-9% (Renner y Rosenzweig, 1987; Beaulieu y Colonnier, 1989a). Dado que la corteza occipital es electrofisiológicamente activa durante la estimulación visual, se podría asumir que el

enriquecimiento produce un efecto fundamentalmente de carácter visual. Por otro lado, la ausencia de experiencia visual desde el nacimiento dificulta la maduración de las funciones visuales, las conexiones visuales no se consolidan y permanecen plásticas incluso después del período crítico normal, dificultando así el desarrollo normal de la agudeza visual (Berardi et al., 2003). En relación con esto, los resultados de un estudio reciente en el cual se administró el EA durante el período crítico de desarrollo de la agudeza visual, que en la rata finaliza alrededor del día 45 postnatal, indicaron que la crianza en condiciones de ausencia de luz provocaba alteraciones en el desarrollo de las columnas de dominancia ocular y el tratamiento de enriquecimiento contrarrestaba estas alteraciones. Esto es, el enriquecimiento promovió el desarrollo y la maduración fisiológica de las conexiones en la corteza visual de ratas que habían sido estabuladas en condiciones de oscuridad en comparación con las ratas estabuladas en oscuridad de forma estándar, lo que demuestra que otros factores independientes de la experiencia visual contribuyen al desarrollo de la corteza visual (Bartoletti et al., 2004).

El efecto del enriquecimiento ambiental no se observa únicamente en áreas corticales sino que también afecta a estructuras subcorticales tales como el tubérculo cuadrigémino superior, el estriado y el cerebelo (Greenough et al., 1973). Esto sugiere que manipulaciones del entorno realizadas en la vida postnatal no solamente modifican el trofismo de áreas eminentemente plásticas como la corteza cerebral, sino también de otras que han sido consideradas menos susceptibles de plasticidad. Los cambios corticales observados posiblemente dependen de un efecto del enriquecimiento sobre la densidad neuronal, aunque hay diferencias regionales en este efecto (Diamond et al., 1964). Las diferencias en densidad neuronal son debidas tanto a una variación en el número de ciertas poblaciones neuronales como a un aumento en el número de células gliales (Diamond et al., 1966; Sirevaag y Greenough, 1991). Este hecho probablemente indique mayores niveles de actividad en la corteza cerebral, ya que muchas funciones de las células gliales tienen que ver con el aporte metabólico necesario para la actividad neuronal. Esta interpretación viene apoyada por el incremento en el tamaño de capilares sanguíneos encontrado por Diamond et al. (1964) tras el enriquecimiento en ratas y por la inducción de la expresión de factores neurotróficos derivados de la expresión glial (Young et al., 1999).

La inducción de cambios morfológicos en el SNC no sólo se ha observado en roedores. El simple hecho de enriquecer el ambiente mediante la introducción de piedras en los tanques de agua donde se crían los salmones provoca un incremento en el tamaño del cerebelo,

comparado con los salmones que se han criado en tanques convencionales (Kihslinger y Nevitt, 2006). En otro trabajo realizado en el 2006, Siwak-Tapp y sus colaboradores encontraron que aumentaba el número de neuronas hilares en el hipocampo (alrededor de un 18%) comparados con los controles de su misma edad utilizando perros beagle viejos a los que sometieron a enriquecimiento y a un entrenamiento cognitivo 6 días a la semana en el que los perros debían solucionar problemas de aprendizaje espacial.

Los cambios más sorprendentes que han despertado un mayor interés científico durante los últimos años son los referentes a la capacidad del EA para incrementar la neurogénesis. El enriquecimiento aumentó el número de neuronas granulares en el giro dentado de la rata (Susser y Wallace, 1982) y del ratón (Kempermann et al., 1997a,b). Asimismo, se han descrito incrementos en el número de neuronas en la corteza occipital del gato (Beaulieu y Colonnier, 1989b) y en el número de cuerpos celulares de Purkinje en el cerebelo del macaco japonés (Floeter y Greenough, 1979). Además, el tratamiento de EA también aumentó la neurogénesis en el giro dentado de ratas viejas comparadas con las controles de su misma edad (Segovia et al., 2006), con lo que se demuestra que este fenómeno se produce durante toda la vida del organismo.

No solamente se producen cambios en la densidad, sino que la propia citoarquitectura se ve modulada por el enriquecimiento. Así, tras el enriquecimiento ambiental se ha descrito una expansión del citoplasma en rata (Greenough et al., 1973) y gato (Beaulieu y Colonnier, 1989a), también se han encontrado diferencias significativas en la longitud de las dendritas de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza cerebral y de las células estrelladas de la capa IV, así como de las células de Purkinje del cerebelo (Floeter y Greenough, 1979). Estos cambios son casi inmediatos, ya que se han podido encontrar incrementos en la longitud de las dendritas y en el número total de ramificaciones de las dendritas basilares de las neuronas piramidales de la capa III en la corteza occipital tras sólo cuatro días de enriquecimiento (Wallace et al., 1992).

Además, el enriquecimiento es capaz de incrementar la complejidad del árbol dendrítico, lo cual queda reflejado por un incremento en la ramificación dendrítica (Volkmar y Greenough, 1972; Pascual y Figueroa, 1996), en el número de espinas dendríticas (Rampon et al., 2000b) y en la densidad de las espinas dendríticas en ratas (Comery et al., 1995; Berman et al., 1996). Como las espinas dendríticas son lugares donde se establecen las conexiones sinápticas, este incremento en densidad es una indicación indirecta de un incremento en la actividad sináptica de las neuronas piramidales, de manera que este

aumento en el número de puntos de intercambio de información podría tener consecuencias funcionales sobre la capacidad de procesamiento de información. De hecho, se ha descrito una mayor proporción de sinapsis por neurona en ratas enriquecidas (Rampon et al., 2000b). Además, la morfología de la sinapsis también cambia, de forma que el espacio sináptico es de mayor tamaño en ratas enriquecidas, incrementando el área total de contacto sináptico y el tamaño sináptico medio, fundamentalmente en la corteza occipital (Mollgaard et al., 1971). A nivel estructural, también se observan mayores concavidades presinápticas y esta característica está asociada a una mayor eficacia sináptica (Wesa et al., 1982).

Todas estas modificaciones neuromorfológicas encuentran una explicación mejor si se tienen en cuenta los resultados que muestran la influencia del EA sobre la expresión génica y la producción de factores neurotróficos. Se ha visto que el enriquecimiento incrementa la expresión de un gran número de genes, muchos de los cuales están relacionados con la estructura, la plasticidad y la transmisión neuronal (Rampon et al., 2000a). Se ha encontrado un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis y el procesamiento de macromoléculas, incluyendo factores de transcripción, y enzimas relacionadas con el DNA, RNA y el procesamiento de proteínas. También se ha descrito una diferente expresión de genes que codifican proteínas proteolíticas encargadas de la señalización y la apoptosis. Por ejemplo, la prolyl oligopeptidasa, la caspasa-6 y la proteasa 4 mostraron una disminución tras 3 y 6 horas de exposición en ratones a un ambiente enriquecido. La prolyl oligopeptidasa regula la degradación de neuropéptidos, como la vasopresina y la sustancia P, que juegan un importante papel en la señalización neuronal. Además, inhibidores de la prolyl oligopeptidasa mejoran el aprendizaje y se estudian para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Shinoda et al., 1999). Los ratones enriquecidos también muestran cambios en la expresión de genes relacionados con la formación de nuevas sinapsis y la reorganización y fortalecimiento de las sinapsis existentes, por ejemplo, la exposición a un ambiente enriquecido aumenta hasta 3 veces la expresión del gen que codifica la integrina alfa-4, que es importante para la plasticidad neuronal (Revisado en Rampon et al., 2000a).

El enriquecimiento también alteró los niveles de mRNA de muchos genes asociados con cambios estructurales que ocurren durante el crecimiento neuronal. Así, se encontró un incremento de la expresión de la proteína citoesquelética dinactina, implicada en el transporte retrógrado, en el crecimiento neuronal y la sinaptogénesis, y la cortactina, que participa en la formación de sinapsis y plasticidad mediante interacciones con receptores

NMDA y con el complejo proteínico PSD95 (Martin et al., 1999; Naisbitt et al., 1999), también aumenta tras el EA de 14 días en ratones (Rampon et al., 2000a).

El EA también promueve la expresión de factores neurotróficos que ejercen funciones de plasticidad neuronal, neurogénesis y mejoras del aprendizaje. Los factores neurotróficos son proteínas especiales de señalización endógena que promueven la supervivencia, la división y el crecimiento, así como la diferenciación y la plasticidad morfológica de las células cerebrales. Los factores neurotróficos nutren a las neuronas durante el desarrollo, la etapa adulta y la vejez. Existen diferentes factores neurotróficos, por ejemplo el NGF (factor de crecimiento nervioso o 'nerve growth factor'), el BDNF ('brain derived neurotrophic factor'), la NT-3 (neurotrofina-3), y la NT-4/5 (neurotrofina 4/5) (para revisión ver Pham et al., 2002). Diversos estudios han mostrado que al menos 3 miembros de la familia de los factores neurotróficos, el NGF, el BDNF y la NT-3 se expresan abundantemente en el hipocampo y están involucrados en la neuroplasticidad asociada al aprendizaje y la memoria (Enfors et al., 1988). En el cerebro de la rata, los mayores niveles de NGF se encuentran en las áreas diana de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, incluyendo el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio. En un estudio en el que se midieron los niveles de NGF en el hipocampo, la corteza entorrinal y el hipotálamo, así como la expresión de los receptores de NGF (NGFR), p75 y trkA en las neuronas colinérgicas del área septal medial (MSN), se encontró que los niveles de NGF aumentaron en todas las regiones excepto en el hipotálamo en las ratas que se habían mantenido un año en la situación de enriquecimiento comparadas con las ratas aisladas, el EA también aumentó la densidad de receptores p75 y trkA en el área septal medial (Pham et al., 1999). También se ha descrito en la rata un incremento en la corteza visual e hipocampo de los niveles de mRNA del factor de crecimiento neuronal (NGF) tras el enriquecimiento (Torasdotter et al., 1998), y se han encontrado niveles elevados de BDNF, NGF y NT-3 en el prosencéfalo basal medial y la corteza cerebral de ratas enriquecidas (Ickes et al., 2000). Así, se puede observar que el EA puede alterar los niveles de expresión de un gran número de genes relacionados con la estructura neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad, mecanismos relacionados, a su vez, con el aprendizaje y la memoria.

1.1.2. Aprendizaje

Los cambios morfológicos y de expresión génica descritos anteriormente son importantes por ellos mismos como indicadores de la plasticidad cerebral, pero adquieren una importancia mayor si se consideran sus implicaciones en aprendizaje y memoria. De hecho, uno de los efectos del enriquecimiento más llamativos y que ha despertado un mayor interés por su posible proyección terapéutica y preventiva es el impacto de este tratamiento sobre procesos cognitivos.

En los primeros trabajos de enriquecimiento los investigadores se interesaron por cuestiones tales como cuánto tiempo de enriquecimiento era necesario para aumentar la inteligencia del animal, o en qué momento de la vida se debía producir la experiencia de enriquecimiento para que pudiera reflejarse en la conducta (Forgays y Reid 1962; Diamond, 1988). Se analizaron los efectos del EA administrado en ratas de diferentes edades (de 0 a 21 días, de 22 a 43, de 44 a 65, de 66 a 87 y de 88 a 109 días) y 2 semanas después de la finalización del enriquecimiento evaluaron las habilidades cognitivas de estos animales en el laberinto Hebb-Williams. El tratamiento de EA mejoró la habilidad de las ratas en el laberinto a cualquier edad, aunque las diferencias más marcadas se produjeron en el grupo que había recibido enriquecimiento del día 22 al 43. Estos resultados obtenidos en una tarea de aprendizaje mostraron consistencia con aquellos datos provenientes de los estudios anatómicos y morfológicos que indicaban que la corteza cerebral podía ser alterada a cualquier edad a consecuencia del EA, pero había unas edades en las que los efectos observados eran más contundentes que en otras (Diamond, 1988). Igualmente, respecto a si los efectos del enriquecimiento persisten en el tiempo tras la finalización del tratamiento, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la exposición a un ambiente enriquecido durante 80 días iniciado tras el destete produce mejoras en la memoria de trabajo evaluado mediante la prueba de reconocimiento de objetos a los 18 meses de edad en ratas, sugiriendo efectos a largo plazo del EA (Escorihuela et al., 1995a). Por otro lado, Renner y Rosenzweig observaron que cuanto más compleja era la tarea de aprendizaje, mayores diferencias se producían entre los animales enriquecidos y los aislados (Renner y Rosenzweig, 1987). De hecho, no se obtuvieron diferencias entre ratas enriquecidas y controles en tareas de aprendizaje sencillas como en la prueba de aversión al sabor (Domjan et al., 1977), la habituación a estímulos acústicos repetidos (Van Woerden, 1986, citado en Renner y Rosenzweig, 1987) o tareas de discriminación visual (Rinck, 1968).

En comparación con los animales control, las ratas enriquecidas también presentaron mayor habituación de la actividad exploratoria en situaciones de novedad (Duffy et al., 2001; Zimmermann et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Del Arco et al., 2007b), mayor condicionamiento contextual y mayor capacidad para discriminar entre diferentes ambientes (Duffy et al., 2001; Barbelivien et al., 2006). Incluso recientemente, se ha demostrado que serpientes criadas en un ambiente enriquecido muestran mayor habilidad de resolución de problemas y se adaptan más rápidamente a un ambiente nuevo, mostrando un perfil conductual más adaptativo, que las serpientes criadas de forma convencional (Almli y Burghardt, 2006). El enriquecimiento ambiental también mejoró la memoria evaluada mediante la tarea de reconocimiento de objetos (Escorihuela et al., 1995b; Gobbo y O'Mara, 2004; Bruel-Jungerman et al., 2005), mejoró la adquisición y la retención de la prueba de evitación activa en dos sentidos (Escorihuela et al., 1994a) y redujo los déficit de memoria a corto plazo observadas en ratas viejas (Soffie et al., 1999) así como los déficit de ejecución en tareas de aprendizaje espacial en ratones viejos (Bennett et al., 2006).

En general, el EA es eficaz aumentando el rendimiento en tareas de aprendizaje visoespacial y la ejecución de los animales en tareas hipocampo-dependientes, como son el reconocimiento de objetos y el condicionamiento contextual comentados anteriormente, sugiriendo que sus efectos podrían estar relacionados con la modulación de la actividad de estas estructuras subcorticales. De hecho, ya comentamos fenómenos de plasticidad neuronal en el hipocampo tras la exposición al tratamiento de EA, como por ejemplo, el dato referente a las hembras enriquecidas con un mayor número de dendritas por neurona en el giro dentado en comparación con los animales control (Juraska, 1984).

En conjunto, se ha visto que el EA mejora el rendimiento en tareas que requieren aprendizaje espacial (Whishaw et al., 1984, 1986; Pacteau et al., 1989; Mohammed et al., 1990; Park et al., 1992), como en el laberinto Hebb-Williams (Forgays y Forgays, 1952; Brown, 1968; Galani et al., 1997; Kobayashi et al., 2002), el Lashley III (Bennett et al., 1970), el laberinto radial de 17 brazos (Juraska et al., 1984) y el laberinto acuático de Morris (Falkenberg et al., 1992; Escorihuela et al., 1995b). Finalmente, las ratas enriquecidas mostraron mayor flexibilidad conductual, es decir, más capacidad de modificar la conducta en paradigmas de reversión de una prueba de discriminación aprendida o de transferencia entre diferentes pruebas (Krech et al., 1962). Por último, el EA también atenuó los déficit de aprendizaje asociados a la edad en perros beagle viejos, mejoró el aprendizaje de discriminación visual (blanco/negro) en una tarea de refuerzo

operante y, además, la combinación del tratamiento de EA con una dieta rica en antioxidantes, mejoró la ejecución de los perros en la tarea de reversión del aprendizaje en comparación con el grupo de animales control (Milgram et al., 2005).

1.1.3. Actividad espontánea, exploración y emotividad

La exposición al enriquecimiento ambiental modifica otros parámetros generales de conducta de los sujetos, además de los cambios descritos anteriormente en tareas de aprendizaje. En medidas de actividad espontánea y exploración en situaciones de novedad, en general se ha observado un incremento en la actividad exploratoria, por ejemplo en el campo abierto (Widman y Rosellini, 1990; Larsson et al., 2002). Larsson y sus colaboradores describieron que los animales enriquecidos realizaban un mayor número de exploraciones verticales que los animales aislados durante los primeros 10 minutos de exposición al campo abierto; si bien mostraban una actividad locomotora menor, debido a la mayor habituación a la situación de novedad por parte de los animales enriquecidos, de manera que durante los primeros minutos de la prueba los dos grupos no diferían en los niveles de actividad, pero a medida que progresaba la prueba los animales enriquecidos disminuyeron más rápidamente su actividad en comparación con los aislados (Larsson et al., 2002; Schrijver et al., 2002). Sin embargo, otro estudio realizado con ratones mostró resultados opuestos y el enriquecimiento disminuyó la actividad exploratoria, contabilizada por el número de rearings y la locomoción en el campo abierto (Pietropaolo et al., 2004). No obstante, en este estudio el enriquecimiento consistió en proveer de estimulación física a los animales mediante la introducción de objetos en las jaulas, donde los animales estaban estabulados individualmente o por parejas, sin que hubiera animales estabulados en grupos grandes. En otro trabajo, las ratas enriquecidas disminuyeron la actividad locomotora en un ambiente inescapable en comparación con ratas aisladas (Bowling et al., 1993; Smith et al., 1997), y entraron en un nuevo compartimento y manipularon objetos nuevos más rápidamente que los animales aislados (Renner y Rosenzweig, 1987).

La tabla de agujeros (hole board) es otra prueba utilizada para medir la actividad locomotora y la exploración estudiando la conducta de los animales dirigida a los agujeros del suelo; se considera que es un indicativo de la curiosidad del animal por explorar ambientes nuevos, aunque también tiene un componente de ansiedad asociado. Se ha visto que el EA también aumenta la conducta exploratoria evaluada mediante la tabla de agujeros

(Escorihuela et al., 1994a,b; Fernández-Teruel et al., 2002a), aunque también hay estudios que encuentran resultados contradictorios, no hallando diferencias entre los grupos en los niveles de exploración (Freeman y Ray, 1972; Rose et al., 1985). Los factores que podrían explicar estas inconsistencias son la variedad de pruebas de conducta a la que se someten los animales de manera que la situación experimental podría no estar reflejando propiamente ‘conducta exploratoria’ (por ejemplo, algunas pruebas de campo abierto tienen un grado de aversividad diferente debido a la intensidad de la iluminación utilizada, la configuración y el color del aparato, etc) (Zimmermann et al., 2001; Fernández-Teruel et al., 2002b) y también el hecho de que en aquellos estudios se compararon animales estabulados en grupos en un ambiente enriquecido con animales estabulados individualmente en condiciones empobrecidas (Renner y Rosenzweig, 1987; Mohammed et al., 1993). Por otro lado, el EA también provocó una disminución de las conductas repetitivas (estereotipias) en ratones, incluso a largo plazo tras la finalización del enriquecimiento, cuando los ratones permanecieron estabulados en condiciones estándar (Powell et al., 2000). La conducta social de ratones también se vio afectada por el enriquecimiento, aunque los ratones enriquecidos tendían a ser más dominantes, a la vez mostraron más conductas afiliativas y menos agresividad en las interacciones sociales que los controles no enriquecidos (Pietropaolo et al., 2004). Además, un tipo moderado de enriquecimiento, cómo fue la introducción de juguetes en las jaulas de monos macacos, estabulados de forma individual, mejoró la conducta de los animales disminuyendo comportamientos anormales (Kessel y Brent, 1998).

Renner y Rosenzweig (1986a) estudiaron los efectos del EA sobre la conducta exploratoria de objetos, donde el animal se enfrentaba a una situación de novedad en la que había uno o más objetos desconocidos. Observaron que no había diferencias en los parámetros estándares como el número de aproximaciones al objeto o el tiempo de interacción, pero el EA afectaba significativamente los patrones de exploración, incrementando la intensidad y la complejidad de la actividad exploratoria de los animales enriquecidos respecto a la de los animales aislados. El estudio de Widman y Rosellini, (1990), también confirmaba estos resultados, los animales enriquecidos realizaban más diversidad de conductas exploratorias hacia los objetos en comparación con el grupo control (por ejemplo, tocaban los objetos con las patas, los lamían, etc), confirmando que el EA afecta la organización de la conducta espontánea, y sugiriendo que la investigación debería dirigirse a detectar diferencias más sutiles de comportamiento mediante registros cualitativos, además de caracterizar la

conducta exploratoria espontánea utilizando medidas simples y discretas como se ha hecho de forma tradicional, tendiendo a una simplificación excesiva de un aspecto comportamental muy complejo.

Se sabe que el enriquecimiento afecta también a otros aspectos generales como la emotividad y la reactividad a estímulos estresantes. Aunque en general los datos apuntan a una disminución moderada de la emotividad en los animales enriquecidos, los efectos descritos no son del todo consistentes (Escorihuela et al., 1994b; Fernández-Teruel et al., 1997; Chapillon et al., 2002; Larsson et al., 2002). Se ha visto que en los animales enriquecidos se produce una reducción en las defecaciones en el campo abierto en comparación con los animales control (Fernández-Teruel et al., 1997; Larsson et al., 2002), una disminución en la latencia en comenzar a comer en un ambiente nuevo (Meshi et al., 2006) y eran más eficaces en las primeras fases de la adquisición de la evitación activa en dos sentidos (Escorihuela et al., 1994a). Este último dato es consistente con el efecto de fármacos ansiolíticos, que aumentan el número de respuestas correctas y el ritmo de ejecución de esta misma tarea, mientras que los fármacos ansiogénicos muestran un efecto contrario empeorando la ejecución de los animales y el número de respuestas correctas (Fernández-Teruel et al., 1991). También se han visto efectos a largo plazo del EA en el laberinto elevado en cruz estudiando la conducta emotiva de ratones hembra enriquecidos durante el embarazo. El enriquecimiento aumentó el número de entradas en los brazos abiertos tres meses después de la finalización del tratamiento, incluso la descendencia de estos ratones evaluados a los tres meses de edad también mostró una disminución de la emotividad en el laberinto elevado en cruz, sugiriendo efectos epigenéticos del EA (Friske y Gammie, 2005). En un trabajo reciente en donde se utilizaron diversos análisis multivariados para el estudio del impacto de las condiciones de crianza en distintos modelos animales de ansiedad y depresión, se concluyó que el aislamiento social reproducía los efectos de modelos animales que utilizaban procedimientos de estrés, y que dos meses de aislamiento social provocaban efectos conductuales similares a algunos modelos de depresión. Además, contrariamente al aislamiento social, los autores concluyeron que el EA ejercía efectos antidepresivos y ansiolíticos evaluados mediante la prueba de natación forzada, la preferencia por sucrosa y el test de campo abierto (Brenes Saenz et al., 2006). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias entre animales enriquecidos y animales control utilizando otro tipo de situaciones provocadoras de

ansiedad como la exposición de la rata a el olor de un depredador (Roy et al., 2001). A este punto volveremos más adelante en el primer bloque experimental.

1.1.4. Efectos Neuroquímicos

Actualmente está bien establecido que el enriquecimiento ambiental produce efectos sobre la modulación de diferentes sistemas de neurotransmisión cerebrales. Inicialmente, se describió un aumento en los niveles totales de RNA en la corteza de las ratas enriquecidas respecto a las aisladas, y como la función del RNA es básicamente la fabricación de proteínas, el incremento en RNA por célula es indicativo de una mayor actividad celular en los sujetos enriquecidos (Ferchmin et al., 1970). A nivel de la expresión génica, el enriquecimiento produjo cambios en genes asociados con la excitabilidad neuronal, como la neurokinina A, un neurotransmisor que juega un importante papel en el control de la excitabilidad neuronal y la sensibilidad ante ataques de tipo epiléptico y apoptosis (Revisado por Rampon et al., 2000a). En relación con ello y aunque son pocos los trabajos donde se han estudiado los efectos del EA en medidas electrofisiológicas, se ha descrito un incremento en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios en cortes de tejido del giro dentado del hipocampo de ratas enriquecidas (Green et al., 1986).

El enriquecimiento de tan sólo tres horas de duración aumentó la expresión de un grupo de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte de las vesículas sinápticas y la secreción de neurotransmisores, como son la sinaptobrevina y la clatrina-AP2 en ratones, la sinaptobrevina es una proteína asociada a las vesículas sinápticas mientras que la clatrina-AP2 (clathrin-adaptor protein AP2) regula la exocitosis de las vesículas (Rampon et al., 2000a). El EA también aumentó los niveles de sinaptofisina en el hipocampo de ratones hembra (Frick y Fernández, 2003) y atenuó la disminución de sinaptofisina que se observa con el envejecimiento en ratas (Saito et al., 1994). La sinaptofisina es una proteína que se encuentra en las membranas de las vesículas presinápticas que contienen neurotransmisores, y se cree que el incremento en los niveles de sinaptofisina produce un aumento en la neurotransmisión y mejora la memoria espacial (Lambert et al., 2005). En roedores viejos, niveles elevados de sinaptofisina se asocian a una mejora en la memoria de referencia espacial (Smith et al., 2000), paralelamente, las mejoras en aprendizaje espacial inducidas por el tratamiento de EA también se asocian a mayores niveles de sinaptofisina en el hipocampo y en la corteza frontoparietal (Frick y Fernandez, 2003).

Consistentemente, el enriquecimiento aumenta la memoria y el aprendizaje evaluado mediante diferentes pruebas (Renner y Rosenzweig, 1987) y promueve la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Kempermann et al., 1997a,b, 2002). Las células granulares del giro dentado son glutamatérgicas y sus terminales axónicos se dirigen al área CA3 del hipocampo y forman sinapsis con las neuronas piramidales glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas. Las sinapsis que establecen las neuronas granulares inducen diversos procesos de plasticidad como la potenciación a largo plazo (LTP) o la inhibición a largo plazo (LTD), mediante cambios en el relevo de glutamato presináptico y la estimulación de receptores de glutamato postsinápticos (Kawamura et al., 2004). En relación con esto, se encontró que el tratamiento de EA aumentó la LTP, un fenómeno electrofisiológico asociado a la formación de memoria a través los receptores NMDA (Artola et al., 2006) e incrementó la expresión de varios genes relacionados con la función del receptor NMDA asociado a procesos de neurogénesis y de aprendizaje (Rampon et al., 2000a). Por ejemplo, los niveles de expresión de la densidad postsináptica 95 (PSD-95), la cual participa en el anclaje del receptor NMDA e interactúa con el óxido nítrico (ON) sintasa en la membrana postsináptica, jugando un importante papel en la transmisión sináptica y en la formación de memoria, mostraron una mayor expresión tras el enriquecimiento en ratones (Christopherson et al., 1999). A nivel de los receptores NMDA, otros estudios han descrito que el enriquecimiento en ratas macho disminuía la densidad de la subunidad NR1 de los receptores NMDA en el núcleo accumbens, indicando una excitabilidad reducida esta región por parte de los animales enriquecidos (Wood et al., 2005). También se ha visto que el aislamiento ambiental disminuía la función de los receptores glutamatérgicos en la corteza prefrontal (Melendez et al., 2004), mientras que el enriquecimiento incrementaba los niveles de los receptores de glutamato GluR2 y GluR4 en el hipocampo de ratones, modificando así la neurotransmisión glutamatérgica (Naka et al., 2005) y aumentaba los niveles de glutamato en la corteza entorrinal de animales enriquecidos en comparación con los animales aislados (Myhrer et al., 1992). También se ha observado un aumento de los niveles de GABA y glutamato en el área CA3 del hipocampo en ratas macho enriquecidas tras un tratamiento de EA de 8 semanas de duración durante la vejez, comparadas con los controles de su misma edad, mientras que no se observaron diferencias entre las ratas jóvenes independientemente del tratamiento ambiental (Segovia et al., 2006).

En otros sistemas de neurotransmisión hay menos datos conocidos. Así, en lo que se refiere al sistema colinérgico, la estimulación ambiental en ratas produjo un incremento de la

actividad total del enzima colinesterasa (ChE) en la corteza (Rosenzweig et al., 1962). Inicialmente también se describió un aumento del enzima específico acetilcolinesterasa (AChE) en la corteza y regiones subcorticales (Bennet et al., 1964), aunque posteriormente otros experimentos indicaron que la actividad de la AChE por unidad de peso era más baja en la corteza y más alta en regiones subcorticales en las ratas enriquecidas con respecto a las ratas aisladas (Rosenzweig et al., 1972). En estudios más recientes se ha visto que el EA también ayuda a revertir los déficit asociados a la pérdida de neuronas colinérgicas en ratas viejas (Paban et al., 2005). En relación al sistema serotoninérgico, el único dato destacable corresponde a un estudio de Rasmuson y colaboradores (1988) donde describieron un incremento en la expresión de mRNA para el receptor 5-HT1 en el hipocampo de ratones enriquecidos en comparación con los animales control. Con respecto al sistema catecolaminérgico, se ha observado un aumento de noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en la corteza y una disminución de estos neurotransmisores en áreas subcorticales de ratas enriquecidas en comparación con animales aislados (Riege y Morimoto, 1970). El enriquecimiento también produjo modificaciones en la actividad de los enzimas tirosina hidroxilasa y feniletanolamina-N-metiltransferasa, sobre la capacidad de sintetizar adrenalina (Haemisch y Gartner, 1997) y en la activación de los receptores β -adrenérgicos en la corteza cerebral de ratas viejas (Escorihuela et al., 1995a). Más recientemente, se ha visto que el enriquecimiento ambiental en comparación con el aislamiento, reduce la densidad de los receptores D1 en la corteza prefrontal (Del Arco et al., 2007a) y decrece la velocidad de acción del transportador de DA (DAT) en la corteza prefrontal medial (mPFC), pero no en el núcleo accumbens ni en el estriado, en comparación con el aislamiento (Zhu et al., 2004). Esta disminución en la función del DAT parece deberse a una disminución de la expresión del DAT en la superficie celular (aunque no en el contenido total) en el mPFC pero no en el núcleo accumbens y el estriado (Zhu et al., 2005).

1.1.5. Efectos en animales con alteraciones del sistema nervioso

Pero para poder establecer la utilidad del enriquecimiento ambiental como herramienta terapéutica es importante saber si las alteraciones del desarrollo cerebral comprometen la capacidad del animal para responder a la estimulación ambiental posterior, tanto en términos de plasticidad neuronal como de conducta emergente. Esta cuestión ha sido abordada en estudios donde los roedores han sido sometidos a situaciones de desnutrición o

a diversos tipos de lesiones cerebrales inducidas por métodos quirúrgicos o químicos, como la administración de kainato o daño excitotóxico, la isquemia cerebral focalizada, la oclusión de la arteria cerebral media, la exposición a radiación ionizante (Johansson y Ohlsson, 1996; Dahlqvist et al., 1999; Young et al., 1999; Hicks et al., 2002; Gaulke et al., 2005; Maegele et al., 2005).

Aunque los resultados no siempre son coincidentes, en general muestran que, posteriormente a la lesión, el enriquecimiento sigue ejerciendo su efecto trófico de incremento del tamaño, peso cerebral, número de dendritas y espinas, grado de ramificación dendrítica y número de sinapsis por neurona independientemente de cual haya sido el origen de la lesión (Kolb et al., 1998; para revisión ver Will et al., 2004). Así, el EA administrado durante once días tras la lesión cerebral disminuyó el tamaño de la lesión cortical en el hemisferio lesionado y mejoró la ejecución de las ratas en el laberinto acuático de Morris (Passineau et al., 2001). En otro estudio, el EA redujo en un 45% la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo e incrementó la resistencia ante las lesiones y la supervivencia de nuevas neuronas en el hipocampo de las ratas (Young et al., 1999).

Por otro lado, disminuyó algunos los déficit asociados a determinadas alteraciones genéticas en los ratones mutantes Lurcher caracterizados por una masiva degeneración de la corteza cerebelar (Caston et al., 1999) y en los ratones trisómicos Ts65Dn, que constituyen un modelo del síndrome de Down. En éstos últimos, el tratamiento de enriquecimiento durante siete semanas mejoró la ejecución de las hembras trisómicas enriquecidas en la adquisición del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Martínez-Cue et al., 2002). En ratones adultos knockout para la subunidad del receptor NMDA en la región CA1 del hipocampo, el enriquecimiento protegió contra los déficit de memoria y aprendizaje, aumentando la ejecución de los ratones enriquecidos en tareas de discriminación olfativa y condicionamiento contextual (Rampon et al., 2000b) y en los ratones BXSB deficitarios en tareas de aprendizaje debido a la presencia de ectopias corticales determinadas genéticamente también mejoró significativamente la ejecución de los animales enriquecidos (Hoplight et al., 2001). Además el EA ha mostrado ejercer efectos beneficiosos en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como el Huntington y el Alzheimer. Así, en un ratón transgénico que desarrolla un síndrome neurodegenerativo que modela a la enfermedad de Huntington el EA previno la pérdida de volumen cerebral y retrasó la aparición de los trastornos motores (Carter et al., 2000; Hockly et al., 2002; Lazic et al., 2006), mejoró el rendimiento de los ratones

transgénicos que modelan la enfermedad de Alzheimer en el laberinto acuático de Morris (Wolf et al., 2006; Jankowsky et al., 2005), indujo cambios en la expresión hipocampal de genes relacionados con el secuestro de A β y plasticidad sináptica en ratas (Costa et al., 2006), y redujo los niveles de la deposición de A β en ratones transgénicos (Lazarov et al., 2005).

También se han descrito efectos beneficiosos del EA tras isquemia cerebral global o focal (Briones et al., 2006; Puurunen et al., 1997; Gobbo y O'Mara, 2004; Komitova et al., 2005, 2006; Rönnbäck et al., 2005; Pereira et al., 2007), daño cerebral traumático (Passineau et al., 2001) y lesiones de diversas regiones de la formación hipocampal (Dalrymple-Alford et al., 1988; Galani et al., 1997; Van Rijzingen et al., 1997). El enriquecimiento ambiental también antagonizó algunas alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento (Fernández-Teruel et al., 1997; Soffie et al., 1999; Kobayashi et al., 2002) o a tratamientos farmacológicos, como la lesión tóxica de los sistemas monoaminérgicos (Ueda et al., 2005), la inducción de ataques epilépticos (Faverjon et al., 2002), o la exposición prenatal a alcohol (Hannigan et al., 2007). En este trabajo, el hecho de que tras el enriquecimiento ambiental mejorara la ejecución motora indicó que el SNC de ratas expuestas a alcohol prenatal todavía conservaba suficiente plasticidad, que permitía al animal beneficiarse de la estimulación ambiental mediante algún mecanismo alternativo no dependiente del hipocampo. De hecho, el EA mitigó los efectos nocivos del alcohol prenatal en ratas en diversas pruebas de conducta pero no provocó efectos significativos en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo (Berman et al., 1996). Por último, también se encontraron efectos beneficiosos del EA cuando los trastornos eran inducidos por tóxicos ambientales como la intoxicación por plomo durante el desarrollo (Guilarte et al., 2003), por condiciones de vida inadecuadas, como el escaso cuidado maternal (Bredy et al., 2004) o el aislamiento social (Hellemans et al., 2004).

Así, el enriquecimiento parece ser una herramienta terapéutica efectiva tras ciertos tipos de daño cerebral, pero debemos tener en cuenta que los efectos del EA son, en general, específicos de la lesión: se han demostrado efectos beneficiosos del EA en ratas con lesiones en el hipocampo, pero no en ratas con lesiones en otras zonas de la formación hipocampal como el subículo o la corteza entorrinal (Galani et al., 1997). Asimismo, parece que los efectos del EA también son dependientes de la tarea: en el estudio de Dalrymple-Alford y colaboradores (1988), las ratas enriquecidas realizaron una ejecución peor que las ratas control en el laberinto acuático, mientras que el EA mejoró la ejecución de estas

mismas ratas en la versión seca del laberinto. Parece ser que las demandas funcionales de estas dos tareas no fueron del todo equivalentes puesto que si bien los requerimientos de memoria espacial en la resolución de ambas tareas eran aparentemente idénticos, el nivel de estrés y otros componentes sociales, motores, temporales o motivacionales parecían influir de forma diferente en las dos versiones del laberinto.

1.2. Enriquecimiento ambiental en humanos

Como hemos visto en roedores y otros animales de experimentación, el enriquecimiento ambiental incrementa la estimulación y proporciona oportunidades más ricas y variadas de interacción con el entorno social y físico, ejerciendo efectos beneficiosos a largo plazo a nivel neuroanatómico, neuroquímico y conductual en varias especies animales. Por el contrario, los animales criados en condiciones de aislamiento ambiental, privados de estimulación física y social presentan alteraciones cognitivas y de conducta (Geyer et al., 1993; Hellemans et al., 2004). Más concretamente, el aislamiento social durante la infancia produce hiperactividad locomotora en un ambiente nuevo (Bowling y Bardo, 1994), incrementa la ansiedad en el laberinto elevado en cruz (Wright et al., 1991; Hellemans et al., 2004) y empeora el aprendizaje espacial (Juraska et al. 1984; Renner y Rosenzweig, 1987), y produce déficits en la inhibición prepulso (Geyer et al., 1993; Bakshi y Geyer, 1999; Powell et al., 2002) por lo que ha sido utilizado como modelo animal de síntomas relacionados con trastornos psicóticos como la esquizofrenia (Ellenbroek, 2004).

Si trasladamos los conceptos de empobrecimiento y enriquecimiento ambiental al ámbito humano, se puede observar que niños criados en ambientes de escasa estimulación presentan alteraciones de conducta y de funciones cognitivas, mientras que niños criados en ambientes ricos en estimulación resuelven mejor pruebas que evalúan rendimiento cognitivo y presentan menos problemas de conducta (Kaler y Feeman, 1994; Joseph, 1999). Por otro lado, el hecho de que las experiencias vividas por el organismo durante la infancia produzcan cambios estables en las estructuras nerviosas que están madurando sugiere que las competencias y capacidades del organismo adulto pueden depender en parte de las habilidades adquiridas durante este período. Por ejemplo, sucesos vitales adversos ocurridos durante la infancia, como situaciones de abuso o negligencia por parte de los padres pueden alterar el patrón de desarrollo cerebral y posteriormente puede traducirse en una mayor vulnerabilidad para sufrir determinados trastornos mentales durante la etapa

adulta (Heim y Nemeroff, 1999, 2001). De hecho, este tipo de situaciones adversas durante la infancia se asocian a una mayor probabilidad de sufrir depresión durante etapas posteriores de la vida (Oakley-Browne et al., 1995).

Por todo esto, se plantea la posibilidad de diseñar estrategias de intervención encaminadas a prevenir la aparición de trastornos asociados a determinados sucesos ocurridos durante las primeras etapas de la vida de un organismo. Algunas de estas intervenciones se han dirigido a incrementar las habilidades cognitivas y sociales, disminuir los desajustes emocionales y mejorar la calidad de vida de los niños procedentes de sectores de la población con bajos niveles socioeconómicos o en situación de riesgo. Pero establecer qué constituye enriquecimiento para los seres humanos es más complicado, no solo por la dificultad de llevar a cabo experimentos controlados, sino por la gran variabilidad interindividual que existe en la especie humana, donde cada individuo es diferente, tanto en su carga genética como en las influencias ambientales que ha recibido incluso antes del nacimiento. Además, lo que se considera enriquecimiento para un individuo puede que no lo sea para otro.

Uno de los estudios experimentales en el que se manipuló el ambiente durante la infancia se llevó a cabo en Mauritania, con niños de tres a cinco años de edad. El programa de enriquecimiento tuvo una duración de dos años e incorporó componentes educativos, de mejora alimenticia y de ejercicio físico. Por un lado se vio que, a la edad de once años, los niños que habían recibido enriquecimiento en comparación con el grupo control que no había recibido tratamiento mostraron diferencias en variables psicofisiológicas básicas, como son la conductancia electrodermal o las medidas de electroencefalografía, que se asociaron a una mejora en el procesamiento de información, una maduración cortical temprana y un incremento en la actividad cortical en condiciones de reposo y de actividad (Raine et al., 2001). Asimismo, el enriquecimiento también se asoció con niveles menores de conducta antisocial y personalidad esquizotípica en la edad adulta, obteniendo el mayor beneficio aquellos niños que previamente habían mostrado un estado nutricional peor (Raine et al., 2003).

Los efectos del enriquecimiento ambiental en parámetros cognitivos también fueron observados por Boivin y colaboradores (1996) en niños del Congo, sometidos a un programa de enriquecimiento educacional y nutricional durante un año académico. Estos niños mostraron una ejecución mejor en habilidades verbales, visuales, lógicas y en rendimiento escolar comparados con los niños que no habían recibido el programa de

enriquecimiento, aunque no se observaron diferencias en variables de desarrollo físico y motor.

Pero además de estas intervenciones ambientales encaminadas a incrementar las habilidades cognitivas y sociales, disminuir los desajustes emocionales y mejorar la calidad de vida de los niños procedentes de sectores de población más desfavorecidos, se realizaron dos proyectos con niños provenientes de familias con pocos recursos sociales y económicos: el ‘Carolina Abecedarian Project’ (CAP; Horaceck et al., 1987) y el ‘Project CARE’ (PC; Wasik et al., 1990), al margen de otro programa dirigido a niños prematuros o con bajo peso al nacer, el ‘Infant Health and Development Program’ (IHDP; Ramey y Ramey, 1998). Estos estudios eran multidisciplinarios (consejo familiar, visitas a casa y a la escuela, servicios de salud y nutrición, etc), intergeneracionales (se dirigían a los niños pero sobretodo a sus cuidadores) e individualizados (adaptados a las condiciones familiares específicas de cada niño). Los resultados de estas intervenciones han mostrado consistentemente efectos positivos en los niños, quienes presentaron una ejecución cognitiva mejor en comparación con los niños que no habían recibido la intervención, evaluado mediante los tests de inteligencia para niños ‘Bayley mental development indices’ (MDIs) y Stanford-Binet (S-B). Los niños a los que se aplicaron estos programas de intervención mostraron un aumento en el IQ durante los primeros de años de vida respecto al grupo de referencia, y además se observó que los niños de las familias con menos recursos fueron los que más se favorecieron de la intervención temprana (Ramey y Ramey, 1998). En diversos programas de intervención infantil destinados a tratar alteraciones psiquiátricas y neurológicas (McGuire y Earls, 1991; para revisión), se han mostrado resultados favorables de mejora en las capacidades motoras y cognitivas de niños con parálisis cerebral (Palmer et al., 1990) u otras lesiones cerebrales (Van’t Hooft et al., 2003), con síndrome de Down (Irwin, 1989) o con alteraciones de la audición y el habla (Onslow et al., 1990).

Por otro lado, la aplicación de intervenciones destinadas a enriquecer la estimulación sensorial, cognitiva o motora no tiene que producirse únicamente durante la infancia. Green et al. (2006) mostraron que un tipo de ‘enriquecimiento ambiental’ mejoraba las funciones cognitivas de individuos sanos. Los participantes del estudio llevaron a cabo un programa de estimulación mental intensiva durante dos semanas que consistió en la memorización diaria de textos y la ejecución de cálculos aritméticos que requerían rapidez mental. La evaluación neuropsicológica se llevó a cabo antes y después de la intervención pero para

ello se utilizaron pruebas diferentes en los dos momentos temporales. Los resultados mostraron que el grupo de individuos que habían recibido el entrenamiento intensivo mejoró la ejecución en seis de las ocho medidas, mientras que el grupo control que no recibió la intervención sólo mostró una mejora en dos de las ocho pruebas. Estos resultados sugieren que la capacidad cognitiva puede ser aumentada en individuos adultos y sanos tras un periodo de estimulación cognitiva intensa (Green et al., 2006).

En el campo de la investigación básica ya vimos que el enriquecimiento ambiental podía ejercer efectos beneficiosos a cualquier edad, incluso reduciendo los déficit cognitivos asociados al envejecimiento en ratones (Bennett et al., 2006). En humanos, si consideramos un modo de enriquecimiento cognitivo durante la vida, que estaría representado por el nivel de educación, los años de escolarización, la complejidad del trabajo o el tipo de actividades de ocio, parece como si este factor ejerciera un papel protector ante el deterioro cognitivo asociado a la edad o ante diferentes tipos de demencias. Por ejemplo, Jacobs et al. (1993) analizaron el tejido cerebral del área de Wernicke, indispensable para el reconocimiento del lenguaje, comparando la morfología neuronal entre individuos que habían tenido educación universitaria con individuos que sólo habían recibido educación secundaria, y demostraron que las neuronas de aquellos sujetos que habían recibido más años de educación académica tenían más dendritas que los otros. Otro ejemplo sobre el impacto del ambiente en la morfología cerebral es el que nos aporta el estudio de Sullivan et al. (2001a), basado en el estudio de gemelos, donde se muestra que los genes y el ambiente influyen de forma equivalente en el tamaño del hipocampo en humanos. Los resultados de este trabajo indicaron que el volumen del hipocampo en humanos envejecidos se debía en un 40% a la herencia del individuo, mientras que el 60% de la variabilidad en la determinación del volumen hipocampal se explicaba por factores ambientales. Por otro lado, un estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Huntington en humanos ha mostrado el importante papel que juegan los factores ambientales en la aparición de la enfermedad, y se cree que un ambiente rico en estímulos mejora el funcionamiento físico, mental y social de pacientes con esta enfermedad (para revisión ver Nithianantharajah y Hannan, 2006). Además, factores ambientales también parecen estar involucrados en el riesgo a padecer la enfermedad de Alzheimer. Estudios epidemiológicos indican que un alto nivel de educación, una actividad laboral satisfactoria, la participación en actividades cognitivamente estimulantes y el hecho de involucrarse en actividades de ocio, reduce el riesgo de desarrollar Alzheimer (para revisión ver Spiess y Hannan, 2005). A este respecto,

un estudio con pacientes de Alzheimer que presentaban un déficit cognitivo medio concluyó que el enriquecimiento ambiental (consistente en un programa de estimulación cognitiva y motora en sesiones de 3.5 h, dos veces a la semana) repercutió positivamente en la estabilización cognitiva y mejoró de forma duradera el estado de ánimo de los pacientes (Olazaran et al., 2004).

La hipótesis de la reserva cognitiva mantiene que estilos de vida enriquecidos dan lugar a estructuras neuronales eficientes, proveyendo una reserva cognitiva que retrasa la aparición de las manifestaciones clínicas de la demencia (Rodríguez y Sánchez, 2004) y sugiere que el enriquecimiento cognitivo promueve la utilización de las funciones disponibles. La hipótesis de la reserva cognitiva se formuló como posible explicación al hecho de que no existe una relación directa entre el grado de patología cerebral y los síntomas clínicos que se observan. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, la evidencia epidemiológica sugiere que los pacientes con bajos niveles educativos o culturales, o con bajos cocientes intelectuales empiezan a expresar las características clínicas de la enfermedad con un grado histopatológico menor que las personas con niveles más elevados de reserva. Stern et al. (1999) demostraron uno de los supuestos derivados de la hipótesis de la reserva cognitiva observando que los sujetos con alta reserva presentan una progresión más rápida de la patología de Alzheimer y una mayor tasa de mortalidad. Esto sería debido a que tener una reserva cognitiva mayor requeriría más patología cerebral antes de que se empiece a afectar la memoria en esta enfermedad, no obstante, la patología del proceso neurodegenerativo progresaría independientemente de la educación y cuando la patología fuera muy severa ya no habría sustrato para que la reserva cognitiva actuara. De acuerdo con esta hipótesis de la reserva cognitiva los niveles educativos altos serían capaces de retardar la expresión clínica de la demencia debido a la habilidad del cerebro en la utilización de las estructuras neuronales disponibles a modo de depósito de reserva (Staff et al., 2004; Whalley et al., 2004). Esta hipótesis también se sustenta en la asunción de que algún tipo de neuroplasticidad ligada a las experiencias cognitivas permite un funcionamiento cognitivo normal incluso cuando hay presencia de patología cerebral, y sugiere que la experiencia cognitiva durante las primeras etapas de la vida afecta a la organización cerebral durante la etapa adulta. Los estudios de neuroimagen muestran como durante la vejez se utilizan diferentes regiones del cerebro en el procesamiento de una determinada tarea que las que utilizan los sujetos jóvenes, indicando una reorganización de las funciones cerebrales con el fin de compensar posibles déficits localizados en

determinadas áreas del cerebro. De estos datos se desprende que el enriquecimiento cognitivo no actuaría previniendo el desarrollo de la patología pero permitiría compensar mejor su ocurrencia (Stern et al., 2005).

Los mecanismos que sustentan la reserva cerebral serían los mismos que estarían implicados en los cambios observados fruto del enriquecimiento ambiental en animales de laboratorio. Se ha visto que el enriquecimiento ambiental en animales aumenta la plasticidad del cerebro modificando la transmisión sináptica, incrementado las señales entre neuronas y fortificando circuitos neuronales. Estos cambios en conectividad sináptica inducidos por el enriquecimiento proveen un mecanismo explicativo teórico sobre como el cerebro puede utilizar de forma más eficiente las redes neuronales y utilizar circuitos alternativos cuando se necesitan. Este incremento dependiente de la experiencia en conectividad neuronal podría representar el mecanismo de relevancia para explicar la teoría de la reserva cognitiva y explicar como el enriquecimiento puede hacer al cerebro más resistente en casos de patologías cerebrales, lesiones y neurodegeneración. Pero el enriquecimiento ambiental y el concepto de reserva cognitiva también son relevantes en enfermedades psiquiátricas que involucran disfunción cognitiva como parte de la sintomatología, como la esquizofrenia, el trastorno bipolar o la depresión (Barnett et al., 2006; Nithianantharajah y Hannan, 2006).

2. INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE ALGUNOS ASPECTOS CONDUCTUALES Y CEREBRALES.

Los hombres y las mujeres difieren en multitud de aspectos de funcionamiento cerebral, relacionados con habilidades cognitivas específicas, procesamiento de emociones, visión, audición, memoria, lenguaje, percepción del dolor, niveles de neurotransmisores, acción de las hormonas del estrés en el cerebro o la manifestación clínica de enfermedades (para revisión ver Cahill, 2006).

En tareas de rendimiento, los hombres parecen ser mejores en pruebas de rotación mental, navegación y orientación espacial, y puntúan más alto en problemas de ingeniería y física (Shepard y Metzler, 1971; Lawson et al., 2004). Por el contrario, las mujeres puntúan más alto en pruebas de reconocimiento de emociones, sensibilidad social y fluidez verbal (Baron-Cohen et al., 1999; McClure, 2000; Wirth et al., 2006). Las niñas empiezan a hablar

antes que los niños y prefieren jugar con muñecas, mientras que los niños prefieren los juguetes mecánicos. Aunque estas diferencias de sexo pueden deberse a factores ambientales, experimentos con animales sugieren una base biológica, más concretamente, se comprobó que monos vervet macho prefirieron jugar con camiones mientras que sus hermanas prefirieron las muñecas (Alexander y Hines, 2002, citado en Baron-Cohen et al., 2005). Un estudio realizado con bebés humanos de un día de edad a quienes presentaban un objeto mecánico o una cara sonriente, encontraron que los niños permanecían más tiempo mirando al objeto mientras que las niñas dedicaron más tiempo a explorar la cara (Connellan et al., 2001, citado en Baron-Cohen et al., 2005). Sin embargo, a pesar de estas diferencias encontradas en tareas cognitivas específicas, los hombres y las mujeres no difieren en medidas de inteligencia general. Y, por otro lado, se debe tener en cuenta que existe una gran variabilidad entre los sujetos, sin tener en cuenta su sexo, con lo que hay que tener las consecuentes reservas al intentar realizar inferencias acerca de individuos concretos.

Pero en la lista de factores que influyen en las diferencias entre el cerebro de hombres y mujeres debemos incluir el acervo genético de cada sexo y la influencia de las hormonas sexuales durante diferentes etapas del desarrollo del SNC. Estudios genéticos han mostrado que los genes de los cromosomas sexuales afectan directamente la diferenciación sexual del cerebro (Carruth et al., 2002) y que de los 21.000 genes activos en el cerebro, 51 mostraron diferentes niveles de expresión en cerebros de embriones de ratones macho y hembra antes de que las gónadas se formaran, indicando que los cerebros de machos y hembras seguían diferentes patrones de desarrollo antes incluso de la influencia de las hormonas sexuales (Dewing et al., 2003).

El cerebro de hombres es un 9% mayor que el de las mujeres, una diferencia que se debe más a la cantidad de materia blanca que a materia gris: los hombres presentan mayor cantidad de materia gris pero diversos estudios muestran que la proporción de cuerpo calloso respecto al volumen cerebral total es menor en los hombres (Giedd et al., 1996; Allen y Damasio, 2003). Por otro lado, parece ser que el cerebro masculino tiene más conexiones intrahemisféricas que el cerebro femenino, sugiriendo un patrón de conectividad local incrementada en los hombres, junto con una conectividad interhemisférica disminuida con respecto a las mujeres. Las mujeres muestran una mayor recuperación del lenguaje tras una lesión del hemisferio izquierdo en comparación con los hombres; además, estudios con resonancia magnética funcional indican que las hembras

muestran una activación de los dos hemisferios cerebrales en tareas relacionadas con ciertos aspectos del lenguaje, por lo que parece ser que el cerebro de la mujer es más bilateral y con una conectividad interhemisférica mayor (Shaywitz et al., 1995). En concordancia con esto, el autismo, una enfermedad que afecta predominantemente a hombres, muestra un patrón de conectividad intrahemisférica muy marcado, que apoyaría junto con otros datos la teoría del autismo como un ‘cerebro extremadamente masculinizado’ (Baron-Cohen et al., 2005).

También se han descrito diferencias sexuales en otras regiones del cerebro como son el hipocampo, la amígdala o determinadas zonas de la corteza cerebral (Witelson et al., 1995). El hipocampo es una región muy asociada a funciones de aprendizaje y memoria que presenta un claro dimorfismo sexual. Hipocampos de hombres y mujeres difieren en estructura anatómica, sistemas de neurotransmisión y respuesta al estrés. Estudios de neuroimagen encuentran que el hipocampo es mayor en mujeres que en hombres respecto al volumen total del cerebro (Cahill, 2006). Estudios en ratas han encontrados diferencias más sutiles, como por ejemplo, el volumen de la región CA1 del hipocampo y el número de células piramidales que contiene son significativamente mayores en los machos que en las hembras, así como la densidad de las neuronas en el giro dentado (Madeira y Lieberman, 1995).

También hay diferencias sexuales en el hipocampo en relación con los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica, serotoninérgica, colinérgica, GABAérgica, así como en los niveles de corticosterona, y colecistokinina. Por ejemplo, se ha visto que la afinidad de los receptores de glucocorticoides en las hembras es la mitad que en los machos, y esta diferencia se da independientemente de las hormonas sexuales circulantes. Las hormonas sexuales, como el estrógeno pueden alterar la excitabilidad de las células del hipocampo, influir en la estructura dendrítica, aumentar la permeabilidad de receptor de NMDA, modular los procesos de aprendizaje, y también causar diferencias en fenómenos de potenciación a largo plazo (PLP) en el hipocampo (para revisión ver Cahill, 2006). Estas evidencias sugieren que el sexo del individuo influye en el papel del hipocampo en aprendizaje y memoria hasta el punto que una breve exposición a una situación de aprendizaje estresante, como la exposición a shocks en la cola, incrementa la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo de ratas macho, pero las disminuye en ratas hembra (Shors et al., 2001).

Otra diferencia sexual es la reacción del hipocampo al estrés crónico, se ha visto que en ratas y monos el estrés crónico causa daño en el hipocampo de machos, pero mucho menos en las hembras (McEwen, 2000), sugiriendo que la susceptibilidad de las células del hipocampo al estrés crónico juega un papel importante en el trastorno por estrés post traumático (PTSD) y la depresión. Ambos trastornos afectan predominantemente a las mujeres, si bien los estudios en los modelos animales sobre estos trastornos continúan utilizando sujetos macho casi exclusivamente (Nemeroff et al., 2006). Claramente, la relativa resistencia de las neuronas hipocampales al daño inducido por estrés necesita más investigación si se quiere relacionar la muerte neuronal inducida por estrés y estados psicopatológicos como la depresión y el PTSD.

La amígdala también presenta un claro dimorfismo sexual y una lateralización funcional distinta en hombres y mujeres. El tamaño de la amígdala relativo al tamaño total del cerebro es mayor en el hombre que en la mujer, y también existen diferencias sexuales en sus relaciones funcionales con el resto del cerebro (Goldstein, 2001). Varios estudios han descrito influencias de sexo en la función de la amígdala relacionada con el almacenaje de memorias de eventos emocionales, basadas en las interacciones con hormonas de estrés endógenas que se liberan durante los sucesos estresantes (McCaugh, 2004). Los estudios de neuroimagen también revelan diferentes patrones de lateralización relacionados con memorias emocionales, indicando una implicación preferencial de la amígdala izquierda en la memoria de material emocional en mujeres, pero una activación de la amígdala derecha en los hombres (Cahill, 2003). Esta lateralización de la amígdala no sólo se ha visto en el procesamiento de material emocional sino también en estado de reposo (Kilpatrick et al., 2006). También se han visto paralelismos entre la lateralización funcional de la amígdala y la disfunción de la amígdala en determinados trastornos, como las mujeres con síndrome de Turner (que tienen un cromosoma X de menos) quienes muestran una respuesta reducida de la amígdala del hemisferio izquierdo para material emocional (Skuse et al., 2005) o las mujeres con trastorno depresivo o con síndrome del intestino irritable, que muestran una mayor activación de la amígdala izquierda (Drevets, 2003; Naliboff et al, 2003).

Otras interacciones del sexo con lateralidad hemisférica funcional también se han observado en regiones hipotalámicas y en la corteza cerebral prefrontal (PFC) en ratas. La corteza prefrontal es una zona rica en receptores de hormonas sexuales y es una de las regiones con más receptores de estrógeno del cerebro humano (Bixo et al., 1995). Se han visto diferencias sexuales en los sustratos neuronales de la memoria de trabajo, una función

que depende de la actividad del PFC (Duff y Hampson, 2001), y esta zona también se ha asociado con una diferente respuesta al estrés en función del sexo. En humanos, lesiones del PFC del hemisferio derecho empeoran la ejecución en tareas de toma de decisiones en hombres pero no en mujeres, mientras que lesiones del hemisferio izquierdo empeoran la ejecución de mujeres pero no de hombres (Shansky et al., 2004).

Muchos trastornos del SNC muestran diferencias sexuales en la incidencia o naturaleza, como el Alzheimer, el PTSD y otros trastornos de ansiedad, esquizofrenia, esclerosis múltiple, autismo, adicción, fibromialgia, trastorno de atención con hiperactividad, síndrome de intestino irritable, síndrome de la Tourette y trastornos de la ingesta (Klein y Corwin, 2002; Cahill, 2006), por lo que las implicaciones de las influencias sexuales en el estudio y el tratamiento de estos trastornos son considerables. Por ejemplo, con respecto a la enfermedad de Alzheimer que afecta predominantemente a mujeres, se ha visto que el tipo y el grado de patología cerebral, así como la relación entre patología y alteración conductual difieren entre sexos. Así, la patología neurofibrilar asociada con una fosforilación anormal de la proteína tau difiere en el hipotálamo de hombres y mujeres: hasta un 90% de hombres en edad avanzada muestran esta patología, mientras que sólo se encuentra en el 8-10% de las mujeres de la misma edad. En cambio, se ha observado un patrón opuesto en el núcleo basal de Meyner, que es la mayor fuente de inervación colinérgica hacia la corteza. En esta zona, el porcentaje de neuronas que contienen ovillos con proteína tau hiperfosforilada es mayor en mujeres que en hombres. Otras evidencias indican que la relación entre la afectación psicopatológica del Alzheimer y la alteración conductual difiere entre sexos, de manera que la presencia del alelo APOE*E4 (el alelo del gen asociado con un incremento en el riesgo de sufrir Alzheimer) se ha relacionado con una mayor atrofia hipocampal y disfunción de la memoria en las mujeres que en los hombres (Fleisher et al., 2005). Por otro lado, parece que los síntomas de depresión incrementan significativamente el riesgo de sufrir Alzheimer en hombres pero no en mujeres (Dal Forno et al., 2005). Por último, la relación entre los ovillos neurofibrilares y el diagnóstico clínico del Alzheimer también difiere entre hombres y mujeres, de manera que en un estudio donde se utilizaron modelos de regresión se detectó que incrementando en una unidad la severidad de la patología cerebral aumentaba tres veces el riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer en los hombres, mientras que el riesgo aumentaba hasta veinte veces más en las mujeres (Barnes et al., 2005).

Otro trastorno cerebral que difiere en incidencia y naturaleza entre los sexos es la esquizofrenia. Hombres y mujeres muestran una manifestación clínica del trastorno diferente, incluyendo la presentación, sintomatología, edad de aparición y curso de la enfermedad. Algunos patrones de la morfología cerebral también son diferentes entre sexos, por ejemplo, los hombres con esquizofrenia muestran un tamaño de los ventrículos mayor que los hombres sanos mientras que esta alteración no se ve en las mujeres; la proporción del tamaño de la amígdala y de la corteza orbitofrontal está incrementada en hombres con psicosis pero disminuida en mujeres; y con respecto a las facciones de la cara, se ha visto que hombres esquizofrénicos presentan menos asimetría hemisférica facial que el grupo de hombres de referencia, mientras que las pacientes mujeres presentan una mayor asimetría facial con respecto a las mujeres control (para revisión ver Cahill, 2006).

Diferentes componentes de la conducta adictiva también presentan claras diferencias de sexo. Datos provenientes de estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de consumidores de drogas son hombres, aunque durante la última década el número de mujeres que se hacen adictas ha aumentado (Lynch et al., 2002). Hombres y mujeres difieren en las respuestas biológicas y subjetivas a varias drogas de abuso. Por ejemplo, las mujeres inician el consumo de cocaína antes que los hombres, sufren más intoxicación tras niveles similares de consumo de alcohol y tardan menos tiempo a desarrollar una adicción a cocaína, opiáceos y alcohol tras el consumo inicial (Lex, 1991). La dopamina es el neurotransmisor que juega un importante papel en la adicción, en relación a este hecho se han descubierto diferencias sexuales en los niveles de dopamina en muchas regiones cerebrales que puedan estar sustentando la mayor vulnerabilidad de las mujeres a la adicción (Becker y Ramírez, 1981; Bazzett y Becker, 1994).

Por otro lado, y en relación al sistema dopaminérgico, se ha visto que las diferencias de sexo en la prevalencia del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) podrían ser atribuidas a diferencias de sexo en la densidad de receptores de dopamina. En ratas macho se ha visto que la densidad del receptor D2 se incrementa un 144% desde los 25 a los 40 días de edad (período que en humanos correspondería con la pubertad), mientras que el incremento que se produce en las hembras en este período es sólo del 31%, lo que se relacionaría con la aparición de los síntomas motores del TDAH y la mayor proporción, de dos a cuatro veces superior, en los varones (Andersen y Teicher, 2000).

Con respecto a los trastornos afectivos ya hemos comentado anteriormente que tienen una mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres, por ejemplo, el doble de mujeres

sufren de ansiedad generalizada, estrés post-traumático y trastorno por ataques de pánico. Incluso el trastorno bipolar, que no muestra esta prevalencia, sí presenta diferencias de sexo en cuanto a sintomatología (más episodios depresivos y con ciclos más rápidos en mujeres) y edad de aparición (más tarde en mujeres), con lo cual, las hormonas ováricas también se han relacionado en el desarrollo y la progresión de estas patologías (Arnold, 2003).

La serotonina es un neurotransmisor implicado en este tipo de trastornos psiquiátricos como la depresión, ansiedad, impulsividad y suicidio. Por ejemplo, se ha visto que las concentraciones en fluido espinal del metabolito de la serotonina (ácido 5-hidroxiindoleacético) son mayores en mujeres que en hombres, pero en cambio se produce un 40-50% más de síntesis de serotonina en hombres que en mujeres (Cook et al., 1988). También se han descrito diferencias en la permeabilidad del receptor 5HT₂ en el cerebro y en la corteza frontal y cingulada se encontró una menor funcionalidad de este receptor en mujeres en comparación con hombres (Biver et al., 1996).

Por último, debemos comentar que la mayoría de los estudios preclínicos sobre la eficacia y seguridad de nuevas drogas, así como los estudios sobre los correlatos neuroquímicos conductuales y el modo de acción de drogas psicotrópicas se han realizado preferentemente en animales macho, con la razón básica de evitar la complicación asociada al ciclo hormonal femenino. De este modo, algunas de las teorías sobre el modo de acción de los antidepresivos se basaban en los resultados provenientes de estudios realizados exclusivamente en machos. Pero recientemente se han encontrado diferencias de sexo en la respuesta de hombres y mujeres a diversos fármacos antidepresivos y en la farmacocinética de diversas drogas psicotrópicas, por ejemplo los niveles plasmáticos de fluvoxamina y sertralina son un 40 % menores en el hombre que en la mujer. Además el antidepresivo tricíclico amitriptilina produce, a igual dosis, mayores niveles plasmáticos en mujeres que en hombres, y se ha visto que la vida media de otro tricíclico, la imipramina, es mayor en mujeres que en hombres, sin mostrar interacciones con los niveles de hormonas sexuales (Hrdina, 2000). Sin embargo, estos datos parecen contradictorios con aquellos estudios que apuntan que los hombres se benefician más de los antidepresivos tricíclicos mientras que las mujeres responden mejor a los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (Kornstein et al., 2000), lo cual indica la necesidad cada vez más acusada de realizar los estudios básicos y preclínicos con individuos de los dos sexos, y de hecho, durante la última década en un número creciente de trabajos se ha incluido el sexo como variable básica en los estudios. La identificación de factores biológicos, genéticos y ambientales

relacionados con la regulación de los diferentes neurotransmisores y sistemas neuronales permitirán avanzar en el entendimiento de estas diferencias sexuales en conducta normal y enfermedades psiquiátricas, así como en la mejora de diagnósticos y la creación de tratamientos específicos.

3. EFECTOS DIFERENCIALES DEL EA EN FUNCIÓN DEL SEXO

Ya comentamos en apartados anteriores que el tratamiento de EA provoca una serie de cambios a nivel neuromorfológico y neuroquímico que se traducen en mejoras en aprendizaje y memoria y en otros efectos sobre una gran variedad de parámetros conductuales en los animales. De nuevo, la mayor parte de los datos disponibles provienen de estudios realizados en machos, de manera que existen pocos estudios en los que se haya examinado las influencias del enriquecimiento ambiental en los dos sexos. En algunos de estos trabajos ya hay indicios de que el enriquecimiento puede afectar de forma distinta a machos y hembras. A nivel morfológico, Juraska (1984) encontró que la corteza cerebral de ratas macho y hembra respondía de forma diferente al EA, observando que los machos enriquecidos presentaban un aumento de estructuras dendríticas en las neuronas piramidales y estrelladas de la corteza visual en comparación con las hembras enriquecidas; por el contrario, las hembras enriquecidas presentaban una mayor complejidad dendrítica que los machos en las neuronas del giro dentado del hipocampo. Diamond (2001) describió que el enriquecimiento producía un aumento mayor en el grosor de la corteza occipital en los machos, mientras que en las hembras este cambio era más importante en la corteza somatosensorial; estos resultados no estaban mediados por la acción de la testosterona ya que en animales castrados se observaba el mismo patrón. Kolb y sus colaboradores (2003) describieron diferencias de sexo cualitativas en la arborización dendrítica de la corteza cerebral de las ratas: cuando el EA fue administrado durante la infancia, adultez o vejez, se observó un incremento en la longitud de las dendritas de la corteza visual y parietal de los machos, en cambio, este efecto sólo se vio reproducido en hembras enriquecidas durante la edad adulta. En los cerebros de las hembras enriquecidas durante la infancia no apareció ningún cambio en la corteza occipital y sólo se observó un ligero incremento en la longitud de las dendritas apicales de la corteza parietal.

En estudios conductuales también se han observado algunos efectos diferentes dependiendo del sexo del animal. Tees (1999) encontró que el EA mejoró por igual la ejecución de ratas

macho y hembra en la tarea de reconocimiento de objetos y afectó de la misma manera la conducta en el campo abiertos de los dos sexos, mientras que el enriquecimiento sólo aumentó el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (MWM) en los machos. En un experimento realizado con ratones TS65Dn, un modelo animal de Síndrome de Down, se obtuvo un efecto diferencial opuesto, de manera que el enriquecimiento mejoró la ejecución en el MWM de las hembras pero no afectó el rendimiento de los machos (Martínez-Cué et al., 2002). Wagner et al. (2002) mostraron que el EA mejoraba la recuperación tras traumatismo cerebral en los machos pero no en las hembras lesionadas, en una tarea de orientación de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris 14 días después de la lesión. En otro estudio, estos mismos autores observaron que a nivel neuroquímico el traumatismo cerebral producía una disminución del transportador de la dopamina (DAT) en el estriado y la corteza ipsilateral a la lesión en machos y hembras, pero el tratamiento de enriquecimiento afectó negativamente a las hembras provocando una mayor disminución del DAT (Wagner et al., 2005). Chen y sus colaboradores (2005) observaron que tras la lesión cerebral los machos presentaban un aumento cortical de BDNF, mientras que en las hembras no se alteraron estos niveles en la corteza pero sí aumentaron en el hipocampo contralateral a la lesión. En este caso el EA no tuvo efecto en los machos, mientras que las hembras enriquecidas también presentaron un aumento en los niveles de BDNF en el hipocampo ipsilateral a la lesión, mostrando por tanto un patrón diferente de recuperación en el que estaban interviniendo diferentes estructuras. Estos resultados relacionados con la recuperación de traumatismos podrían tener una gran repercusión en el estudio de intervenciones en humanos, que deberían diseñarse específicamente para hombres o mujeres.

Por otro lado, los requerimientos experimentales conllevan a menudo la implantación de cánulas a los animales, de manera que los sujetos deben mantenerse en jaulas individuales necesariamente. Se ha visto que si a estos animales se les enriquece el ambiente mediante la introducción de diferentes objetos en las jaulas se obtienen resultados diferenciales en función del sexo. Así, Belz et al. (2003) mostraron que, globalmente, estos animales aislados enriquecidos presentaban niveles basales de ACTH y corticosterona inferiores a los de los animales aislados no enriquecidos; no obstante, inmediatamente después de una experiencia de estrés medio como recibir una inyección intraperitoneal de salino, las hembras aisladas enriquecidas presentaban niveles inferiores de ACTH que los machos

aislados enriquecidos, sugiriendo que el enriquecimiento producía un efecto de disminución de la respuesta hormonal al estrés superior en hembras que en machos.

Otro tipo de intervenciones como estabular a los animales en grupos superpoblados, también afecta de forma diferente a machos y hembras; de manera que los machos presentan un nivel de corticosterona basal mayor que las hembras en una condición de hacinamiento; en cambio, las hembras muestran niveles de corticosterona mayores que los machos en una condición de aislamiento social en ambientes empobrecidos (Brown y Grunberg, 1995).

A nivel conductual, ratas macho y hembra también responden diferente ante procedimientos de estrés medio crónico, como el utilizado en el estudio de Dalla et al. (2005), en el que exponían a las ratas durante dos veces al día a diferentes estresores: privación de agua o comida, iluminación estroboscópica, iluminación intermitente, inclinación de la jaula, suelo de la jaula mojado, etc. El impacto de este procedimiento en parámetros conductuales, actividad serotoninérgica y niveles de corticosterona fue dependiente del sexo. Globalmente, las hembras fueron más vulnerables a este tipo de estrés medio crónico que los machos, algunas conductas parecieron más afectadas en las hembras, quienes mostraron una disminución de la conducta exploratoria, así como una disminución en el consumo de glucosa y de la actividad serotoninérgica en el hipocampo y el hipotálamo, junto con una elevación de los niveles de corticosterona basales y una desincronización del ciclo de estro. Por el contrario, los machos mostraron únicamente cambios en parámetros conductuales pero no mostraron alteraciones bioquímicas. Cuando a estos animales se les sometió a un estrés agudo, como la prueba de natación forzada, las hembras estresadas presentaron una estrategia de afrontamiento más activa y realizaron menos conducta pasiva lo que indicó una mejor respuesta ante este tipo de estrés agudo, igualmente presentaron una mayor actividad serotoninérgica hipotalámica en respuesta al estrés respecto al grupo de machos estresados, que mostró signos de sintomatología depresiva más pronto y un mayor aumento de corticosterona ante la prueba de natación forzada (Dalla et al., 2005). En el estudio de Welberg et al. (2006) también se encontró que un tratamiento de enriquecimiento pre-y-postnatal afectó de forma diferente la respuesta del eje HPA en machos y hembras que habían sufrido estrés crónico. A nivel neurobiológico, se ha visto que el estrés crónico induce daño hipocampal (atrofia dendrítica y pérdida de células piramidales) en machos pero no en ratas hembra (McEwen, 2000), y el estrés agudo aumenta las espinas dendríticas en el hipocampo en ratas macho y las disminuye en

hembras (Shors et al., 2001). También se encontraron efectos diferenciales del tratamiento de EA de 30 días de duración en la respuesta de ratas macho y hembra ante la exposición a un depredador. Así, mientras que el EA disminuyó las reacciones defensivas de ansiedad en ratas de ambos sexos medidas como el tiempo de permanencia cerca del depredador, se encontraron efectos diferenciales con respecto a la conducta de petrificación de manera que las hembras enriquecidas realizaron menos conducta de petrificación con respecto a las hembras control sin que se observaran diferencias entre los dos grupos de machos (Klein et al., 1994).

4. OBJETIVOS GENERALES

Tal y cómo se ha descrito en la introducción, las experiencias ambientales juegan un papel clave en la determinación de los fenotipos conductuales, y la crianza en ambientes enriquecidos es una de las experiencias con más efectos descritos sobre el desarrollo del sistema nervioso y con más repercusiones en las habilidades cognitivas y en la conducta de los animales de laboratorio. No obstante, la gran cantidad de información de que disponemos acerca de los efectos del EA proviene de estudios realizados con sujetos macho, aunque algunas investigaciones han descrito efectos diferenciales del enriquecimiento en función del sexo del animal. Por otro lado, el hecho de que en humanos haya diferencias de sexo importantes en la prevalencia o la severidad de algunas psicopatologías como los trastornos de ansiedad, la depresión, la esquizofrenia o la conducta adictiva, o que en algunos ensayos clínicos se haya demostrado que también hay diferencias de sexo en la efectividad de algunos tratamientos farmacológicos, justifica cada vez más el interés de incluir a las hembras en los diseños experimentales.

En base a todo ello, el primer objetivo general del presente trabajo es estudiar los efectos del EA en una batería de pruebas conductuales que modelen aspectos emocionales, cognitivos, sociales y de otras funciones con el fin de aportar una visión general y más completa sobre los efectos de este tratamiento en ratas macho y hembra.

Un segundo objetivo derivado del primero es comprobar si los efectos del EA en machos y hembras van siempre en la misma dirección o, por el contrario, difieren en alguno de los paradigmas estudiados.

Y en tercer lugar, nos proponemos comprobar también si los efectos del EA ‘per se’ son consistentes a lo largo de las diferentes pruebas estudiadas. Esto es, si bien es cierto que un

porcentaje alto de artículos publicados sobre los efectos del EA describen efectos ‘beneficiosos’ del tratamiento en una amplia gama de tareas de aprendizaje especialmente, cabe preguntarse si este perfil se mantiene en relación a diferentes funciones cognitivas o en relación a diferentes síntomas psicopatológicos.

Estos objetivos generales se abordan a través de dos bloques experimentales en los cuales se concretan puntualmente los objetivos más específicos. El primer bloque contiene dos estudios en donde se evalúan los efectos del EA en pruebas de exploración y memoria social, reactividad emocional, aprendizaje y mecanismos atencionales. El segundo bloque experimental incluye el tercer estudio destinado mayormente a evaluar los efectos del EA en la conducta operante de autoadministración de cocaína, utilizando el paradigma de autoadministración intravenosa.

II. PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL: Estudio de los efectos del Enriquecimiento Ambiental en conducta emocional, respuesta del eje HPA, exploración, interacción social, filtraje sensoriomotor y aprendizaje

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interacción y memoria social

La habilidad para reconocer a los miembros de una misma especie es el fundamento de todas las relaciones sociales en los mamíferos, incluyendo el reconocimiento entre miembros de una misma familia, el de la progenie, y el de otros miembros del grupo para el establecimiento de jerarquías. Todos estos procesos requieren discriminación social: mientras que en humanos el reconocimiento de individuos se basa en pistas visuales y auditivas, en otras especies, como en el caso de los roedores, la señal que recoge el animal para formar este tipo de memoria social es básicamente olfativa. Los roedores tienen dos vías para captar este tipo de información: el sistema olfativo que capta olores o sustancias volátiles y el vomeronasal, que detecta feromonas o sustancias no volátiles. De entre las pruebas conductuales utilizadas para investigar procesos de memoria en ratas, el procedimiento de Discriminación Social (DS) es uno de los paradigmas más interesantes por su simplicidad y relevancia etológica (Engelmann et al., 1995). Este modelo experimental se basa en las capacidades de discriminación olfativa de los roedores y tiene la ventaja de que, debido a la tendencia innata del animal por investigar a sus congéneres, no utiliza ningún tipo de estímulo artificial. En el paradigma de la DS generalmente el animal adulto es expuesto a un juvenil, y tras cierto intervalo de tiempo se le presenta simultáneamente el mismo animal y uno nuevo. La reducción de la investigación por parte de la rata adulta hacia el juvenil conocido en la segunda exposición nos dará un índice de retención (Thor y Holloway, 1982; Ferguson et al., 2002).

Las vías implicadas en el reconocimiento social presentan dimorfismo sexual y son altamente sensibles a los efectos de esteroides sexuales, por lo que podemos esperar diferencias de sexo en este paradigma (Bielsky y Young, 2004). Por ejemplo, las hembras mostraron menores niveles de comportamiento social investigador (Bluthe y Dantzer, 1990; Engelmann et al., 1998; Liebsch et al., 1998), pero retuvieron las respuestas de reconocimiento durante un tiempo significativamente mayor que los machos, presentando memoria hasta 180 minutos después de la primera presentación, mientras que los machos ya no mostraron reconocimiento a los 90 minutos (Bluthe y Dantzer, 1990).

Este paradigma de memoria en roedores ha sido utilizado para el estudio de mecanismos básicos subyacentes al reconocimiento social, como la vasopresina o la oxitocina (Dluzen et al., 1998a,b; Reijmers et al., 2001a), así como para evaluar el efecto facilitador o inhibidor de la memoria de diversas sustancias, como por ejemplo el etanol, por lo que ha resultado ser un buen paradigma para el estudio de la memoria a corto plazo (Prediger y Takahashi, 2003). No obstante, las investigaciones encaminadas a probar los efectos de intervenciones conductuales en este paradigma son escasas, aún cuando se ha comprobado que las experiencias ambientales tempranas pueden afectar a este tipo de memoria. Un ejemplo de ello nos lo ofrece el paradigma de la derrota social, un tipo de procedimiento inductor de estrés, que consiste introducir una rata dominante y agresiva dentro de la jaula donde está la rata a la que se quiere someter a la ‘derrota social’, esta rata se sentirá en peligro y mostrará conductas de freezing y de sumisión hacia la rata intrusa. Se ha visto que, en ratas wistar macho la inducción de este tipo de estrés una vez al día durante 5 días, empeoró de forma duradera (hasta 8 semanas después de la exposición) la memoria olfativa de los sujetos (Reijmers et al., 2001b). Aunque, en otro experimento utilizando un único episodio de derrota social, tras lo cual se realizó la medida de reconocimiento social, se produjo una mejora en la memoria social de ratas hembra (Penka et al., 2004). Probablemente, la inconsistencia de estos resultados se deba a que en el primer experimento el procedimiento produjo un tipo de estrés crónico mientras que en el segundo el estrés fue administrado en una única sesión, además en el primer estudio se utilizaron animales macho mientras que el segundo se realizó con sujetos hembra, que pueden presentar una distinta reactividad ante la situación de derrota social. Otro tratamiento de intervención temprana, como es la Exposición Postnatal a la Novedad, un procedimiento derivado del Handling Postnatal (Levine, 1957) y que consistió en la exposición durante las tres primeras semanas de vida de las ratas a un ambiente nuevo (jaula nueva) durante 3 minutos diarios, ha producido efectos beneficiosos aumentando la duración de la memoria social hasta 24 horas (Tang et al., 2003).

El paradigma de la Discriminación Social, además de ser un procedimiento eficaz para el estudio de la memoria a corto plazo, también permite observar la conducta social ‘per se’. Debido a la naturaleza social de la rata, podría esperarse que algunos aspectos de la interacción social se vean afectados por las manipulaciones en el ambiente de crianza. A pesar de la plausibilidad de esta hipótesis, escasos trabajos se han dedicado a examinar los efectos del enriquecimiento en los patrones de interacción social de los animales. Juraska y

Meyer (1986) encontraron que machos y hembras enriquecidas interaccionaban con el ambiente de una forma muy parecida, dedicando más tiempo a interactuar con los objetos de su ambiente que a las interacciones sociales. Por ejemplo, se ha indicado que el aislamiento social repercute negativamente en los animales, aumentando las conductas agresivas (Baenninger, 1967). En el estudio de Renner y Rosenzweig (1986b) no se encontraron diferencias en interacción social entre animales enriquecidos respecto a los aislados. Sin embargo, sería preciso estudiar el comportamiento social de animales enriquecidos comparándolos con un grupo control social, que evite los efectos indeseados que el aislamiento social produce sobre la conducta.

1.2. Exploración y respuesta emocional

En este apartado se describen los efectos del EA en conducta exploratoria y reactividad emocional. La información se ha organizado en tres apartados en base a las pruebas utilizadas en el programa experimental: laberinto elevado en cruz, respuesta de sobresalto y respuesta hormonal del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) ante una situación de novedad. En cada uno de estos apartados se incluye también una parte donde se repasan los efectos diferenciales del sexo que algunos tratamientos ambientales producen en parámetros conductuales o fisiológicos relacionados con la ansiedad o la reactividad emocional.

1.2.1. Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz (EPM) es uno de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio de la ansiedad incondicionada y ha sido bien caracterizado y validado etológica y farmacológicamente (Pellow y File, 1986; Rodgers y Dalvi, 1997). Se considera que la conducta en los brazos abiertos del laberinto indica niveles de ansiedad bajos. Los ansiolíticos, como las benzodiazepinas y dosis bajas de alcohol aumentan la conducta en los brazos abiertos y los fármacos ansiogénicos la disminuyen (Pellow y File, 1986). Algunos autores observan que el enriquecimiento provoca un incremento en el tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos (Fernández-Teruel et al., 1997; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Friske y Gammie, 2005; Schneider et al., 2006), aunque otros no encuentran efectos tan claros en estas medidas clásicas (Roy et al., 2001), e incluso un estudio reciente en

ratones muestra que los enriquecidos realizaron menos entradas y permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto comparados con los control (Zhu et al., 2006).

Se han documentado ampliamente diferencias de sexo en la conducta emotiva en ratas, y se ha visto que los machos realizan más defecaciones que las hembras y recorren una distancia menor en el campo abierto, lo cual parece indicar que las ratas macho son más temerosas (Aguilar et al., 2003). Estudios que utilizan otros tipos de situaciones aversivas proveen un mayor soporte a la hipótesis de una mayor ansiedad en los machos comparados con las hembras, ellos presentan una menor frecuencia de entradas en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Johnston y File, 1991), mayores reacciones ante estrés agudo (Steenbergen et al., 1991), y peor ejecución en la respuesta de huida ante shock eléctrico inescapable y en la evitación activa en dos sentidos (Saavedra et al., 1990; Steenbergen et al., 1990).

1.2.2. Respuesta de sobresalto

Este paradigma experimental permite evaluar la reactividad emocional a través de la respuesta de sobresalto que emite el sujeto cuando se enfrenta a un estímulo aversivo agudo y muy breve, como un ruido fuerte o un estímulo luminoso. Esta variable es muy utilizada puesto que puede ser medida repetidamente en animales y humanos con lo que se obtienen resultados paralelos. La respuesta de sobresalto acústica (ASR) provocada por un estímulo auditivo intenso e inesperado se encuentra aumentada en pacientes con trastornos de ansiedad (Koch, 1999) o en sujetos que observan imágenes aversivas (Lang et al., 1990), por lo que se encuentra afectada por el estado emocional del individuo, y se ha implicado el estrés como un factor causal de las alteraciones en esta respuesta (Faraday et al., 1999).

En el paradigma de la respuesta de sobresalto ante una señal acústica, la rata es situada en un aparato que mide sus movimientos y se le administra una serie de sonidos de alta intensidad que provocan una respuesta automática de sobresalto, quedando grabada la intensidad de la respuesta que provoca cada estímulo. Mediante esta prueba podemos medir la intensidad de la respuesta de sobresalto de la rata y la habituación a este estímulo aversivo (Varty et al., 2000; Schneider et al., 2006).

Los efectos del EA en el ASR son contradictorios. En el estudio efectuado por Geyer y sus colaboradores (1993) el aislamiento social produjo un déficit en la habituación de la respuesta de sobresalto, Contrariamente, el estudio de Varty y colaboradores (2000), en el

que se utilizaron ratas Sprague-Dawley, las ratas enriquecidas y las que sufrieron aislamiento social mostraron niveles mayores de respuesta de sobresalto comparadas con las ratas control estabuladas en grupos, pero todos los grupos mostraron niveles similares de habituación al estímulo de sobresalto. Mientras que Schneider et al. (2006), no hallaron diferencias en función del tratamiento de EA en otro estudio con ratas Wistar.

Al igual que con el tratamiento de EA otras intervenciones ambientales presentan inconsistencias en cuanto a los resultados en respuesta de sobresalto, por ejemplo la separación maternal, que consistió en separar a las crías de la madre durante una hora al día desde el día 2 al 11, aumentó la respuesta de sobresalto y evitó la habituación en ratas (Finamore y Port 2000), o no produjo ningún efecto (Lehmann et al., 2000). Además, ratones transgénicos CRH-OE 2122 que sobreexpresan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) presentan una respuesta de sobresalto menor que los ratones control. La CRH juega un importante papel en la respuesta del organismo ante una variedad de estímulos estresantes, ya que coordina las respuestas neuroendocrinas, autonómicas, inmunológicas y conductuales del estrés (Koob et al., 1993; Lowry y Moore, 2006), y la hiperactivación crónica de CRH se ha implicado en trastornos relacionados en el estrés y trastornos afectivos como la depresión en humanos (Arborelius et al., 1999). Este estudio parece indicar que el exceso de hormonas de estrés (que simularía la situación de estrés crónico) podría reducir la reactividad conductual en ratas (Dirks et al., 2002). Aunque otros estudios muestran que el estrés crónico aumenta la respuesta de sobresalto (Servatius et al., 2005) y otros no encuentran diferencias en la respuesta de sobresalto tras la exposición a estrés crónico (Sipos et al., 2000).

En cuanto a diferencias de sexo, los resultados tampoco son concluyentes, estudios con humanos reportan resultados contradictorios y además encuentran que entre sujetos sanos se produce una gran variabilidad en las respuestas de sobresalto (Ludewig et al., 2003). Kofler et al. (2001) reportaron menores magnitudes de respuesta de sobresalto en hombres respecto a las mujeres, mientras que Swerdlow et al. (1993) no encontraron diferencias de sexo en la respuesta de sobresalto, al igual que el estudio de Ludewig et al (2003) donde tampoco se encontraron diferencias de sexo en la respuesta de sobresalto. Estudios con animales de laboratorio tampoco muestran resultados consistentes, algunos estudios con ratas Wistar y Sprague-Dawley apuntan a que la respuesta de sobresalto es mayor en machos que en hembras (Lehmann et al., 2000; Aguilar et al., 2003), aunque otros estudios

con ratas tampoco encuentran diferencias de sexos en la respuesta de sobresalto (Faraday et al., 1999; Borrell et al 2002).

1.2.3. Respuesta hormonal del eje HPA

En cuanto a las influencias del EA en los niveles basales de las hormonas ACTH y corticosterona, así como en la activación del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) en respuesta a una situación de novedad o de estrés, los resultados no son consistentes, aunque en general parecen indicar una disminución en la reactividad emocional y una mayor adaptación ante estímulos estresantes (para revisión ver Fox et al., 2006).

Belz et al (2003) vieron que animales enriquecidos estabulados individualmente mostraron niveles basales más bajos de ACTH y corticosterona que los animales aislados no enriquecidos. En este experimento aparecieron diferencias de sexo: ante una situación de estrés intermedio como es una inyección de salino, la respuesta de ACTH fue menor en las hembras enriquecidas respecto a los machos enriquecidos. Generalmente las hembras presentan valores hormonales más elevados que los machos en relación al eje HPA, tanto los correspondientes a niveles basales como en respuesta a un estrés agudo (Rhodes y Rubin, 1999; Rhodes et al., 2002). Recientemente, Welberg et al. (2006) han estudiado los efectos del EA administrado muy tempranamente, para ello estabularon ratas hembra en condiciones de enriquecimiento moderado durante el embarazo, y las mantuvieron en estas condiciones durante toda la lactancia, hasta el destete. Posteriormente la descendencia fue sometida a estrés crónico durante la edad adulta entre los días 60-80 postnatales, consistente en la estabulación de los animales en situaciones de luz constante. Tras este procedimiento los autores no observaron diferencias basales ni en respuesta al estrés agudo entre los machos enriquecidos y control, el estrés crónico aumentó los niveles de CORT basal en las hembras control pero no se observaron cambios en las hembras enriquecidas. Sin embargo, cuando fueron sometidas a un estrés agudo (consistente en la administración de golpes de aire a presión en la cabeza) las hembras no enriquecidas que habían sufrido estrés crónico presentaron una respuesta disminuida de ACTH en comparación al grupo de hembras enriquecidas (Welberg et al., 2006).

A diferencia de otros estudios que muestran mayores efectos en machos que en hembras (Juraska, 1984; Elliott y Grunberg, 2005) estos estudios parecen mostrar una mayor

sensibilidad de las ratas hembra a los efectos de las influencias ambientales tempranas en medidas de reactividad emocional (Fox et al., 2006).

Por otro lado, se ha visto que ratas macho enriquecidas comparadas con aisladas mostraron niveles similares de ACTH y corticosterona tanto basales como en respuesta a un estrés agudo por inmovilización de 20 minutos (Schrijver et al., 2002). El EA también reduce la reactividad ante estrés agudo de mediana intensidad como es el handling restrictivo durante 40 minutos, del sistema colinérgico pero no dopaminérgico en la corteza prefrontal comparados con los animales control aislados (Del arco et al., 2007b). Ratonos macho criados en condiciones de EA presentan una menor respuesta de corticosterona ante una situación de estrés agudo por exposición a un olor de depredador comparados con los ratones estabulados de forma estándar (Roy et al., 2001).

Además, otros estudios han encontrado efectos significativos de disminución de la reactividad del eje HPA mediante el tratamiento de EA. Por ejemplo, el EA administrado a ratas macho durante la adolescencia revertió las alteraciones causadas por el estrés prenatal en la respuesta hormonal tras la aplicación de estrés agudo por inmovilización. Es decir, no se observaron diferencias entre los animales 'naive' enriquecidos y no enriquecidos, pero en cambio el enriquecimiento disminuyó la respuesta de corticosterona tras la inmovilización en los grupos que habían sufrido estrés prenatal, por lo que pareció ejercer papel protector ante los efectos perjudiciales que provoca el estrés prenatal (Morley-Fletcher et al., 2003).

En el estudio de Francis et al. (2002) también se observaron efectos beneficiosos del EA en sujetos que habían recibido estrés juvenil mediante el procedimiento de separación maternal.

En roedores, la separación maternal postnatal se ha utilizado como modelos de los efectos de las experiencias adversas tempranas, y se ha visto que produce un aumento en las conductas de ansiedad en la etapa adulta en paradigmas conductuales como el laberinto elevado en cruz y el test de interacción social (Kalinichev et al., 2002, Wigger y Neumann 1999). Aunque la separación maternal produce efectos negativos a largo plazo en los sujetos, el tratamiento de handling postnatal ha mostrado ejercer efectos beneficiosos de disminución de la ansiedad en ratas (Fernández-Teruel et al 1997). La diferencia entre ambas aproximaciones es que en el Handling Postnatal las separaciones de la cría son breves (3-20 minutos) y además de la estimulación física por parte del experimentador, parecen existir otros factores, como el aumento en las conductas maternas cuando el

animal se devuelve a la jaula o la hipotermia a la que se exponen las crías durante las sesiones de handling (Chapillon et al., 2002) que benefician al sujeto, en cambio, en la separación maternal se producen periodos de tiempo más prolongados de privación maternal (varias horas) que produce efectos perjudiciales para la cría. En este estudio, los grupos que habían experimentado separación maternal pero que habían recibido enriquecimiento mostraron una disminución del incremento de corticosterona tras estrés por inmovilización comparados con los grupos que no habían recibido enriquecimiento. En este caso el EA contrarrestó los efectos negativos del procedimiento de separación maternal en la activación del eje HPA (Francis et al., 2002).

1.3. Evaluación de la atención y del filtraje sensoriomotor

La atención y el procesamiento de estímulos son componentes fundamentales en muchas conductas, tanto simples como complejas. De hecho, déficits en atención o en la habilidad de detectar estímulos relevantes y descartar los no relevantes es un fenómeno central en trastornos cognitivos tales como la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención o la demencia (Ellenbroek, 2004). La atención no es un constructo unitario sino que puede dividirse en diferentes tipos, incluyendo la alerta o atención sostenida, la atención dividida y la atención selectiva. De todas formas la habilidad para responder a ciertos estímulos y descartar la información no relevante es central en todos los tipos de atención (Lovic y Fleming 2004).

En los primeros estadios del procesamiento de la información se llevan a cabo procesos automáticos o pre-atencionales que no llegan a la conciencia. Generalmente estos procesos ocurren durante los primeros 100 ms tras la presentación del estímulo (Ellenbroek, 2004). Uno de los paradigmas desarrollados para el estudio de estos procesos automáticos o pre-atencionales es el de la inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto ('prepulse inhibition' o PPI). Debido a que se pueden utilizar parámetros estimulares muy similares en estudios con animales y humanos se considera que la inhibición prepulso representa un buen modelo en el estudio de los mecanismos neurales que subyacen a la disfunción de los filtros atencionales (Swerdlow et al., 1994; Borrell et al., 2002).

La respuesta de sobresalto es la reacción corporal o muscular del organismo ante un estímulo táctil, visual o acústico inesperado y el PPI es la reducción de la respuesta de sobresalto que se observa si un estímulo débil o prepulso es presentado justo antes (30-300

ms) del estímulo que provoca la respuesta de sobresalto. La reducción o inhibición de la respuesta de sobresalto cuando un estímulo débil se presenta inmediatamente antes del estímulo de sobresalto parece deberse a un mecanismo de inhibición pre-atencional en respuesta a estímulos sensoriales que serviría para proteger los primeros estadios de procesamiento de información. De este modo, el cerebro evaluaría el estímulo prepulso y no procesaría el estímulo de sobresalto, lo cual produciría una reducción de la respuesta. El fenómeno de PPI nos proporciona una medida funcional de los mecanismos atencionales automáticos subyacentes a la inhibición de la respuesta conductual observada (Lovic y Fleming, 2004).

Pacientes con esquizofrenia presentan un déficit en este filtro sensoriomotor y exhiben niveles reducidos de inhibición prepulso comparados con los sujetos control (Braff et al., 1999), así como familiares de esquizofrénicos (Cadenhead et al., 2000) y lo mismo ocurre en otros trastornos psiquiátricos como el trastorno obsesivo-compulsivo (Swerdlow et al., 1993), el síndrome de Tourette (Swerdlow y Sutherland, 2005), en pacientes con trastorno de déficit de atención con hiperactividad y enuresis, sujetos con trastorno de personalidad esquizotípica (Cadenhead et al., 2000), y algunos estudios también reportan un déficit de PPI en el trastorno por estrés post-traumático (Swerdlow et al., 2000)

De acuerdo con las hipótesis neuroquímicas de la esquizofrenia, manipulaciones farmacológicas de los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico empeoran el PPI en ratas, y estas alteraciones son revertidas con antipsicóticos (Swerdlow et al., 1994); así por ejemplo, se ha visto que el PPI empeora mediante agonistas dopaminérgicos como la apomorfina o la anfetamina (Geyer et al., 2001) y que el sistema serotoninérgico modula el PPI mediante múltiples receptores y sistemas anatómicos (Sipes y Geyer, 1997; Geyer et al., 2001) y la administración de antagonistas NMDA como la dizolcipina o la fenciclidina también producen déficit de PPI (Swerdlow y Geyer 1998; Geyer et al., 2001). Otras formas de modelar los déficit de PPI en animales se basan en intervenciones ambientales. El paradigma de aislamiento social se ha utilizado como un método no farmacológico inductor de algunas alteraciones presentes en la esquizofrenia, como el déficit en ppi, y también se utiliza para el screening de drogas antipsicóticas. Además, los déficit en inhibición prepulso que presentan estas ratas son revertidos con antipsicóticos (Swerdlow et al., 1994). En ratas que han sido criadas de forma aislada se observan estos déficit de inhibición prepulso comparadas con las ratas control estabuladas en grupos de tres (Varty et al., 2000). La privación maternal postnatal también se ha utilizado como

paradigma inductor de déficits en PPI (Ellenbroek y Cools, 2002), por ejemplo, ratas criadas en un ambiente artificial desde el nacimiento (aisladas, sin contacto materno y alimentadas mediante sondas gástricas) también muestran un PPI inferior a las del grupo control estándar (Lovic y Fleming, 2004).

Además, manipulaciones de los circuitos neurales que conectan el hipocampo (Caine et al., 1991), el núcleo accumbens (Swerdlow et al., 2000), el núcleo pedunculopontino (Swerdlow y Geyer, 1993), la corteza entorrinal y la amígdala (Daenen et al., 2003) también provocan alteraciones en la inhibición prepulso.

Como vemos, las aproximaciones utilizadas en el estudio de los procesos pre-atencionales involucrados en los déficits de PPI han utilizado además de aproximaciones farmacológicas y neuroanatómicas, intervenciones ambientales encaminadas a reproducir los déficits de PPI, pero pocos han sido los estudios encaminados a aumentar las habilidades de PPI. Por ejemplo, un estudio encontró que el handling diario de los animales era suficiente para revertir los déficit de PPI producidos por el aislamiento social en ratas (Krebs-Thomson et al., 2001). El EA podría ser una forma de mejora de estos filtros atencionales, aunque hasta ahora el estudio de los efectos del EA en el paradigma de inhibición prepulso son escasos; en el estudio de Varty et al (2000) se encontraron niveles similares de inhibición entre ratas enriquecidas y controles (estabuladas de forma social), mientras que otros autores mostraron que el EA atenuó hasta en un 30% las alteraciones en PPI que presentaban ratas expuestas a ácido valproico durante la gestación (modelo de autismo) (Schneider et al., 2006).

Respecto a si existen diferencias de sexo en PPI los resultados no son consistentes, en humanos se han encontrado diferencias de PPI en niños de 8 años (Ornitz et al., 1991) y en adultos (Blumenthal y Gescheider, 1987; Swerdlow et al., 1993) donde las mujeres presentaban una reducción en ppi comparadas con los hombres, mientras que en el estudio de Ludewig et al (2003) no se hallaron diferencias de sexos en inhibición prepulso entre individuos adultos ni viejos. Y los resultados provenientes de estudios con roedores obtienen también diferentes resultados, mientras que Swerlow et al. (1993) no encontró diferencias de sexo ratas, otros estudios han mostrado que los machos suelen presentar mayores niveles de PPI que las hembras (Faraday et al., 1999; Lehmann et al., 2000)

1.4. Evaluación de las capacidades de aprendizaje y memoria: el Laberinto Hebb-Williams

El laberinto Hebb-Williams (1946, citado en Renner y Rosenzweig, 1987) fue desarrollado como una prueba para medir 'inteligencia animal' que podría compararse, de forma abstracta, a los tests de inteligencia en humanos. En este laberinto, los animales son entrenados en un conjunto de 6 problemas hasta que llegan a un criterio de adquisición y entonces son enfrentados a una serie de 12 problemas. Para solucionar esta prueba, las pistas espaciales externas, como las paredes exteriores y los compartimentos de salida y de meta permanecen constantes, mientras que las barreras internas, que definen la configuración de cada problema, cambian diariamente. Para resolver el laberinto se requiere el uso de la memoria de referencia y de la memoria de trabajo. La posición del laberinto dentro de la habitación y la localización de los compartimentos de salida y meta permanecen constantes a lo largo de los 12 problemas (memoria de referencia), mientras que la localización de las barreras internas permanece constante en cada problema pero cambia con las diferentes configuraciones diarias (memoria de trabajo)(Hoplight et al., 2001). Además de para el estudio de estos dos componentes de la memoria, la utilización del laberinto Hebb-Williams tiene otras ventajas para el estudio comparativo del aprendizaje y la memoria: consta de problemas de diferente dificultad: animales con problemas de aprendizaje pueden no mostrar déficits en los problemas fáciles, pero empeoran la ejecución cuando aumenta la dificultad de los problemas (Stanford y Brown, 2003). Además, el análisis de los errores como una medida del aprendizaje, independientemente del tiempo en el que el animal resuelve el laberinto elimina el factor de la habilidad locomotora en el análisis de las capacidades de aprendizaje.

Numerosos estudios han investigado los efectos del enriquecimiento en diversas tareas de aprendizaje (Renner y Rosenzweig, 1987), inicialmente se utilizó el laberinto Hebb-Williams como prueba de aprendizaje complejo, detectando diferencias entre animales enriquecidos y aislados, de manera que los primeros mostraban consistentemente una mejor ejecución en el laberinto (Forgays y Reid, 1962).

Otros estudios también han mostrado superioridad por parte de las ratas enriquecidas en esta prueba (Forgays y Forgays, 1952; Brown, 1968; Boehm et al., 1996; Galani et al., 1997; Winocur, 1998; Hoplight et al., 2001), aunque también se ha encontrado que la ejecución en el laberinto se ve más afectada en las ratas enriquecidas si se rota el laberinto

(Forgays y Forgays, 1952; Brown, 1968) por lo que se supone que las ratas enriquecidas utilizan más pistas externas al laberinto para la solución de los problemas espaciales. Además, las diferencias inducidas por el EA en la ejecución del laberinto parecen ser duraderas, Denenberg et al (1968) mostraron que las diferencias entre animales enriquecidos y aislados en ratas hembra estuvieron presentes incluso 300 días después de la finalización del EA. Kobayashi et al (2002) estudiaron los efectos del EA administrado en diferentes momentos temporales y con diferentes duraciones en el laberinto Hebb-Williams en comparación con ratas estabuladas en grupos de 3 individuos de forma estándar. Por un lado, algunas ratas fueron enriquecidas desde el destete hasta los 2,5 meses, 15 meses o 25 meses, y otros grupos de ratas recibieron 3 meses de enriquecimiento durante la edad adulta (a los 11 meses) o durante la vejez (a los 22 meses). Los resultados de este estudio mostraron que 3 meses de enriquecimiento fueron suficientes para aumentar las funciones cognitivas en la etapa adulta y la vejez. En la edad adulta el enriquecimiento de 3 meses fue comparable al enriquecimiento administrado desde el destete, mientras que en las ratas viejas el tratamiento de 3 meses mejoró significativamente la ejecución en el Hebb-Williams pero en menor medida que la exposición duradera al enriquecimiento desde el destete. Winocur (1998), también estudió los efectos del EA en la ejecución de las ratas en este laberinto en ratas jóvenes y viejas. Encontró que ratas viejas estabuladas en condiciones de aislamiento social durante 3 meses mostraron peor ejecución en el laberinto comparadas con ratas viejas que estaban estabuladas de forma social o enriquecida. Posteriormente, se estudió el efecto de transferir las condiciones ambientales de los sujetos, y las ratas viejas que fueron transferidas de la situación de aislamiento a la situación de enriquecimiento por 3 meses mostró una mejora en la ejecución respecto a ratas viejas que siempre habían vivido en condiciones sociales estándar. El grupo de ratas viejas que fueron transferidas a la situación de aislamiento tras el enriquecimiento o la tras la estabulación social disminuyó la ejecución pero mostraron una mejora respecto a las ratas que habían vivido en aislamiento por 6 meses. Mientras que las ratas que recibieron 3 meses de enriquecimiento durante la juventud (a los 6-7 meses de edad) parecieron verse menos afectadas por las diferencias ambientales y su ejecución no difirió respecto a los grupos sociales y aislados. Estos experimentos sugieren que el EA produce efectos beneficiosos en la mejora cognitiva en el laberinto Hebb-Williams incluso cuando es administrado durante la vejez, y que el enriquecimiento ambiental protege ante los déficits cognitivos asociados a la edad y ante la situación de aislamiento durante la etapa adulta y la vejez.

Pero los efectos de mejora cognitiva a consecuencia del enriquecimiento también se han encontrado en ratas con lesiones cerebrales. Así, se encontró que el enriquecimiento durante el periodo post-lesión disminuyó los déficits de ejecución en el Hebb-Williams de las ratas con lesiones de las proyecciones frimbria-fornix comparadas con las ratas control estabuladas en grupos de 3 individuos (Kelche et al., 1995), y también disminuyó los déficits de ratas con lesiones en el hipocampo (Galani et al., 1997).

Algunos estudios también han reportado diferencias de sexo en la ejecución de laberintos, mostrando que los machos generalmente presentan una mayor habilidad (Beatty, 1979; Tees et al., 1999), como por ejemplo en el laberinto radial de 17 brazos, donde los machos cometieron menos errores que las hembras, aunque las ratas de ambos sexos que habían recibido EA por 30 días cometieron menos errores que las ratas aisladas (Seymour et al., 1996), aunque no todos los estudios reportan diferencias de sexo en la ejecución de tareas espaciales (Juraska, 1984).

1.5. Planteamiento y objetivos específicos

Resumiendo lo expuesto en las secciones anteriores, los efectos del EA en aprendizaje y memoria parecen ser bastante consistentes. El EA ejerce un papel beneficioso ya que mejora el aprendizaje de tareas complejas que implican aprendizaje espacial. En cambio, el papel del enriquecimiento en reactividad emocional, aunque en general apunta a una disminución, no está tan ampliamente descrito y aparecen ciertas inconsistencias. Como hemos comentado, el enriquecimiento tiene un efecto facilitador de los mecanismos de memoria, no obstante nada se sabe de los efectos del EA en parámetros de memoria social, aún cuando el factor de crianza social está directamente relacionado con los efectos beneficiosos descrito de este tratamiento. Son muy pocos los estudios que han tratado de investigar los efectos del enriquecimiento en machos y hembras en un mismo experimento, y normalmente se han centrado en pocas medidas; en este estudio pretendemos realizar una batería de pruebas con el fin de tener una visión de conjunto sobre varios aspectos de comportamiento en función del tratamiento de EA en machos y hembras.

Los objetivos específicos del presente estudio son los siguientes:

- i) Estudiar los efectos del EA en conducta exploratoria y emotiva de machos y hembras mediante diversas pruebas que presentan un componente de ansiedad como la tabla de agujeros, el laberinto elevado en cruz y la respuesta de sobresalto ante un estímulo acústico y en la respuesta del eje HPA.
- ii) Estudiar los efectos del EA en memoria sensorial mediante la prueba de Discriminación Social.
- iii) Estudiar los efectos del EA en el filtraje sensoriomotor y procesos atencionales mediante el paradigma de la inhibición prepulso.
- iv) Estudiar los efectos del EA en aprendizaje y memoria espacial mediante el Laberinto Hebb-Williams.
- v) Estudiar si se producen efectos de interacción entre el tratamiento de EA y el sexo del animal en cada una de las pruebas utilizadas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Sujetos

Se utilizaron ratas Spague-Dawley de ambos sexos procedentes del estabulario general de la Universidad Autónoma de Barcelona, lugar donde se realizaron todos los experimentos de conducta. Los animales se destetaron a los 21 días, el día 23 fueron pesados y distribuidos en los diferentes grupos experimentales. Las ratas destinadas al tratamiento de Enriquecimiento Ambiental (EA) se colocaron en grupos de 11-12 machos o 11-14 hembras en jaulas de enriquecimiento (100 x 43 x 50 cm.), mientras que las destinadas a los grupos control se distribuyeron en grupos de 2 machos o 2-3 hembras en jaulas de macrolon estándar (50 x 25 x 14 cm.). Los animales en las jaulas de enriquecimiento no fueron manipulados hasta la finalización del tratamiento. Las ratas control permanecieron en jaulas estándar durante este periodo y fueron manipuladas una vez por semana para la limpieza de las jaulas. Al finalizar el periodo de EA todos los animales fueron redistribuidos por parejas que habían recibido el mismo tratamiento y colocados en jaulas estándar. Las condiciones ambientales de estabulación de los animales eran de un ciclo de

luz-oscuridad de 12 horas con comienzo de la luz a las 08:00h. La temperatura se mantenía constante a $22\pm 2^\circ$ C y la comida y el agua se administraron *ad libitum*, excepto durante la realización del laberinto Hebb-Williams. Todas las pruebas se realizaron durante la fase de luz del ciclo. Los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona.

2.2. Procedimiento general

2.2.1. Enriquecimiento ambiental (EA)

Para el tratamiento de enriquecimiento ambiental se utilizaron jaulas de acero inoxidable con una base de 100 x 43 cm. y una altura de 50 cm. La organización espacial interior de estas jaulas se modificaba una vez a la semana creando diferentes estructuras por medio de túneles, rampas, ruedas de actividad, cuerdas, puentes, tablas de madera, etc. Además se introducían diversos objetos que se cambiaban cada dos días, como pelotas, pequeños muñecos, objetos de plástico, metal, madera, papel, tela, etc. con variedad de formas, colores y texturas.

Los animales tenían acceso ilimitado al agua y la comida durante todo el periodo de enriquecimiento, que en el Estudio I fue de 8 semanas y en el Estudio II de 12. El agua se suministraba a través de unos biberones colocados en la parte interna de las jaulas. Los contenedores y la localización de la comida variaba semanalmente, se colocaba en comederos suspendidos de las paredes, en el interior de recipientes cerrados que los animales debían abrir, en la parte más alta de la jaula. La viruta de las jaulas se cambiaba dos veces por semana mediante unos contenedores extraíbles situados a 2 cm. por debajo de la base enrejada.

2.2.2. Pruebas

2.2.2.1. Pruebas de Conducta

2.2.2.1.1. Pruebas de exploración y discriminación social

Se utilizó una caja de madera (60 x 40 x 40 cm.) de color gris claro. Consistió en 2 ensayos de 5 minutos separados por un intervalo inter-ensayos (ITI) de 30 minutos (Experimentos 1, 2 y 7) o de 15 minutos (Experimento 8). En el primer ensayo (T1) se colocaba la rata adulta en la caja junto con otra rata juvenil macho (Experimentos 1,7 y 8) o hembra (Experimento 2) de 25 días de edad (juvenil A) y se registraba el tiempo de interacción de la rata adulta hacia el juvenil. En el segundo ensayo (T2) se colocaron dos ratas juveniles en la caja: la

misma que la del ensayo anterior (juvenil A) y otra distinta del mismo sexo (juvenil B), se registraba entonces el tiempo de interacción de la rata adulta con los sujetos A y B. Las conductas de interacción que se evaluaron fueron las de estar colocado a menos de 1cm. de la otra rata y oler, seguir, inspeccionar alguna parte de su superficie corporal o tener un contacto directo con ella. Asimismo, también se registraron las interacciones sociales entre los pares de juveniles. Los animales fueron estabulados individualmente 3 días antes del inicio de la prueba y el día antes se les hizo una sesión de habituación al aparato de 5 minutos. Los juveniles fueron estabulados en grupos de 3 y se les condujo individualmente a la sala experimental 20 minutos antes del inicio de la sesión para su marcaje (fueron marcados en la cabeza o en la cola con rotuladores de diferente color) y habituación. Los juveniles permanecieron en la sala experimental durante toda la sesión, mientras que los animales adultos fueron transportados a la sala de experimentación durante el ITI.

2.2.2.1.2. Laberinto elevado en cruz

El aparato tiene forma de cruz, y consiste en 2 brazos abiertos de 50 x 10 cm. (sin paredes), y 2 brazos cerrados de 50 x 10 x 40 cm. situados de forma alternada y con un cuadrado abierto en el centro de 10 x 10 cm. El laberinto es de madera, pintado de negro y elevado 50cm. del suelo. Se colocó al animal en el centro del laberinto de cara a los brazos abiertos y durante 5 minutos se midió el número de entradas, el tiempo de permanencia y la distancia recorrida en cada brazo. Como criterio se consideró que la entrada a cada brazo se debía producir con las cuatro patas. Se interpreta que la conducta en los brazos abiertos es indicativa del nivel de ansiedad, por tanto, animales menos ansiosos mostrarían un incremento en el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos en comparación con animales más ansiosos.

2.2.2.2.3. Tabla de agujeros

La tabla de agujeros era una caja blanca de madera (66 x 66 x 47cm.) con cuatro agujeros equidistantes de 3.7 cm. de diámetro en el suelo, el cual estaba dividido en 16 cuadrados iguales con líneas rojas. Debajo de los cuatro agujeros se habían colocado objetos nuevos para los animales (tierra de diferentes colores y cubos de plástico), con el objetivo de estimular la exploración de los animales. En un ensayo de 5 minutos se midieron: el número de exploraciones (número de veces que el animal introducía la cabeza en los agujeros), el tiempo que exploraba cada agujero, las defecaciones, las conductas de

acicalamiento y la actividad general en el aparato (número de ambulaciones y de incorporaciones).

2.2.2.2.4. Prueba de respuesta de sobresalto e inhibición prepulso

El aparato donde se llevó a cabo la prueba de sobresalto o “startle” consistió en una caja de plexiglas (28 x 15 x 17 cm.) con una plataforma con sensor en su base, de manera que si el animal se movía hacia arriba o abajo se detectaba la diferencia en la fuerza ejercida sobre la plataforma. El valor máximo de esta fuerza de transición es la medida de la amplitud de la respuesta de sobresalto. Los movimientos de sobresalto de la rata son transducidos por un acelerómetro (Cibertec S.A, Madrid) y la señal es recogida y digitalizada por un microcomputador que también se utiliza para presentar el estímulo y la obtención de los datos. Nuestro aparato estaba situado en una cámara insonorizada (90 x 55 x 60 cm.) constantemente iluminada (lámpara de 10w.) y equipada con un altavoz localizado en el techo del aparato que produce un sonido constante de 45 dB como ruido de fondo. Dos altavoces de 28 cm. localizados a 15 cm. de los dos lados de la caja de plexiglas producen los estímulos acústicos. Estos altavoces están conectados a un amplificador que a su vez se conecta a un generador de ruido que administra el estímulo de sobresalto y a un segundo generador de ruido que produce la señal correspondiente al prepulso.

El estímulo acústico de sobresalto es un tono de 40 ms. de duración y 100 dB de intensidad. Los estímulos prepulso son un tono de 20 ms. de duración y una intensidad de 60, 70 o 80 dB, presentados 100 ms. antes del estímulo startle.

Las ratas eran colocadas en el aparato y tras 5 minutos de habituación se presentaban 12 estímulos de sobresalto aislados. Según algunos autores, estos ensayos pueden producir cierta habituación, reducir la variabilidad y pueden estabilizar la línea base de la amplitud de la respuesta de sobresalto. Treinta segundos después de la última presentación de los estímulos de sobresalto iniciales, se administraban 48 ensayos para el estudio de la inhibición prepulso. Estos ensayos eran de la siguiente manera: 48 estímulos de sobresalto, consistiendo en 12 estímulos de sobresalto aislados (‘pulso’) de 100 dB, 12 estímulos ‘pulso’ precedidos de un estímulo prepulso de 60 dB, 12 estímulos ‘pulso’ precedidos de un estímulo prepulso de 70 dB y 12 estímulos ‘pulso’ precedidos de un estímulo prepulso de 80 dB. Los estímulos de sobresalto fueron presentados según un intervalo variable de 20 a 40s. y la ocurrencia de cada tipo de presentación fue aleatorizada, con la restricción de que

cada tipo de ensayo ocurría en bloques de 4 presentaciones. La sesión duraba aproximadamente 50 minutos.

La amplitud de la respuesta de sobresalto se definió como la diferencia entre la fuerza detectada durante un periodo ventana de 5s. previo a la presentación del estímulo de sobresalto y el pico máximo de respuesta detectado inmediatamente después de la presentación del estímulo de sobresalto medido durante 200 ms.

Analizamos la amplitud de la respuesta de sobresalto en las 12 primeras presentaciones (medida basal de respuesta de sobresalto), y la inhibición de la respuesta de sobresalto, calculada como el porcentaje de disminución en la amplitud de la respuesta de sobresalto en los ensayos con prepulso mediante la siguiente fórmula: $[100 - (\text{media de la amplitud de la respuesta de sobresalto en las presentaciones prepulso} + \text{pulso} / \text{media de la amplitud de la respuesta de sobresalto en las presentaciones pulso aisladas}) \times 100]$. Un alto porcentaje de PPI (inhibición del prepulso) reflejará por tanto una alta eficacia de los mecanismos de filtraje sensorial.

2.2.2.2.5. *Laberinto Hebb-Williams*

El aparato consistía en una superficie cuadrada (75 x 75cm.) de madera pintada de negro, con paredes de 12 cm. de alto y cubierta con una tapa transparente de metacrilato dividida en 36 cuadrados separados por ranuras que permitían al experimentador definir las zonas de error y configurar los diferentes problemas diarios mediante el uso de paredes extraíbles. En el centro de cada cuadrado había un pequeño agujero (0.5 cm de diámetro) para facilitar la entrada de aire y la ventilación del aparato. Los compartimentos de entrada y de meta (40 x 15 x 12 cm.) estaban situados en esquinas diagonalmente opuestas y contenían puertas correderas del tipo guillotina. Antes y durante el entrenamiento la rata fue privada de comida hasta el 85% del peso y fue mantenida en este nivel durante todo el experimento. Los animales fueron habituados a comer las bolitas de comida (45mg pellets; Bio-serv, Frenchtown, NJ, USA) utilizadas como reforzador al llegar a la meta durante el proceso previo de privación de comida.

Inicialmente las ratas fueron habituadas al aparato en sesiones de 5 minutos durante 5 días consecutivos. En estas sesiones se permitía explorar el laberinto sin barreras y comer en el compartimiento de meta. A partir del sexto día empezaron las sesiones de entrenamiento donde la rata tenía que superar una serie de problemas simples (Figura 1). Cada rata recibía 6 ensayos al día, y en cada ensayo se colocaba al animal en el compartimiento de entrada y

debía llegar hasta la meta donde podía comer durante 10s. La latencia máxima permitida en cada ensayo era de 60 segundos, al cabo de este tiempo el animal era colocado en el compartimento de meta por el experimentador. El entrenamiento continuó hasta un máximo de 15 días (sesiones diarias, 5 días a la semana) con el fin de acostumbrar a la rata a la presencia de barreras en el aparato y establecer el hábito de ir hacia la meta utilizando la mínima conducta exploratoria. El criterio para avanzar a la fase de problemas fue realizar los 6 ensayos de entrenamiento en un total de 90 s. durante dos días consecutivos. Si este criterio no se conseguía en un máximo de 15 días la rata era excluida del experimento. Tras el periodo de entrenamiento las ratas que cumplieron el criterio fueron testadas utilizando la serie estándar de 12 problemas definida por Rabinovich y Rosvold (1951). Se realizó un problema al día con 6 ensayos consecutivos por problema. Se registró el número de entradas en las zonas de error, la latencia de entrada en el compartimento de meta y la distancia recorrida en cada ensayo. Un error era contabilizado cuando las dos patas delanteras del animal cruzaban la línea indicativa de zona de error.

2.2.2.2. Respuesta del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA)

2.2.2.2.1. Muestras de sangre

Tras la prueba de la tabla de agujeros los animales fueron trasladados inmediatamente a la zona de estabulación y diez minutos después se tomaron muestras de sangre (en otra habitación distinta) con el fin de estudiar la respuesta del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) a un ambiente nuevo. Con el fin de prever posibles interferencias con las respuestas conductuales y hormonales las muestras de sangre en condiciones basales fueron obtenidas 4 días más tarde, por la mañana (entre las 9:00-10:00 horas) y por la tarde (entre las 17:00-18:00 horas).

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante una técnica de incisión en la cola, consistente en realizar un pequeño corte de unos 2mm de profundidad en una vena de la parte distal de la cola del animal y realizar un suave masaje en la cola recogiendo hasta un máximo de 300 µl de sangre en un capilar con EDTA. Esta técnica permite la extracción de muestras repetidas sin necesidad de realizar más de una incisión. Una vez extraída la sangre, los capilares se mantenían a 4°C hasta el momento de obtención del plasma por centrifugado (7000 rpm, 25 min, 4°C); posteriormente, el plasma era alicuoteado y conservado a -30°C hasta el momento del análisis.

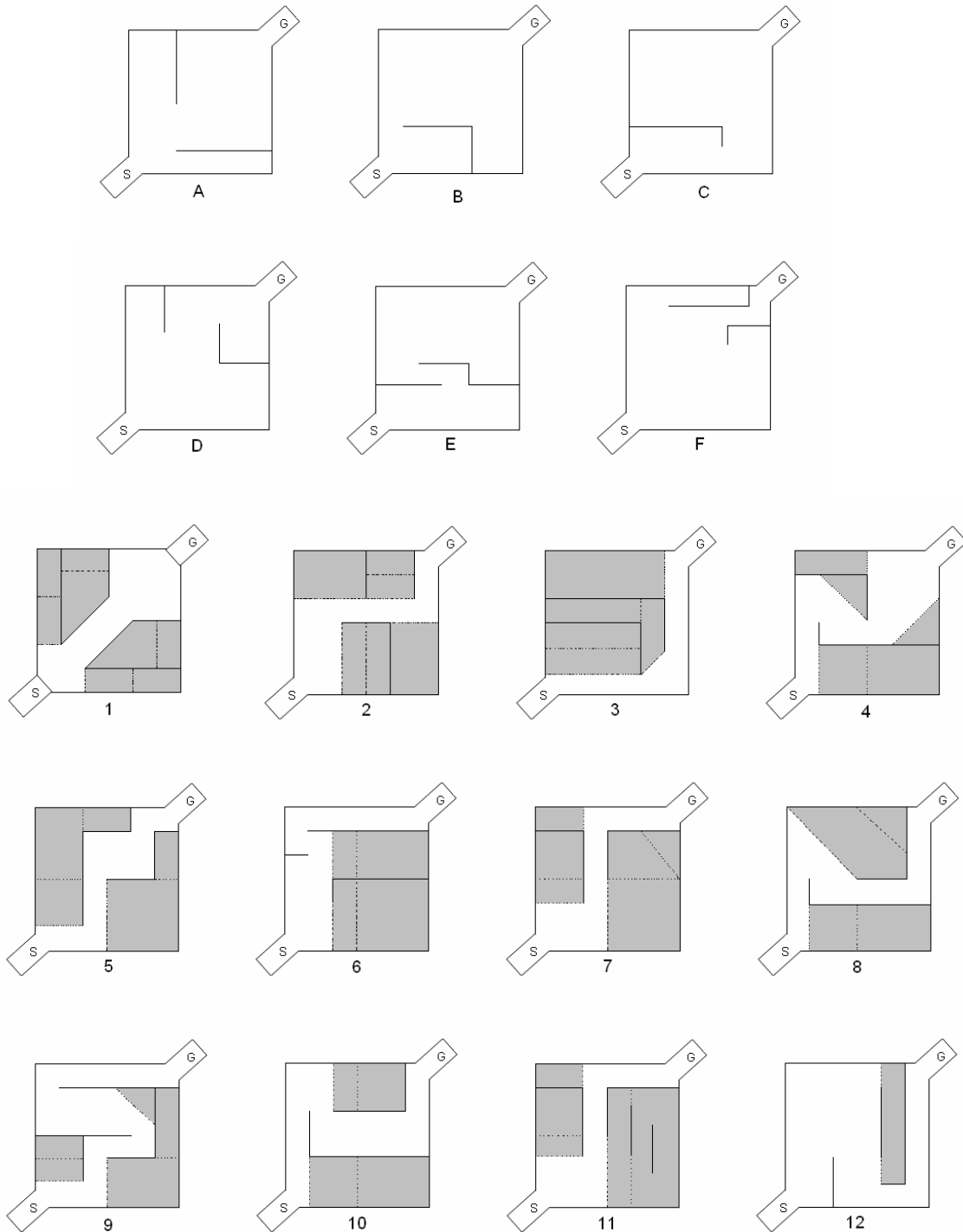


Figura 1. Se muestran las diferentes configuraciones del laberinto utilizadas durante las sesiones de entrenamiento (A-F) y de prueba (1-12) y las zonas de error en el laberinto Hebb-Williams. Las paredes se representan por líneas continuas, las áreas sombreadas indican las zonas de error y las líneas discontinuas indican los bordes de las zonas de error. S: compartimento de salida, G: compartimento de meta.

2.2.2.2.2. Análisis bioquímicos

- *Radio-inmuno-análisis (RIA) de ACTH*

Para determinar la concentración de ACTH en plasma se realizó un RIA de doble anticuerpo en no equilibrio siguiendo el protocolo descrito previamente por el Dr. W. C. Engeland (comunicación personal: Department of Surgery, University of Minnesota, USA) modificado en nuestro laboratorio (García et al., 2000). Se utilizó un tampón fosfato disódico 50 mM, pH 7.4, que contenía EDTA disódico 25 mM, Triton X-100 al 0.1% y albúmina de huevo al 0.25%. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de la ACTH. Se utilizó ACTH₁₋₃₉ de rata (Sigma) como estándar, 3-[¹²⁵I] iodotirosil23-ACTH₁₋₃₉ (actividad específica de 2000 Ci/mmol, Amersham) como marcador y un anticuerpo contra la ACTH de rata (AB Rb 7) generosamente suministrado por el Dr. W. C. Engeland. La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo (donkey anti-rabbit IgG, Chemicon, dilución 1:24), que contenía serum normal de conejo (NSR) al 1.2%. La radioactividad del precipitado se midió con un contador gamma (Wallac 1272 Clinigamma) y los cálculos para determinar la concentración de ACTH se realizaron mediante una transformación log-logit.

- *Radio-inmuno-análisis (RIA) de corticosterona*

Para determinar la concentración de corticosterona en plasma se utilizó el protocolo de RIA en equilibrio, sugerido por el Dr. G. Makara (Institute Exp Med, Budapest, Hungría). Se utilizó un tampón fosfato 0.2M, pH 7.3, que contenía ácido cítrico 0.01M, preparado con agua apirógena. Las muestras se incubaron durante 1h con ácido cítrico 0.1M (pH 2) para desnaturalizar la transcortina (CBG). Se utilizó estándar de corticosterona (Merk), ¹²⁵I-corticosterona (actividad específica de 1500-200 Ci/mg, ICN) como marcador y un anticuerpo contra corticosterona amablemente cedido por el Dr G. Makara. Después de una incubación de 18-24 h a 4°C, se separó la fracción libre de la hormona con una dilución 1:19 de segundo anticuerpo (donkey anti-rabbit IgG, Chemicon) con un tampón de polietilenglicol 6000 (Fluka). La radioactividad del precipitado se midió con un contador gamma (Wallac 1272 Clinigamma) y los cálculos para determinar la concentración de corticosterona se realizaron mediante una transformación log-logit.

2.3. Secuencia experimental

Para la consecución de los objetivos previstos en este primer bloque experimental realizamos dos estudios consecutivos. En la Tabla 1 se muestra la secuencia experimental seguida en cada uno de los estudios.

ESTUDIO I. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad e interacción y memoria social

El Estudio I evaluó la interacción y memoria social de los animales mediante la prueba de la Discriminación social. También se evaluó la conducta emocional mediante el Laberinto Elevado en Cruz.

Se utilizaron 44 animales distribuidos en los grupos experimentales: Control Macho (CM, n=12), Control Hembra (CF, n=11), Enriquecido Macho (EM, n=12), y Enriquecido Hembra (EF, n=9).

ESTUDIO II. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad, respuesta del eje HPA, conducta exploratoria, interacción social, filtros sensoriomotores y aprendizaje

El estudio II también evaluó memoria social y ansiedad con las pruebas anteriormente mencionadas, con el fin de replicar los resultados obtenidos en el primer estudio. Para obtener más información sobre el papel del EA en la reactividad emocional también analizamos los niveles plasmáticos de CORT y ACTH en condiciones basales y después de la tabla de agujeros, que también se utilizó para estudiar la actividad exploratoria de los animales.

La respuesta de sobresalto ante un estímulo acústico de alta intensidad nos aportó más datos sobre reactividad emocional y sobre mecanismos de aprendizaje básicos al analizar la posible habituación ante la presentación repetida de los estímulos, en esta prueba también pudimos estudiar parámetros de atención y de filtraje sensoriomotor mediante la inhibición prepulso. Los efectos del EA en procesos de aprendizaje complejo se evaluaron mediante la ejecución de los animales en el laberinto Hebb-Williams.

En este estudio utilizamos 52 ratas distribuidas entre los grupos: CM (n=12), CF (n=14), EM (n=12) y EF(n=14).

Todos los experimentos del Estudio I y II se realizaron en una habitación completamente pintada de negro con iluminación difusa, excepto en los experimentos de respuesta de sobresalto, donde la habitación permanecía a oscuras. Los procedimientos de la tabla de agujeros, el laberinto elevado en cruz, pruebas de discriminación social y el laberinto Hebb-Williams fueron grabados y analizados posteriormente mediante el programa SMART (versión 2.0.14, Panlab, Barcelona, Spain). Tras cada prueba los aparatos se limpiaban con una solución de etanol al 20%. Todos los animales fueron pesados en el momento del destete, al acabar el EA y justo antes de realizar cada una de las pruebas. Ello nos permitió estudiar posibles efectos diferenciales del tratamiento en el peso de los animales en diferentes momentos del desarrollo.

2.4. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS (versión 14.0). Los resultados se analizaron mediante un diseño factorial de dos factores, con dos niveles en cada factor: Sexo (macho vs hembra) y Tratamiento (control vs enriquecimiento). Los descriptivos se muestran como media \pm error estándar (SEM).

Los datos de peso, los niveles de ACTH y CORT y los resultados de los experimentos en la tabla de agujeros y el laberinto elevado en cruz se analizaron con el análisis de la variancia de dos factores (ANOVA de dos factores: 'tratamiento' y 'sexo').

Los resultados de los experimentos de discriminación social del Estudio I se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas, con dos factores intersujetos ('tratamiento' y 'sexo adulto') y dos factores intrasujetos ['sexo juvenil' y 'tipo juvenil' (nuevo o conocido en T2)]. También se utilizó un ANOVA de medidas repetidas para el análisis minuto a minuto del número de exploraciones y tiempo de exploración en la tabla de agujeros, con dos factores intersujetos ('tratamiento' y 'sexo') y un factor intrasujetos ('minuto'). Los resultados de los experimentos de discriminación social del Estudio II se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas, con dos factores intersujetos ('tratamiento' y 'sexo') y un factor intrasujetos ('tipo juvenil' (nuevo o conocido en T2)), para los dos experimentos por separado (DS30' y DS15'). La conducta exploratoria durante el primer ensayo fue analizada mediante ANOVAs de dos factores ('tratamiento' y 'sexo').

Tabla 1. Secuencia experimental. Se muestran los procedimientos de los Estudios I y II, la duración del tratamiento de enriquecimiento ambiental, la edad de los sujetos durante las pruebas de conducta y el número asignado a los experimentos.

Procedimiento	Semanas	Experimento
ESTUDIO I		
Destete	3	
Enriquecimiento Ambiental (EA)	4-12	
Aislamiento	14	
-Discriminación Social 30' con juveniles macho (DS I)	15	1
-Discriminación Social 30' con juveniles hembra (DS II)	16	2
-Laberinto elevado en cruz (EPM)	25	3
ESTUDIO II		
Destete	3	
Enriquecimiento Ambiental	4-16	
-Tabla de agujeros y muestras de sangre	20	4
-Laberinto Elevado en cruz	21	5
-Respuesta de Sobresalto e inhibición del pre-pulso (Startle)	26	6
Aislamiento	26	
-Discriminación Social 30' (DS30)	27	7
-Discriminación Social 15' (DS15)	28	8
-Laberinto Hebb-Williams	60	9

En el experimento de la respuesta de sobresalto durante los 12 ensayos se utilizó un análisis de medidas repetidas con covariable (peso), 'tratamiento' y 'sexo' como factores intersujetos, y 'ensayo' como factor intrasujetos. Para el análisis de la inhibición prepulso, se utilizó el 'porcentaje de inhibición' (ante los prepulsos de 60dB, 70dB y 80dB) como factor intrasujetos.

En el experimento de Hebb-Williams, también se realizó un ANOVA de medidas repetidas: factores intersujetos: 'tratamiento' y 'sexo' y con 'problema' como factor intrasujetos, para

calcular el número acumulado de errores, latencias de llegada y distancia recorrida en los ensayos 1-6 de cada problema. El número total de errores en cada problema por cada tratamiento y sexo fue utilizado para clasificar los problemas en tres categorías: fáciles, intermedios y difíciles. El número total de errores, la latencia total y la distancia total recorrida para cada nivel de dificultad fue promediado por el número de problemas que forman cada categoría y un ANOVA de medidas repetidas: factores intersujetos ‘tratamiento’ y ‘sexo’, y con ‘nivel de dificultad’ como factor intrasujetos. La ejecución en cada uno de los ensayos en cada nivel de dificultad también fue analizado con ANOVA de medidas repetidas: ‘tratamiento’ y ‘sexo’ como factores intersujetos y ‘ensayo’ y ‘nivel de dificultad’ como factores intrasujetos. En número total de errores, la distancia recorrida y latencias en los problemas fáciles, intermedios y difíciles también se calculó una media teniendo en cuenta el número de problemas incluido en cada categoría.

Posteriormente se realizó la descomposición de la interacción para los estadísticos de medidas repetidas, y se realizaron también comparaciones entre grupos con la prueba post-hoc de Student-Neuman-Keuls (SNK). Se requirió un nivel de significación $p < 0.05$ para considerar los resultados estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO I. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad e interacción y memoria social

3.1.1. Pesos

En la Tabla 2 están representados los pesos a lo largo de la secuencia experimental seguida en el Estudio I y los efectos significativos de los factores sexo y tratamiento así como de la interacción que mostró el Análisis de la Varianza (ANOVA). Se muestran los grados de libertad entre paréntesis, los valores de las F y las significaciones. Se observó un efecto global de disminución del peso de los animales a causa del EA en machos y hembras en todos los experimentos. Encontramos también una interacción significativa al finalizar el tratamiento de EA, a las 12 semanas de edad (ANOVA, efecto ‘sexo’x ‘tratamiento’: $F_{(1,43)}=4.574$, $p < 0.05$). Tras finalizar el tratamiento de EA los machos enriquecidos mostraban un peso correspondiente al 84% del peso de los machos del grupo control y las hembras enriquecidas pesaban un 87% del peso correspondiente a las hembras del grupo control; la interacción significativa indica que en términos de peso el EA ha afectado

significativamente más a los machos que a las hembras. Estas desproporciones en los pesos de los animales enriquecidos van disminuyendo a lo largo de la secuencia experimental y se van igualando entre los dos sexos, hasta llegar a valores de 93% en los machos y 92% en las hembras en el experimento 3.

Tabla 2. Se muestran las medias \pm EE de los pesos de cada grupo a lo largo de toda la secuencia experimental durante el Estudio I. **a** $p < 0.05$ respecto a los animales control del mismo sexo, **b** $p < 0.05$ respecto a los animales macho y mismo tratamiento (pruebas Student-Newman-Keuls).

ESTUDIO I					
Grupos	Destete	EA	Exp1	Exp2	Exp3
CM	78.05 \pm 2.1	464.23 \pm 9.9	494.98 \pm 12.3	508.42 \pm 11.2	573.51 \pm 15.2
EM	76.33 \pm 3.2	390.0 \pm 11.3 a	433 \pm 13.6 a	454.5 \pm 12.4 a	536.3 \pm 14.1 a
CF	71.52 \pm 2.8	276.4 \pm 4.6 b	284.6 \pm 5.8 b	294.4 \pm 6.1 b	313.3 \pm 3.9 b
EF	69.57 \pm 4.4	240.7 \pm 6.4 a b	254.6 \pm 6.2 a b	261.3 \pm 7 a b	287.03 \pm 6 b
Sexo	F(1,43)=4.43 P<0.05	F(1,43)=349.4 P<0.0001	F(1,39)=363.27 P<0.0001	F(1,41)=425.81 P<0.0001	F(1,43)=456.69 P<0.0001
Tratamiento	n.s	F(1,43)=37.18 P<0.0001	F(1,39)=20.33 P<0.0001	F(1,41)=19.405 P<0.0001	F(1,43)=7.11 P<0.05
Interacción	n.s	F(1,43)=4.574 P<0.05	n.s	n.s	n.s

3.1.2. Pruebas de Discriminación Social (DS).

En las pruebas de discriminación social los machos adultos dedicaron más tiempo a investigar a los juveniles durante el primer ensayo (T1) que las hembras adultas (ANOVA con medidas repetidas, efecto ‘sexo adulto’: $F_{(1,36)}=23.42$, $p < 0.001$), siendo esta diferencia dependiente del sexo del juvenil (ANOVA, ‘sexo juvenil’ x ‘sexo adulto’: $F_{(1,36)}=5.45$, $p < 0.05$). La descomposición de la interacción mostró que estas diferencias sexuales fueron más marcadas cuando los adultos exploraron a las hembras juveniles ($p < 0.001$) en comparación con los machos juveniles ($p < 0.01$, figuras 1A y 1B). Además, los machos adultos realizaron tiempos de exploración similares hacia juveniles macho y hembra en el ensayo 1, mientras que las hembras adultas mostraron niveles de exploración más reducidos hacia las hembras juveniles en comparación con la exploración dirigida hacia los juveniles macho ($p < 0.05$).

En el segundo ensayo (T2), todos los grupos fueron capaces de discriminar entre el juvenil conocido y el nuevo. En todos los grupos los animales recordaron al animal previamente presentado y este dato se expresó por los mayores tiempos de investigación dirigidos hacia el juvenil nuevo en comparación al conocido (ANOVA, 'tipo de juvenil': $F_{(1,36)}=33.17$, $p<0.001$, figuras 1A y 1B). De nuevo, durante el T2 los machos adultos volvieron a presentar tiempos de exploración mayores hacia los juveniles comparados con las hembras adultas (ANOVA, 'sexo adulto': $F_{(1,36)}=5.77$, $p<0.05$), y este patrón se acentuó cuando se utilizaron juveniles hembra como estímulos sociales (ANOVA, 'sexo juvenil' x 'sexo adulto': $F_{(1,36)}=9.67$, $p<0.01$). La descomposición de la interacción mostró que los machos adultos exploraban durante más tiempo a las hembras juveniles que a los machos juveniles ($p<0.001$), mientras que las hembras adultas mostraron niveles similares de exploración hacia los juveniles de ambos sexos. Las interacciones sociales entre los pares de juveniles fueron medidas (en segundos) pero no se encontraron diferencias entre los grupos: Experimento 1 (con juveniles macho): $CM=44.03\pm 3.54$, $CF=43.54\pm 4.65$, $EM=45.07\pm 6.10$, y $EF=45.37\pm 4.43$; Experimento 2 (con juveniles hembra): $CM=47.51\pm 5.95$, $CF=39.91\pm 3.23$, $EM=38.77\pm 4.06$, y $EF=36.72\pm 2.35$.

Sorprendentemente, el EA incrementó los tiempos de exploración hacia los juveniles en el segundo ensayo en los machos adultos pero no en las hembras, independientemente del tipo de juvenil (nuevo o conocido) o del sexo del juvenil (ANOVA, 'sexo adulto' x 'tratamiento': $F_{(1,36)}=5.77$, $p<0.05$). La descomposición de la interacción mostró que la diferencia en los tiempos de exploración social entre las ratas adultas macho y hembra fue más pronunciada en el grupo de animales enriquecidos (grupo control: $p<0.05$, grupo enriquecido: $p<0.001$). Además, el enriquecimiento ambiental aumentó la investigación social en machos pero no en hembras ($p<0.05$).

Aunque se ha observado que los machos adultos no reducen la exploración cuando son repetidamente expuestos a estímulos sociales distintos (Engelmann et al., 1995), comparamos el tiempo total de exploración en el primer y el segundo ensayos con el fin de descartar posibles efectos no específicos de supresión de la conducta exploratoria en machos y hembras. El ANOVA con medidas repetidas reveló un efecto significativo de interacción 'ensayo' x 'sexo adulto' x 'tratamiento': $F_{(1,36)}=8.35$, $p<0.01$, figura 1B. La descomposición de la interacción mostró que el grupo de machos enriquecidos fue el único que incrementó el tiempo total de investigación en el segundo ensayo comparado con el primero ($p<0.001$, figura 1C y 1D), mientras que no se observaron cambios en el resto de

los grupos. Por lo tanto, no se observó un efecto de habituación en la conducta de investigación social en ninguno de los grupos experimentales entre el T1 y el T2.

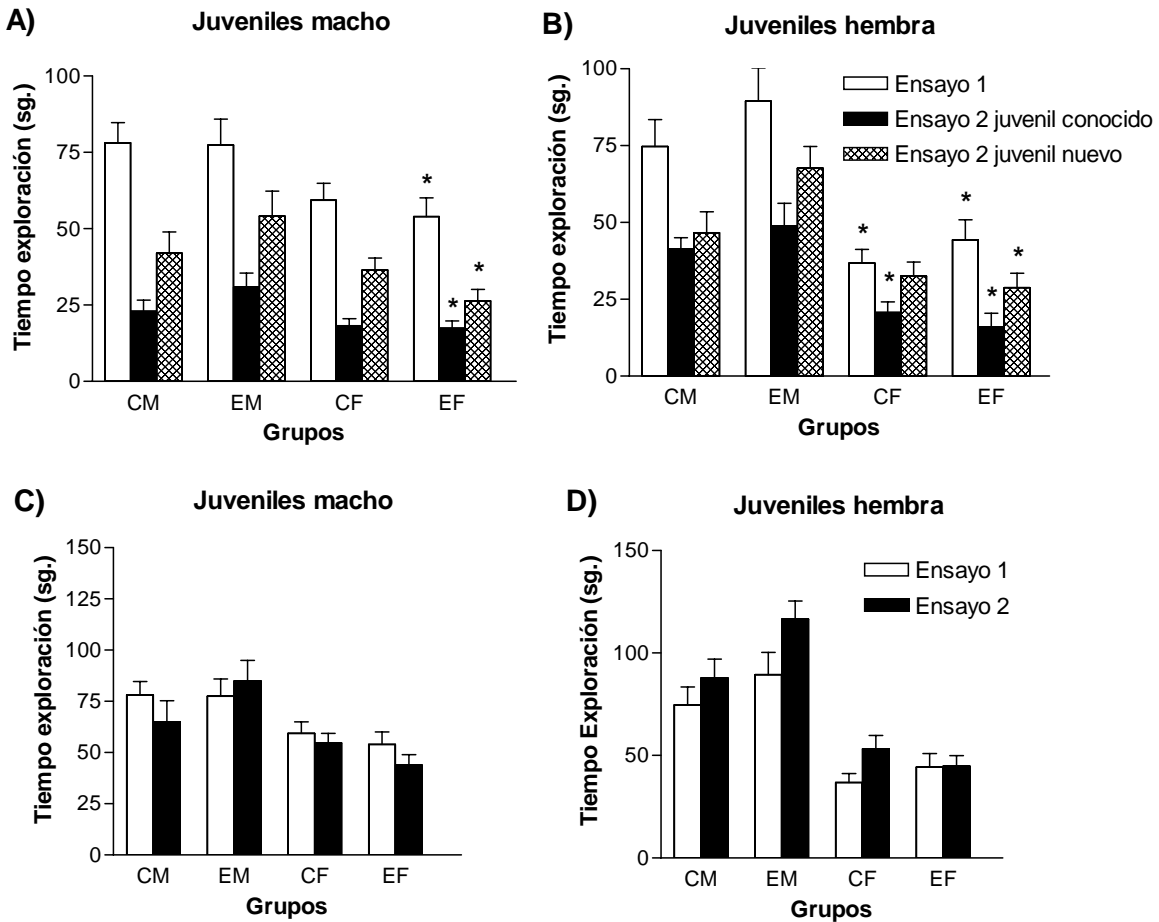


Figura 2. Se muestra la media \pm EE del tiempo de exploración de los animales en las pruebas de discriminación social con juveniles macho (A, C) y con juveniles hembra (B, D). En las figuras 1A y 1C se representan los tiempos de exploración durante el primer ensayo (barras blancas) y durante el segundo ensayo respecto al juvenil conocido (barras negras) y nuevo (barras ralladas). Las figuras 1C y 1D muestran el tiempo de investigación total durante el ensayo 1 (barras blancas) y el ensayo 2 (barras negras). * $P < 0.05$ respecto a los animales macho del mismo tratamiento.

3.1.3. Evaluación de la ansiedad: Laberinto Elevado en Cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz las hembras mostraron mayor actividad que los machos a nivel de las entradas totales y la distancia total recorrida en el laberinto (ANOVA, 'sexo': $F_{(1,42)}=5.287$, $p < 0.05$; $F_{(1,42)}=8.090$, $p < 0.05$, figura 3A y 3B, respectivamente). Los animales enriquecidos mostraron un porcentaje superior de entradas en los brazos abiertos [(número de entradas en los brazos abiertos / entradas totales en los

brazos) x 100] al de los animales control (ANOVA, ‘tratamiento’: $F_{(1,42)}=4.283$, $p<0.05$; ‘tratamiento x ‘sexo’: n.s, figura 3C), lo que sugiere que el tratamiento de EA disminuye la conducta ansiosa tanto en machos como en hembras. No observamos efectos significativos en las medidas de tiempo de permanencia en los brazos abiertos y en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos.

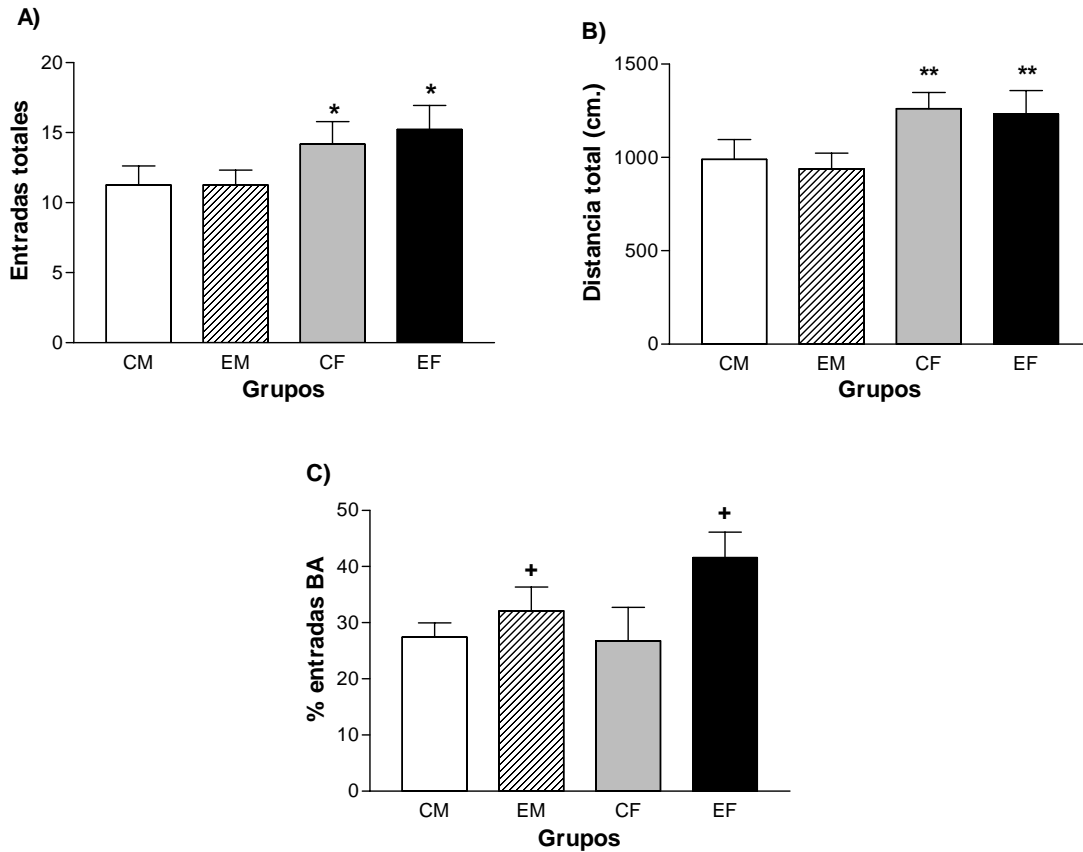


Figura 3. Efectos del EA en el laberinto elevado en cruz. (A) Las columnas representan la media \pm EE del número de entradas totales, (B) la distancia recorrida total, y (C) porcentaje de entradas en los brazos abiertos (BA) del laberinto. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, respecto a los animales macho del mismo tratamiento, + $P<0.05$ respecto al grupo control del mismo sexo.

3.2. ESTUDIO II. Estudio de los efectos del EA en pruebas de ansiedad, respuesta del eje HPA, conducta exploratoria, interacción social, filtros sensoriomotres y aprendizaje

3.2.1. Pesos

La tabla 3 muestra los pesos de los animales a lo largo de la secuencia experimental del estudio II. Los animales enriquecidos presentaron consistentemente un peso menor que los controles, siendo esta reducción más acusada en los machos, como se pone de manifiesto

por la interacción significativa ‘tratamiento’ x ‘sexo’ en el ANOVA a partir de la semana 16, que es cuando acaba el procedimiento de EA. El grupo de machos enriquecidos pesa mucho menos que el de machos control mientras que las diferencias de peso entre las hembras enriquecidas y control son más pequeñas que en los machos, obteniéndose este efecto de interacción incluso cuando los animales tienen 7 meses de edad (ANOVA, efecto ‘tratamiento’ x ‘sexo’: $F_{(1,50)}= 8.59, p<0.005$). Este efecto de interacción desaparece cuando los animales tienen 14 meses de edad, no obstante se sigue observando una tendencia a la interacción ‘tratamiento’ x ‘sexo’: $F_{(1,45)}=2.95, p=0.093$), mostrando que aunque estas diferencias de peso se atenúan con la edad de los animales, todavía sigue existiendo cierto efecto del enriquecimiento a largo plazo en esta medida fisiológica. Tras finalizar el tratamiento de EA los machos enriquecidos mostraban un peso correspondiente al 85% del peso de los machos del grupo control y las hembras enriquecidas pesaban un 88% del peso correspondiente a las hembras del grupo control; la interacción significativa indica que en términos de peso el EA ha afectado significativamente más a los machos que a las hembras, y a medida que pasa el tiempo estas diferencias se hacen más pronunciadas, ya que las hembras enriquecidas van igualando los valores a los de las control mientras que los machos continúan manteniendo estas diferencias hasta la semana 28, en la que realizaron el experimento de DS15’ y en el que los machos enriquecidos presentaron un peso correspondiente al 88% del peso de los machos del grupo control mientras que las hembras pesaban un 96% del peso de las hembras control.

Tabla 3. Se muestran las medias \pm EE de los pesos de cada grupo a lo largo de toda la secuencia experimental durante el Estudio II. **a** $p<0.05$ respecto a los animales control del mismo sexo, **b** $p<0.05$ respecto a los animales macho y mismo tratamiento (pruebas SNK).

Grupos	Destete	16 sem	20 sem HB	21 sem EPM	26 sem Startle	27 sem SD30'	28 sem SD15'	60 sem HW
CM	83.2 \pm 2.4	558.3 \pm 12.8	582.2 \pm 13.6	591.5 \pm 13.8	644.6 \pm 15.1	678.7 \pm 16.5	682.8 \pm 17.3	810.1 \pm 31.3
EM	79.0 \pm 2.5	475.8 \pm 7.1 a	508.4 \pm 8.8 a	517.5 \pm 10 a	561.9 \pm 12.3 a	598.1 \pm 12.4 a	599.3 \pm 13.6 a	728.8 \pm 17.2
CF	72.6 \pm 3.7 b	308.4 \pm 5.95 b	305 \pm 6.2 b	307.8 \pm 5.8 b	324.1 \pm 7.9 b	341.3 \pm 8.2 b	335.9 \pm 8 b	413 \pm 21 b
EF	69.9 \pm 2.4 b	270.1 \pm 6.2 a b	291.3 \pm 6 b	300.5 \pm 7.3 b	314.1 \pm 8 b	330.9 \pm 8.8 b	321.6 \pm 6.6 b	408.8 \pm 19.7 b
Sexo x Trat	n.s	F=7.199 P<0.05	F=11.55 P<0.01	F=12.634 P<0.01	F=11.11 P<0.01	F=9.13 P<0.01	F=8.59 P<0.01	F=2.95 P=0.093

3.2.2. Conducta exploratoria en la tabla de agujeros

El análisis de medidas repetidas, con dos factores intersujetos ('sexo' y 'tratamiento') y un factor intrasujetos ('tiempo' en minutos) reveló un efecto significativo 'tiempo' x 'tratamiento' en el número de exploraciones a través de los agujeros (head-dips) y en el tiempo de exploración ($F_{(4,172)}=3.05$, $p<0.05$, $F_{(4,172)}=4.17$, $p<0.01$, Figura 4A,B), indicando que los animales mostraron un patrón diferente en función del tratamiento recibido. La descomposición de las interacciones mostró diferencias significativas en los dos primeros minutos de la prueba (Figura 4). Los animales enriquecidos realizaron un mayor número de head-dips en el primer y segundo minuto ($p<0.001$, $p<0.05$, respectivamente). En cuanto al tiempo de exploración en los agujeros también fue superior en los animales enriquecidos tanto machos como hembras durante los dos primeros minutos comparados con sus respectivos grupos control ($p<0.001$). Los análisis mostraron que esta interacción significativa 'minuto' x 'tratamiento' fue específica de los primeros tres minutos de la prueba, debido a que aparecen cuando el ANOVA se aplica a los minutos 1-3 pero no cuando se aplica a los minutos 3-5. El tratamiento de enriquecimiento también incrementó el número de rearings ($F_{(1,46)}=9.41$, $p<0.01$, figura 4D), y también se hallaron efectos significativos del sexo en ambulaciones y rearings, donde las hembras mostraron una mayor ambulación ($F_{(1,46)}=12.34$, $p<0.001$, figura 4C) y un mayor número de rearings ($F_{(1,46)}=12.6$, $p<0.001$) que los machos. Efectos significativos del sexo también se encontraron en el número de defecaciones, siendo las ratas macho quienes mostraron mayores niveles ($F_{(1,46)}=6.48$, $p<0.05$, figura 4, figura 4E).

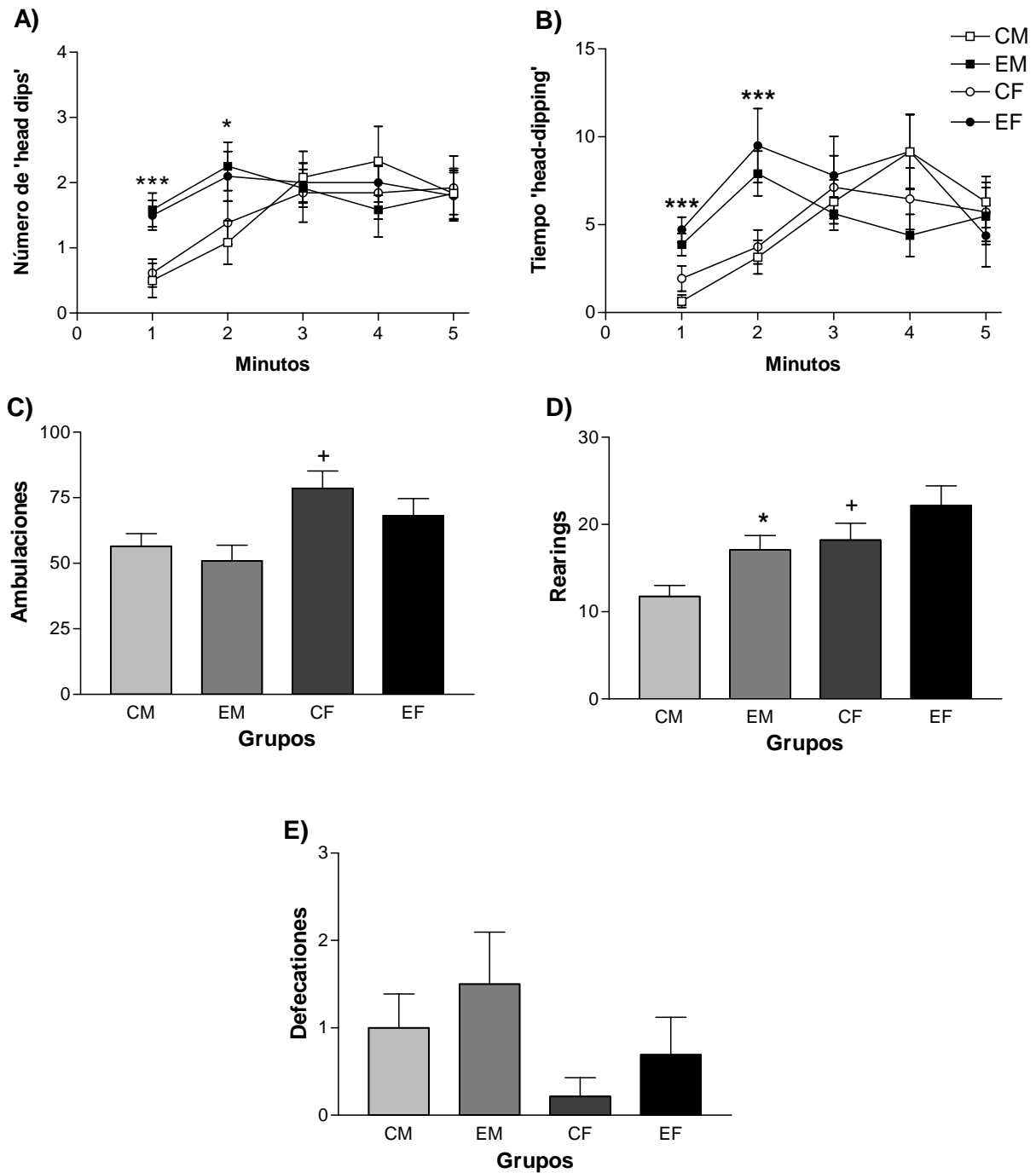


Figura 4. Se muestra la media \pm SE del número de head dips (A), el tiempo dedicado al head dipping (B), las ambulaciones (C), rearings (D) y defecaciones (E) en la Tabla de agujeros para los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto a los animales control del mismo sexo, + $p < 0.05$ respecto a los animales macho del mismo tratamiento.

3.2.3. Respuesta del eje HPA

En cuanto a las medidas hormonales analizadas tras la exposición de los animales en la tabla de agujeros, el ANOVA mostró efectos significativos del sexo, indicando niveles mayores de corticosterona en las hembras comparadas con los machos ($F_{(1,46)}=84.17$, $p<0.001$) y efectos significativos del tratamiento, siendo los animales enriquecidos los que presentaron una menor liberación de corticosterona ante la prueba (ANOVA, efecto tratamiento: $F_{(1,46)}=4.56$, $p<0.05$). Las hembras mostraron niveles superiores de ACTH en respuesta a la exposición de 5 minutos a la tabla de agujeros comparados con los machos (ANOVA, efecto sexo: $F_{(1,46)}=10.98$, $p<0.01$), pero no aparecieron diferencias significativas del tratamiento en esta medida.

Al analizar los niveles basales de corticosterona tomados en la mañana y la tarde, el análisis mixto de medidas repetidas encontró una interacción 'sesión' x 'sexo' ($F_{(1,43)}=47.078$, $p<0.001$) y una interacción 'sesión' x 'tratamiento' ($F_{(1,43)}=4.94$, $p<0.05$) significativas, además de un efecto global del factor 'sexo', de manera que las hembras presentaron mayores niveles basales en ambas medidas ($F_{(1,43)}=64.99$, $p<0.001$). La descomposición de las interacciones mostró niveles significativamente mayores en las hembras respecto a los machos en las dos medidas analizadas, siendo las hembras control las que presentaron la máxima diferencia durante la mañana ($P<0.001$) respecto a los machos control. El análisis de los niveles basales de ACTH en la mañana y la tarde indicó un efecto global de la sesión ($F_{(1,43)}=45.929$, $p<0.001$) que se observa por el aumento en los valores de ACTH que se producen durante la tarde, y apareció una tendencia a la interacción 'sesión' x 'tratamiento' ($F_{(1,43)}=3.22$, $p=0.08$). De nuevo un efecto global de 'sexo' indicó que las hembras presentaron los niveles más altos de concentración de hormonas en ambos momentos temporales ($F_{(1,43)}=8.64$, $p<0.05$).

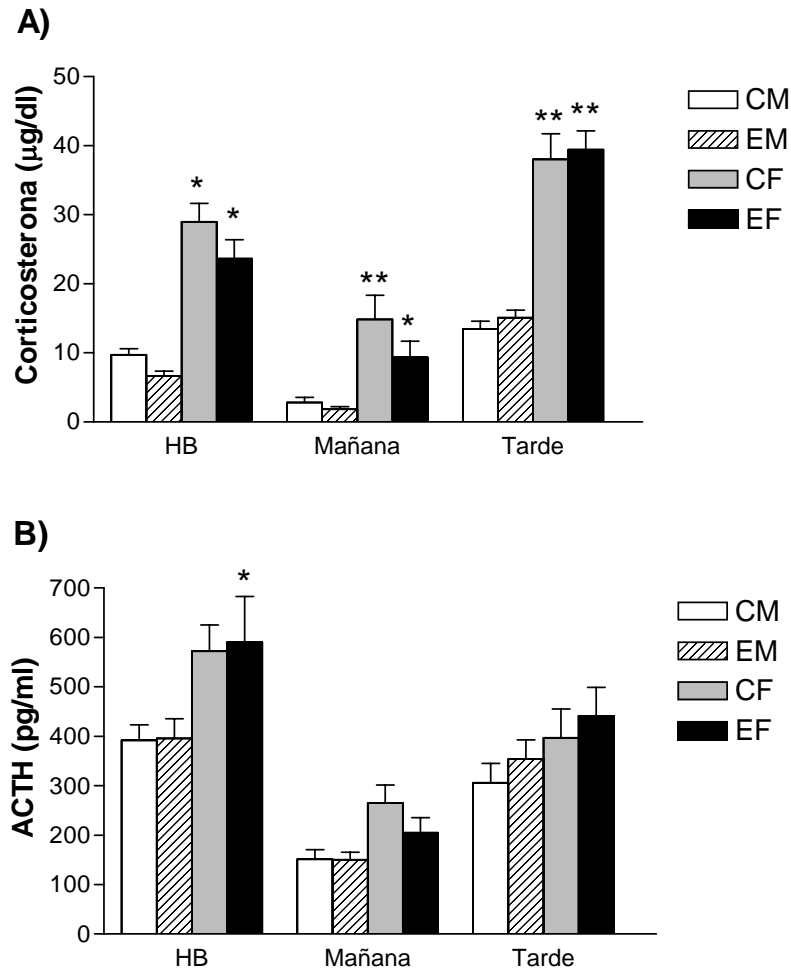


Figura 5. Se muestra la media \pm EE de los niveles de corticosterona (A) y ACTH (B) 5 minutos desde la prueba de la tabla de agujeros y los niveles basales durante la mañana (a las 10 h) y la tarde (a las 17 h) para los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, respecto a los animales macho del mismo tratamiento.

3.2.4. Conducta ansiosa en el laberinto elevado en cruz.

El ANOVA indicó efectos significativos del factor sexo (ver Tabla 4), de manera que las hembras mostraron más actividad motora que los machos en diversas variables como son la distancia recorrida en los brazos cerrados del laberinto ($F_{(1,51)}=5.61$, $p < 0.05$), el número de incorporaciones verticales (rearings) en los brazos cerrados ($F^{(1,51)}=10.43$, $p < 0.01$) y el número total de rearings en el laberinto ($F_{(1,51)}=12.45$, $p < 0.001$), asimismo también se halló una menor latencia de entrada en los brazos cerrados por parte de las hembras ($F_{(1,51)}=4.78$, $p < 0.05$). Las hembras también mostraron una tendencia a recorrer una mayor distancia total en el laberinto en comparación con los machos ($F_{(1,51)}=3.86$, $p=0.055$).

El tratamiento de EA incrementó de forma significativa el número de entradas y la distancia recorrida en los brazos abiertos ($F_{(1,51)}=4.75$, $p<0.05$ y $F_{(1,51)}=5.01$, $p<0.05$, respectivamente). En general, los efectos significativos del enriquecimiento aparecieron también en las conductas de defensa y de evaluación del riesgo, como son el número de conductas de ‘stretching’ de los brazos cerrados hacia los brazos abiertos ($F_{(1,51)}=7.49$, $p<0.01$), el número total de rearings ($F_{(1,51)}=27.83$, $p<0.001$) y el número de rearings en las zonas desprotegidas (centro + brazos abiertos) ($F_{(1,51)}=36.49$, $p<0.001$). Así, los animales control comparados con los enriquecidos mostraron una mayor ocurrencia de conductas de aproximación-retirada desde las zonas protegidas del laberinto, lo cual indicaba un patrón de exploración más cauto, en cambio, las ratas enriquecidas aumentaron las conductas de evaluación del riesgo en las partes más desprotegidas del laberinto ($F_{(1,51)}=6.67$, $p<0.05$), como son las partes más distantes de los brazos abiertos en comparación a los animales control. El enriquecimiento no afectó la conducta de head-dipping en el laberinto y tampoco se encontraron efectos significativos del tratamiento en el número de entradas totales o el porcentaje de entradas en los brazos abiertos del laberinto.

Tabla 4. Media \pm SE de la conducta de los animales en el laberinto elevado en cruz por los animales Control (C) y Enriquecidos (EE) machos y hembras. * $P<0.05$ vs animales control del mismo tratamiento. + $P<0.05$ respecto a los animales control del mismo sexo.

	Machos		Hembras		F(1,51)		P
	C	EE	C	EE	Sexo	Trat	
Distancia cerrados	602,4 \pm 75,4	662,7 \pm 45,6	819,5 \pm 67,6	734,4 \pm 49,4*	5,61		<0,05
Distancia total	1124,5 \pm 77,9	1335 \pm 70,7	1368,3 \pm 89,3	1424,6 \pm 92,5	3,86		0,05
Latencia cerrados	62,5 \pm 25,2	32,6 \pm 5,9	17 \pm 5,2	23,3 \pm 4,2*	4,78		<0,05
Tiempo centro	44,5 \pm 6,3	55,1 \pm 5,3	34,4 \pm 4,9	50,6 \pm 7,5		4,64	<0,05
Entradas abiertos	5,9 \pm 1,1	7,7 \pm 0,4	5,9 \pm 0,83	7,6 \pm 0,64		4,75	<0,05
Distancia abiertos	369,7 \pm 69,4	492 \pm 35	377,8 \pm 58,7	503,5 \pm 51,1		5,01	<0,05
Rearings cerrados	8,5 \pm 1,2	13,8 \pm 1,7*	13,64 \pm 1,2	17,4 \pm 1,1+	10,43	11,35	<0,01
Rearings centro+abiertos	0,25 \pm 0,13	4,66 \pm 0,6+	2,14 \pm 0,74	5 \pm 1,03+		22,75	<0,01
Rearings totales	8,7 \pm 1,2	18,5 \pm 1,8+	15,7 \pm 1,2	22,4 \pm 1,7+	12,45	27,83	<0,001
Rearings centro	0,2 \pm 0,1	4,5 \pm 0,6+	2 \pm 0,7	3,9 \pm 0,8		21,76	<0,001
Stretchings cerrados	6 \pm 1	3,2 \pm 0,6+	6,9 \pm 1	4,7 \pm 0,8		7,49	<0,01
Stretchings abiertos	1,8 \pm 0,4	3,5 \pm 0,4	1,7 \pm 0,5	3,07 \pm 0,7		6,67	<0,05
Entradas totales	14,16 \pm 1,1	17,16 \pm 1,05	16,28 \pm 1,3	17,57 \pm 0,9		3,45	0,069
% entradas	40,56 \pm 7,1	45,47 \pm 1,5	33,78 \pm 4,02	43,08 \pm 2,6			n.s.

3.2.5. Prueba de respuesta de sobresalto e inhibición prepulso.

Respecto a la respuesta de sobresalto, hay que tener en cuenta que los animales de mayor peso, al ejercer una mayor fuerza sobre la plataforma del aparato, pueden presentar una mayor amplitud de la respuesta, con lo que es habitual en la literatura utilizar índices ponderados por peso (Servatius et al., 2005) o bien análisis de la covariancia, utilizando como covariable el peso (Young y Cook, 2004) para estudiar el efecto del tratamiento no atribuible a una diferencia de peso. Además, en nuestro caso, el tratamiento de EA también produce una disminución del peso de los animales, por lo que realizamos un análisis de la covariancia de medidas repetidas con dos factores intersujetos ('sexo' y 'tratamiento') y un factor intrasujetos ('ensayo'). El análisis no mostró efectos significativos de la sesión a lo largo de las 12 presentaciones del estímulo de sobresalto, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la intensidad de la respuesta. Es decir, machos y hembras presentaron niveles similares de reactividad ante el estímulo acústico y el tratamiento no modificó el comportamiento de los animales en esta medida.

En cuanto al análisis de la inhibición prepulso, los animales mostraron diferentes valores de inhibición de la respuesta según fuera la intensidad del estímulo prepulso utilizado en cada tipo de ensayo (ANOVA con medidas repetidas, factor 'prepulso': $F_{(2,96)}=104.62$, $P<0.001$, Figura 6B), de manera que los grupos mostraron la máxima inhibición con los prepulsos de 80dB y la mínima inhibición con los prepulsos de menor intensidad (de 60dB). Se obtuvieron efectos significativos del EA con determinadas intensidades del estímulo prepulso (interacción significativa 'prepulso' x 'tratamiento': $F_{(2,96)}= 3.47$, $p<0.05$), de manera que los animales enriquecidos presentaban valores más bajos de inhibición de la respuesta de sobresalto comparados con los animales control (Figura 6B). La descomposición de la interacción mostró que los animales enriquecidos mostraron valores significativamente menores de inhibición respecto a los animales control en los ensayos con prepulso 60 y 70 ($p<0.01$ y $p<0.05$, respectivamente). También apareció un efecto global intersujetos del tratamiento (ANOVA, efecto 'tratamiento': $F_{(1,48)}=8.46$, $p<0.05$), confirmando esta menor inhibición por parte de los animales enriquecidos. Cuando se incluyó el peso de los animales como covariable en los análisis, también se detectaron las diferencias de inhibición prepulso causadas por el EA ('prepulso' x 'tratamiento': $F_{(2,96)}=4.37$, $p<0.05$).

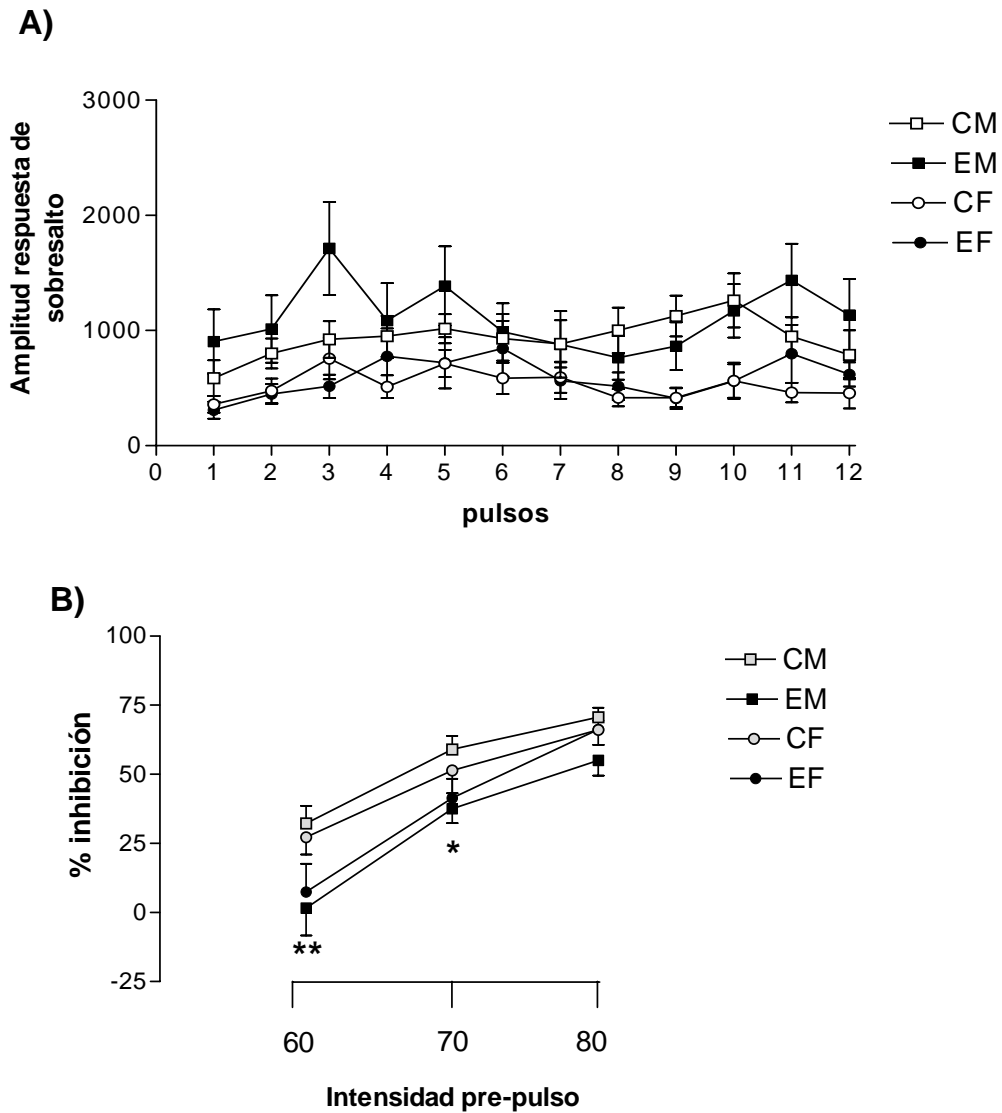


Figura 6. Se muestra la media \pm EE de los valores de la magnitud, en unidades arbitrarias, de la respuesta de sobresalto durante los primeros 12 ensayos (Fig. 6A) y del porcentaje de inhibición de la respuesta de sobresalto ante el estímulo prepulso (Fig. 6B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a los animales control del mismo sexo.

3.2.6. Discriminación Social (DS).

3.2.6.1. DS 30'

Debido a que en los experimentos de discriminación social 1 y 2 encontramos discriminación en todos los grupos experimentales, independientemente del sexo del juvenil utilizado, y a pesar de las diferencias encontradas en cuanto a la mayor cantidad de exploración dedicada a los juveniles hembra por parte de los animales enriquecidos macho en el estudio 2, decidimos utilizar juveniles macho en los siguientes experimentos de discriminación social.

Cuando se evaluó la discriminación social utilizando un intervalo interensayos de 30 minutos no observamos reconocimiento social en ninguno de los grupos experimentales, ya que los niveles de exploración de los animales hacia el juvenil conocido y el juvenil nuevo durante el segundo ensayo fueron similares (ANOVA con medidas repetidas, n.s., ver figura 7A). El análisis estadístico de los tiempos de exploración totales en los ensayos 1 y 2 indicó efectos globales significativos del ‘ensayo’ y de la interacción ‘ensayo’ x ‘tratamiento’ (ANOVA con medidas repetidas, $F_{(1,48)}=11.94$, $p<0.01$ y $F_{(1,48)}=4.025$, $P<0.05$, respectivamente, Figura 7B). La descomposición de la interacción indicó que los grupos CM, CF y EF redujeron los tiempos de exploración en el ensayo 2 en comparación al primer ensayo ($p<0.05$).

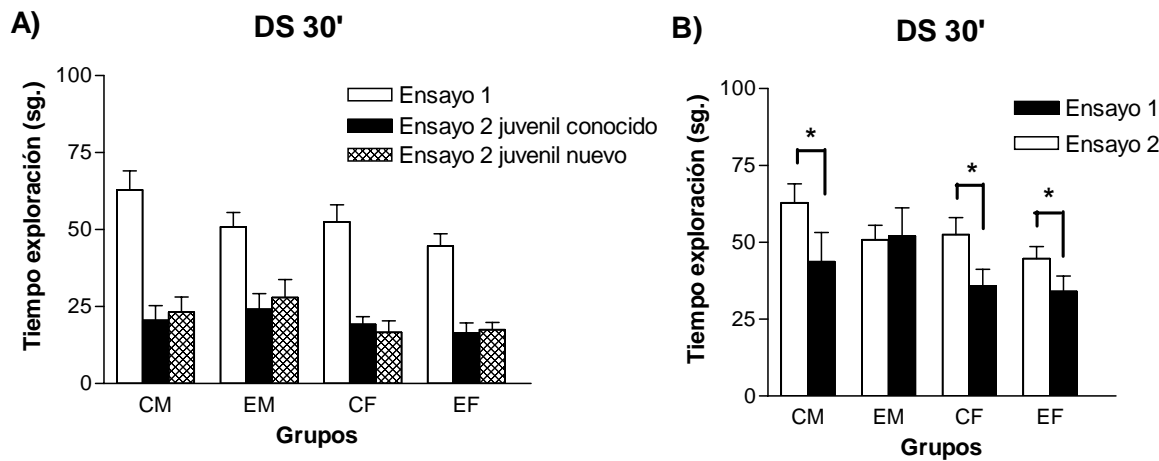


Figura 7. Media \pm EE del tiempo de exploración al juvenil en la prueba de discriminación social utilizando un ITI de 30'. En la figura 1A se representan los tiempos de exploración en el ensayo 1 (columnas blancas) y en el ensayo 2 hacia el juvenil conocido (columnas negras) y nuevo (columnas ralladas). La figura 1B representa la exploración total en el ensayo 1 (columnas blancas) y en el ensayo 2 (columnas negras). * $P<0.05$.

3.2.6.2. DS 15'

Como los animales no habían discriminado entre el juvenil nuevo y el juvenil conocido utilizando el intervalo entre ensayos de 30 minutos decidimos repetir el experimento al cabo de una semana utilizando un intervalo entre ensayos de 15 minutos. El análisis de la varianza mostró que en el primer ensayo los machos exploraron a los juveniles durante más tiempo que las hembras ($F_{(1,50)}=8.441$, $P<0.01$, Figura 8A). El resultado más destacable es la interacción significativa que mostró el ANOVA al comparar el tiempo de exploración hacia los juveniles en el segundo ensayo (ANOVA, efecto: ‘tratamiento’ x ‘sexo’: $F_{(1,50)}=4.598$, $p<0.05$, Figura 8B), indicando que el EA tuvo efectos diferenciales, de

manera que, aparentemente mejoraba el reconocimiento en machos y mostraba el efecto contrario en hembras. De hecho, la descomposición de la interacción mostró que solo las hembras control y los machos enriquecidos discriminaron al juvenil conocido del nuevo durante el segundo ensayo (CF: $p < 0.01$, EM: $p < 0.05$). Y cuando analizamos el valor de la diferencia entre el tiempo de exploración hacia los juveniles nuevo y conocido en el segundo ensayo apareció una interacción significativa ‘tratamiento’ x ‘sexo’ (ANOVA, $F_{(1,50)} = 4.598$, $p < 0.05$, Figura 8B), mostrando que el EA afectó de forma diferente a machos y hembras, de manera que mejoró el reconocimiento de los machos y lo empeoró en las hembras. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de exploración totales entre el primer y segundo ensayo en ninguno de los grupos experimentales (Figura 8C). Finalmente, durante el segundo ensayo los machos volvieron a presentar niveles más elevados de conducta exploratoria hacia los juveniles ($F_{(1,50)} = 10.17$, $p < 0.01$).

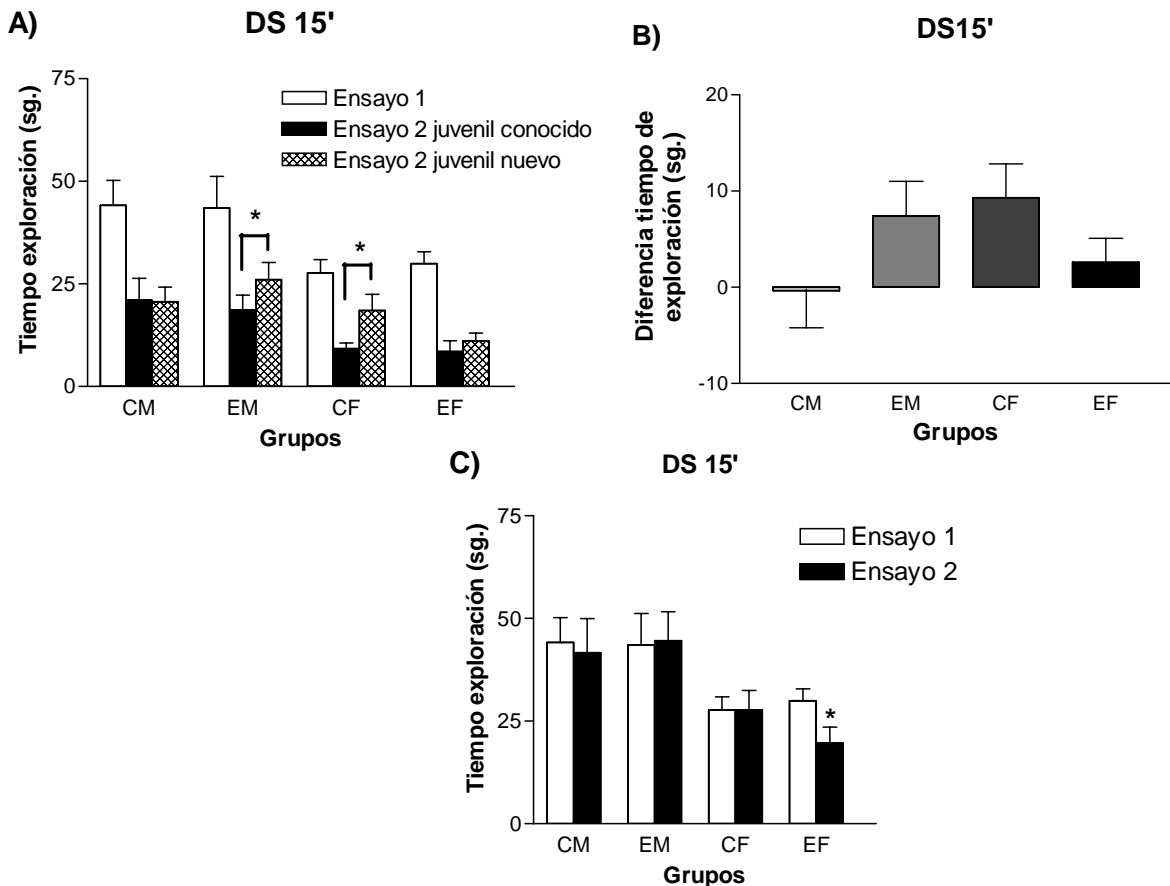


Figura 8. Media \pm EE del tiempo de exploración al juvenil en la prueba de discriminación social utilizando un ITI de 15'. En la figura 1A se representan los tiempos de exploración en el ensayo 1 (columnas blancas) y en el ensayo 2 hacia el juvenil conocido (columnas negras) y nuevo (columnas ralladas). La figura 1B representa la diferencia en el tiempo de exploración durante el segundo ensayo entre la exploración al juvenil nuevo-exploración al juvenil conocido. La figura 1C representa el tiempo total de exploración en el ensayo 1 (columnas blancas) y en el ensayo 2 (columnas negras). * $P < 0.05$ respecto a los animales macho del mismo tratamiento.

3.2.7. Laberinto Hebb-Williams.

Entrenamiento

El criterio para avanzar a la fase de ejecución de los 12 problemas del laberinto Hebb-Williams fue realizar los 6 ensayos de entrenamiento en un tiempo igual o inferior a 90 segundos durante dos días consecutivos. Si este criterio no se conseguía en un máximo de 15 días la rata era excluida del experimento. Encontramos una diferencia de sexo significativa en el número de sesiones necesario para alcanzar el criterio (ANOVA, efecto ‘sexo’: $F_{(1,39)}=22.41$, $p<0.001$, Figura 9), de manera que las hembras necesitaron un menor número de sesiones de entrenamiento para cumplirlo y avanzar a la fase de problemas.

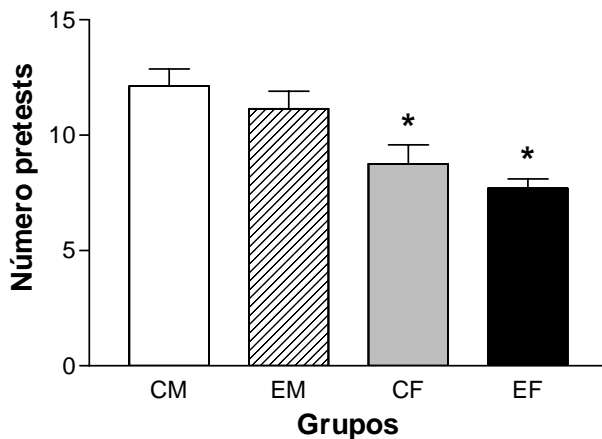


Figura 9. Media ± EE del número de sesiones de problemas ‘pretests’ realizados hasta alcanzar el criterio de adquisición en el laberinto Hebb-Williams. * $P<0.05$ respecto a los animales macho del mismo tratamiento.

Ejecución de la serie de 12 problemas

El ANOVA con medidas repetidas de los 12 problemas (ensayos 1-6) del laberinto Hebb-Williams indicó efectos significativos del ‘problema’ en el número de errores totales ($F_{(11,396)}=58.3$, $p<0.0001$, Figura 10A), la distancia total recorrida ($F_{(11,396)}=69.3$, $p<0.0001$, Figura 10B) y la latencia total ($F_{(11,396)}=43.3$, $p<0.0001$, Figura 10C). Se encontraron interacciones significativas ‘problema’ x ‘tratamiento’ en el número total de errores ($F_{(11,396)}=3.41$, $p<0.01$) y la distancia recorrida ($F_{(11,396)}=2.37$, $p<0.05$), indicando

que los animales enriquecidos realizaron un menor número de errores y necesitaron recorrer una distancia menor para llegar a la meta que los animales control, como indican también los resultados del efecto intersujetos ‘tratamiento’ en los ANOVAs (errores: $F_{(1,36)}=22.83$, $p<0.001$; distancia: $F_{(1,36)}=30.63$, $p<0.001$). Análisis posteriores de los efectos observados mostraron que los animales enriquecidos realizaron menos errores que los animales control en los problemas 2, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 (Figura 10A) y recorrieron menores distancias para llegar a la meta en los problemas 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 (Figura 10B). Se encontró un efecto ‘problema’ y un efecto interacción ‘problema’ x ‘sexo’ en las latencias totales ($F_{(11,396)}=43,41$, $p<0.0001$, y $F_{(11,396)}=2,93$, $p<0.05$, Figura 10C), mostrando que la ejecución varió a lo largo de los 12 problemas en función del sexo del animal, de manera que las hembras mostraron latencias menores de llegada al compartimento de meta que los machos. También aparecieron efectos significativos intersujetos ‘tratamiento’ y ‘sexo’ en el ANOVA de la latencia total (ANOVAs, $F_{(1,36)}=12.69$, $p<0.001$, y $F_{(1,36)}=18,51$, $p<0.0001$, respectivamente, Figura 10C), indicando que, globalmente, los animales enriquecidos resolvieron los problemas más rápidamente que los animales control, y que las hembras eran más rápidas que los machos. El análisis posterior mostró que las hembras recorrieron el laberinto en menos tiempo que los machos en los problemas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Los animales enriquecidos también recorrieron más rápido el laberinto que los animales control en los problemas 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11 y 12 (Figura 10C).

Tabla 4. Se muestran los estadísticos media \pm SE y mediana del número total de errores en los problemas del laberinto Hebb-Williams clasificados por el grado de dificultad: problemas fáciles ≤ 15 errores; 16 \leq problemas intermedios < 30 ; problemas difíciles ≥ 30 .

Problema	Media \pm E.S.	Mediana	Clasificación
3	79.7 \pm 0.8	8.5	fácil
12	11 \pm 0.4	9	fácil
4	11.1 \pm 0.5	11	fácil
1	11.45 \pm 0.8	12	fácil
2	17.5 \pm 1.0	17	intermedio
10	18.4 \pm 1.7	15	intermedio
11	21.1 \pm 1.8	24	intermedio
6	22.7 \pm 1.6	20	intermedio
8	23.4 \pm 1.5	22	intermedio
9	25.8 \pm 1.8	26	intermedio
7	35.7 \pm 2.4	33	difícil
5	42.2 \pm 1.9	41.5	difícil

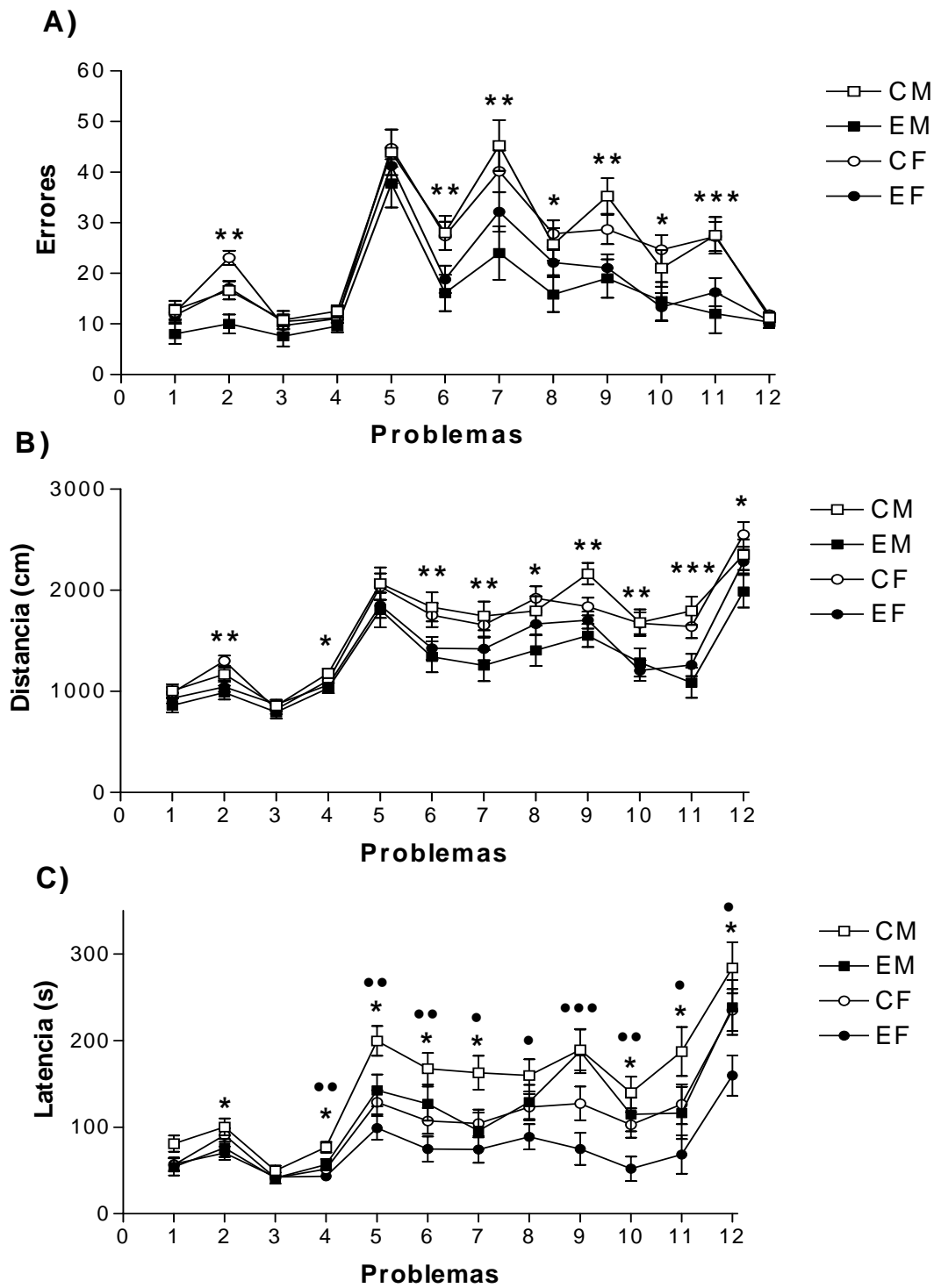


Figura 10. Media \pm EE de los errores (A), distancia recorrida (B) y latencia (C) en los 12 problemas del laberinto Hebb-Williams, de los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ enriquecidos respecto a grupos control. ● $p < 0.05$, ●● $p < 0.01$, ●●● $p < 0.001$ machos respecto a hembras.

Ejecución en los problemas fáciles, intermedios y difíciles

El número total de errores cometidos en cada problema por toda la muestra de animales se representa en la tabla 4, donde los problemas han sido ordenados de menor a mayor número de errores. La media de errores cometidos en cada problema se utilizó para agrupar los problemas según su nivel de dificultad en: fáciles (menos de 15 errores: problemas 1, 3, 4 y 12), intermedios (16-30 errores: problemas 2, 6, 8, 9, 10 y 11) y difíciles (más de 30 errores: problemas 5 y 7). En la figura 10 se muestra la media del número de errores, distancia recorrida y latencia en los problemas fáciles (4), intermedios (6) y difíciles (2). El análisis de medidas repetidas mostró efectos significativos del ‘nivel de dificultad’ en la media del número total de errores ($F_{(2,72)}=198.2$, $p<0.0001$), la media de la distancia recorrida ($F_{(2,72)}=45.0$, $p<0.0001$), y la media de la latencia ($F_{(2,72)}=11.52$, $p<0.0001$). Cabe destacar que el enriquecimiento disminuyó significativamente el número de errores (‘nivel de dificultad’ x ‘tratamiento’: $F_{(2,72)}=5.45$, $p<0.05$, Figura 11A) y la distancia recorrida (‘nivel de dificultad’ x ‘tratamiento’: $F_{(2,72)}=3.92$, $p<0.05$, Figura 11B) en los problemas intermedios y difíciles, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los problemas fáciles. En cuanto a la latencia se encontró una tendencia a la significación de la interacción ‘nivel de dificultad’ x ‘sexo’ ($F_{(2,72)}=2.89$, $p=0.073$), ya que las hembras no aumentaron la latencia de llegada a la meta en los problemas más difíciles (Figura 11C). Los análisis post hoc no indicaron diferencias entre los grupos en los errores cometidos ni en la distancia recorrida en los problemas fáciles, pero los animales enriquecidos realizaron significativamente menos errores y recorrieron menos distancia que los animales de los grupos control en los problemas con dificultad intermedia (Figura 11A,B). Además, los grupos control aumentaron el número de errores y la distancia en los problemas de dificultad intermedia respecto a los problemas fáciles, mientras que no se encontraron diferencias significativas en los grupos enriquecidos. En los problemas difíciles todos los grupos cometieron un número de errores significativamente mayor y recorrieron más distancia, pero los machos enriquecidos realizaron significativamente menos errores y recorrieron menos distancia que el grupo de machos control. En cuanto a la latencia, las hembras enriquecidas presentaron tiempos menores que los machos enriquecidos en los problemas intermedios, mientras que en los problemas difíciles fue el

grupo de machos control el que mostró los tiempos más elevados en comparación con el resto de grupos (Figura 11C).

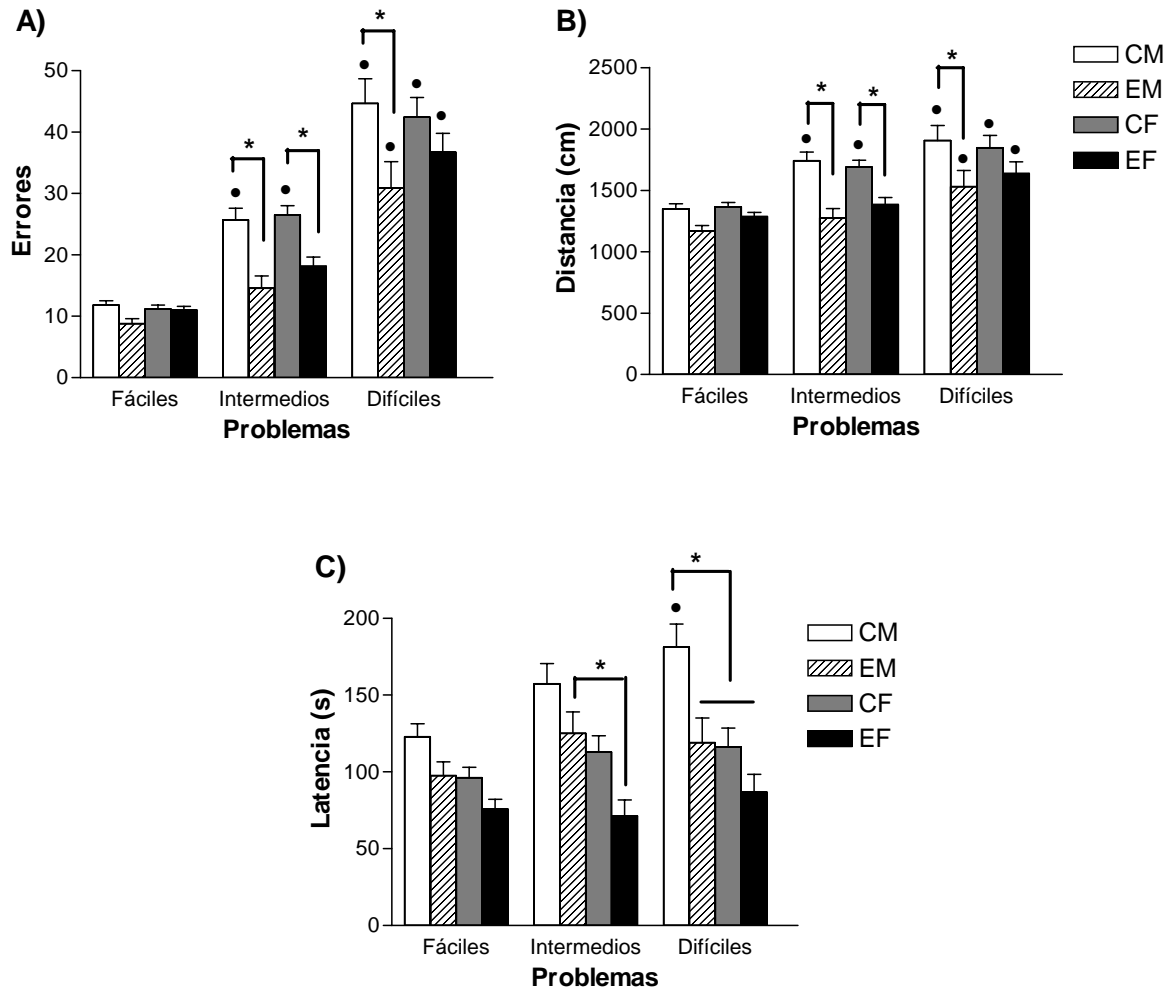


Figura 11. Media \pm EE de los errores (A), distancia recorrida (B) y latencia (C) en los problemas fáciles (1,3,4 y 12), intermedios (2,6,8,9,10 y 11) y difíciles(5 y 7) del laberinto Hebb-Williams, de los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). • $P < 0.05$ respecto al mismo grupo en los problemas fáciles, * $P < 0.05$ respecto al grupo indicado.

Ejecución a lo largo de los 6 ensayos en cada problema

Otra forma de analizar la ejecución de los animales en el laberinto Hebb-Williams es mediante el estudio de los errores cometidos a lo largo de los 6 ensayos de cada problema, con el fin de analizar el comportamiento de los animales a lo largo de la sesión sin tener en cuenta el tipo de problema. En la figura 12 se representa la suma de los errores en los 12 problemas del laberinto para cada ensayo. El análisis no mostró diferencias entre grupos en la curva decreciente que observamos en la gráfica (efecto 'ensayo': $F_{(5,180)}=79.437$, $p<0.001$), de manera que todos los grupos disminuyen el número de errores a lo largo de los ensayos dentro de cada sesión. El ANOVA también mostró un efecto global de 'tratamiento' ($F_{(1,36)}=22.836$, $p<0.001$), indicando que, globalmente, los animales enriquecidos cometieron menos errores que los controles. Concretamente, los animales enriquecidos realizaron menos errores que los animales control en todos los ensayos menos en el primero (Figura 11A).

El ANOVA global también mostró efectos significativos del tratamiento en la distancia recorrida a lo largo de los 6 ensayos ($F_{(1,36)}=30.635$, $p<0.001$), un efecto significativo del factor intrasujetos 'ensayo' ($F_{(5,180)}=90.280$, $p<0.001$) y una interacción 'ensayo' x 'tratamiento' significativa ($F_{(5,180)}=2.804$, $p<0.05$); todo ello reflejado por los valores de distancia más bajos que presentan los animales enriquecidos a lo largo de los ensayos. Así, los animales enriquecidos recorrieron menos distancia que los animales control en todos los ensayos (Figura 11B)

Según lo previsto, los animales resolvían más rápidamente los problemas a medida que los ensayos avanzaban, efecto 'ensayo' ($F_{(5,180)}=93.63$, $p<0.001$), sin que aparecieran efectos significativos en la pendiente de la curva entre los distintos grupos experimentales. El análisis de los efectos intersujetos mostró efectos globales significativos del 'tratamiento' ($F_{(1,36)}=12.692$, $p<0.001$) y del 'sexo' ($F_{(1,36)}=18.507$, $p<0.001$), mostrando que, globalmente, los animales enriquecidos y las hembras resolvían los problemas de forma más rápida en todos los ensayos. Los análisis de los efectos observados mostraron que las hembras necesitaron menos tiempo para resolver el laberinto que los machos en todos los ensayos y el enriquecimiento también disminuyó la latencia de llegada a la meta en todos los ensayos con respecto a los animales control (Figura 11C).

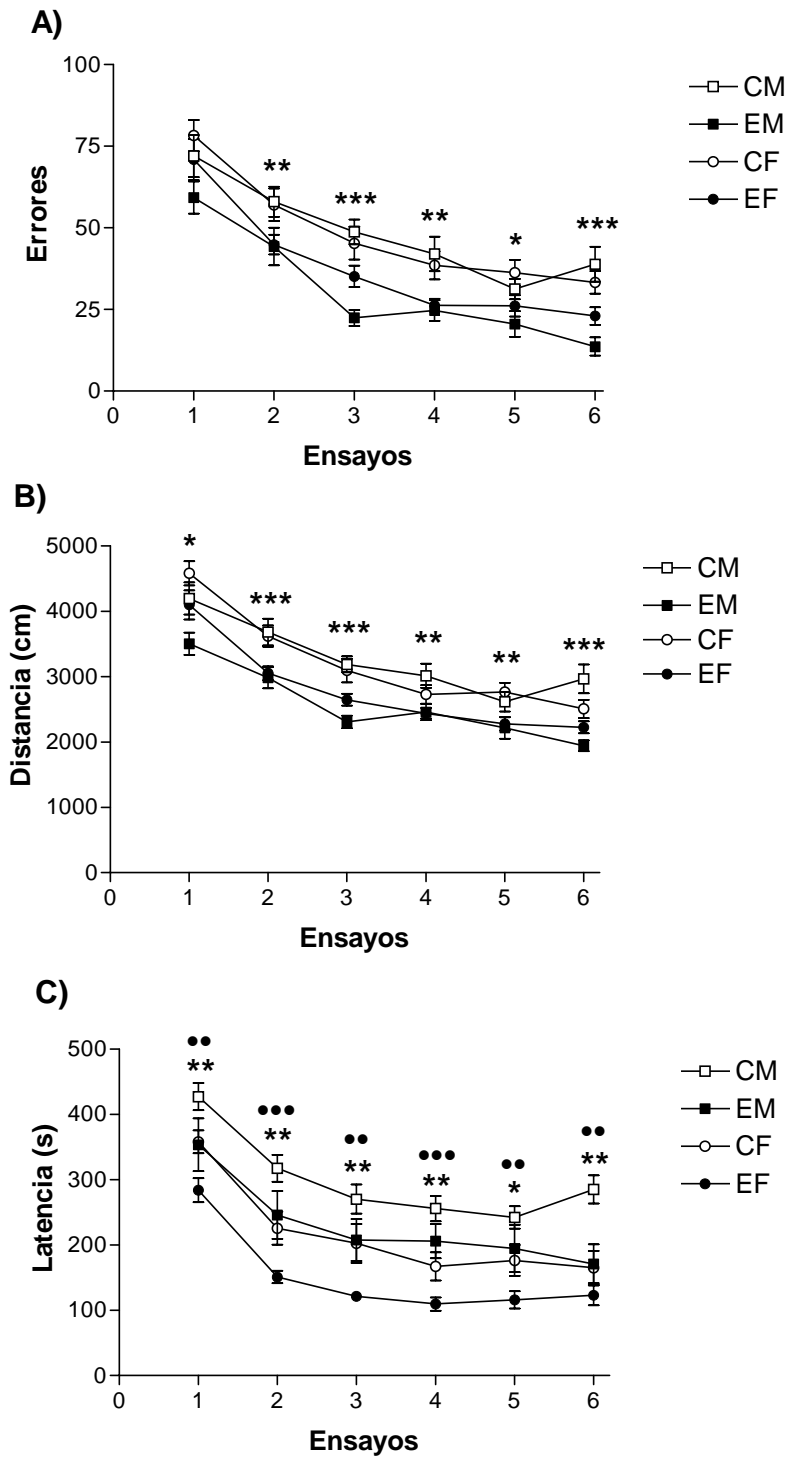


Figura 12. Media \pm EE de los errores (A), distancia recorrida (B) y latencia (C) en los ensayos 1-6 de los problemas del laberinto Hebb-Williams, para los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ enriquecidos respecto a grupos control. • $p < 0.05$, ● $p < 0.01$, ●● $p < 0.001$ machos respecto a hembras.

4. DISCUSIÓN

Exploración y discriminación social

En general los tiempos de exploración de los machos fueron superiores a los de las hembras en todos los experimentos realizados, los machos exploraron durante más tiempo a los juveniles en los ensayos 1 y 2 de cada prueba. Esto es consistente con otros resultados obtenidos por otros autores, incluso en circunstancias en que las hembras presentaron mejores índices de reconocimiento con intervalos de retención mayores (Bluthe y Dantzer, 1990). Las diferencias de sexo en exploración podrían estar relacionadas con el dimorfismo sexual que presenta el sistema vomeronasal del procesamiento de feromonas no volátiles, y que también está relacionado con las señales olfativas involucradas en la investigación social (Bluthe y Dantzer, 1990; Ferguson et al., 2002). Además, el hecho de que los antagonistas de la vasopresina bloqueen únicamente en machos la mejora del reconocimiento que produce la vasopresina periférica en ambos sexos (Bluthe y Dantzer, 1990), sugiere que el reconocimiento social en ratas hembra no está mediado por la neurotransmisión de la vasopresina, e indica que diferentes sistemas pueden subyacer en la interacción y el reconocimiento social en machos y hembras.

Por otro lado, de entre las variables que afectan al reconocimiento social, parece ser que la elección del estímulo social es crítico, y aunque según los resultados obtenidos en los experimentos iniciales (Thor y Holloway, 1982) se recomendó utilizar machos juveniles porque parecían ser estímulos relativamente neutros que provocan el mínimo número de respuestas sexuales y agresivas, Ferguson et al. (2002) demostraron que también pueden utilizarse como estímulos sociales válidos a machos y hembras adultos, si bien, la utilización de hembras ovariectomizadas o machos juveniles parece ser la mejor elección para evaluar este tipo de memoria (Engelmann et al., 1995; Winslow y Camacho, 1995). Así, con respecto a los estímulos sociales, nuestros resultados indicaron que las diferencias sexuales en los patrones de exploración se acentuaron cuando se utilizaron juveniles hembra. Los machos adultos mostraron un interés social mayor hacia los juveniles hembra en comparación con las hembras adultas, quienes mostraron el mismo interés por los juveniles macho y hembra. En el estudio de Reeb y Tang (2005) se encontró que las hembras mostraron más interés en investigar a individuos de su mismo sexo, pero en este caso no se utilizaron ratas juveniles sino ratas de la misma edad, con lo que se evaluaba la interacción recíproca. En este estudio las hembras únicamente exploraron a hembras y los

machos exploraron a machos, con lo que no se comparó diferencialmente la preferencia por uno u otro sexo. Aunque en nuestros experimentos tampoco comparamos directamente en un único experimento las diferencias de exploración según el sexo del juvenil sino que realizamos dos experimentos separados, con lo que no podemos descartar efectos debidos al orden de presentación, ya que en el primer experimento utilizamos juveniles macho y en el segundo juveniles hembra. Tal vez, aunque machos y hembras difieren en cuanto a su motivación por la interacción social, se necesitan más estudios utilizando diferentes estímulos sociales para entender el significado de estas diferencias.

El resultado más destacable de los experimentos de discriminación social fue que el enriquecimiento modificó los patrones de investigación social de las ratas de forma diferente en función del sexo.

El grupo de machos enriquecidos comparados con los machos control mostró un incremento en los tiempos de exploración hacia el juvenil en el segundo ensayo mientras que no se produjo ningún cambio en las hembras enriquecidas comparadas con las controles. Esto es, el enriquecimiento aumentó las diferencias de sexo que aparecen en los patrones de exploración de los animales control no enriquecidos, siendo los machos quienes exploraban más los estímulos sociales que las hembras. Ello sugiere que los patrones de interacción social de los machos tienen una mayor sensibilidad a los efectos del enriquecimiento que los de las hembras. Hasta el momento no hay estudios que hayan evaluado los efectos del EA en este paradigma de memoria social, no obstante y aunque estudios previos han encontrado que machos y hembras responden de forma similar al enriquecimiento (Seymour et al., 1996; Bardo et al., 2001), otros estudios encuentran que los efectos del enriquecimiento parecen ser mayores en los machos que en las hembras (Juraska, 1984; Elliot y Grunberg, 2005). Además, en el estudio de Reeb y Tang (2005) se estudiaron los efectos diferenciales del procedimiento de exposición postnatal a la novedad en función del sexo mediante el paradigma del reconocimiento social, y encontraron que los machos presentaron mayor sensibilidad a este tipo de estimulación temprana que las hembras de forma consistente con otros trabajos de estos autores (Tang et al., 2003). No encontraron diferencias entre las hembras en los patrones temporales de habituación a la exploración social mientras que en los machos la exposición postnatal a la novedad aceleró la habituación, mostrando que machos y hembras responden de forma diferente a este tipo de estimulación temprana.

Con respecto a la discriminación social, en el presente trabajo los datos de los resultados del Estudio I mostraron que todos los grupos de animales adultos exploraron a los juveniles nuevos más que a los conocidos independientemente del sexo del juvenil, y que no se produjeron dificultades de reconocimiento durante el segundo encuentro. En cambio, en el experimento 7, donde el intervalo inter-ensayos fue de 30 minutos, ninguno de los grupos experimentales mostró reconocimiento, los animales no fueron capaces de discriminar entre el juvenil presentado previamente y el juvenil nuevo en la segunda exposición independientemente del tratamiento. Debemos comentar que en el Estudio I los animales tenían 15-16 semanas de edad y sólo hacía 3 semanas que el tratamiento de EA había finalizado, en cambio en el Estudio II los animales tenían 27-28 semanas de edad y el EA había acabado a las 16 semanas. Además, en el Estudio I el tratamiento tuvo una duración de 8 semanas, mientras que en el Estudio II el enriquecimiento se extendió a 12 semanas.

Normalmente, una rata adulta reconoce al juvenil 30 minutos después de la presentación pero no suele mostrar reconocimiento tras 120 minutos, con lo que se establece el intervalo inter-ensayos de 30 minutos como la medida estándar de reconocimiento social (Dantzer et al., 1987; Burman y Mendl, 2000). Pero en ocasiones, no aparece reconocimiento tras este intervalo de tiempo, sobretodo en ratas jóvenes sexualmente inexpertas (Engelmann et al., 1995). Por ejemplo, en el estudio de Reijmers et al. (2001b), donde evaluaron reconocimiento mediante el paradigma de la discriminación social utilizando intervalos inter-ensayos de 25 y 15 minutos, a pesar de hallar reconocimiento con los dos intervalos, este fue mucho más acusado cuando se evaluó reconocimiento 15 minutos después de la primera exposición. De hecho, el fallo en reconocimiento tras 30 minutos de intervalo inter-ensayos no es un hecho aislado. Becker y Grecksch (2000) indican que en estudios preliminares no encontraron diferencias entre el primer y segundo encuentro mediante el paradigma de reconocimiento cuando el intervalo de tiempo era mayor de 30 minutos, utilizando ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad. En otro estudio de estos autores, utilizando ratas de 1 año de edad tampoco se encontró reconocimiento utilizando un intervalo inter-ensayos de 30 minutos pero sí apareció reconocimiento utilizando un intervalo inter-ensayos de 15 minutos, sugiriendo que se necesitan intervalos de tiempo más cortos para detectar memoria social cuando las ratas tienen una edad avanzada, ya que el fallo en el reconocimiento puede representar déficits de memoria específicos asociados a la edad. De hecho, la diferencia de edad entre los animales de los dos estudios en el momento de realizar los experimentos de discriminación social, nos sugiere que quizás el fallo de

discriminación generalizada a todos los grupos experimentales utilizando un intervalo inter-ensayos de 30 minutos en el Estudio II se deba a algún tipo de alteración cognitiva asociada a la edad y específica de esta tarea, como sugieren los resultados de estos autores (Becker y Grecksch, 2000). Aunque, otros factores también pueden haber interferido con la formación de este tipo de memoria a corto plazo, como son la falta de motivación por el contacto social, lo cual se vería reflejado en una disminución en el tiempo total de exploración de la segunda exposición con respecto a la primera; además en este experimento todos los grupos, excepto el de machos enriquecidos, redujeron los tiempos de exploración hacia los juveniles en el segundo ensayo de la prueba, lo cual concuerda con la hipótesis de que una reducción en la motivación por la exploración social podría afectar los resultados (Engelmann et al., 1995).

Debido al fallo de reconocimiento por parte de los animales del estudio II de 7 meses cuando utilizamos un intervalo inter-ensayos de 30 minutos decidimos repetir la prueba una semana más tarde reduciendo el intervalo inter-ensayos a 15 minutos (Experimento 8). En este experimento observamos que los machos presentaron mayores niveles de exploración que las hembras durante la primera y la segunda exposición a los juveniles, con lo cual se replicaban los experimentos 1 y 2 de Estudio I. De nuevo encontramos el mismo patrón diferencial de exploración producido por el EA en machos y hembras que habíamos observado en los experimentos anteriores del Estudio I. Por un lado, obtuvimos diferencias de reconocimiento en función del sexo entre los grupos control, de manera que los machos control exploraron por igual a los juveniles nuevo y conocido durante el segundo ensayo, sin que mostraran reconocimiento social, mientras que las hembras control dedicaron un tiempo significativamente mayor a explorar al juvenil nuevo en comparación al conocido, lo cual nos indicó que el nivel de discriminación de las hembras era correcto. En cambio, el patrón de exploración que presentaban los animales enriquecidos era el inverso, los machos enriquecidos dedicaron más tiempo a explorar al juvenil nuevo que al conocido en el segundo ensayo mientras que las hembras enriquecidas mostraron niveles de exploración similares hacia los dos juveniles en esta segunda exposición. Así, el enriquecimiento mejoró la discriminación social en los machos, al tiempo que en las hembras invertía los parámetros influyendo negativamente en el índice de discriminación. Por último, el análisis de los tiempos de exploración totales durante el primer ensayo y el segundo no descubrió un descenso significativo en el tiempo invertido en la exploración social de los animales adultos por lo que podemos descartar otros posibles efectos de habituación a la exploración,

falta de motivación por la interacción social que parecen estar presentes en el experimento 7.

Como conclusión de los resultados obtenidos en los experimentos de discriminación social podemos afirmar que en general observamos diferencias entre la conducta de exploración social de machos y hembras, siendo los machos quienes dedicaron más tiempo a interactuar con los juveniles. Además, el enriquecimiento ambiental provocó efectos diferentes sobre la conducta de machos y hembras, alteró el patrón de investigación observado en ambos sexos, aumentando los tiempos de interacción social y mejorando el índice de discriminación en los machos mientras que disminuyó la interacción y la discriminación de las hembras.

Evaluación de la exploración, emotividad y respuesta hormonal

Conducta ansiosa en el Laberinto Elevado en Cruz

A pesar de los efectos diferenciales del EA en función del sexo que observamos en la conducta social, parece ser que el tratamiento afectó de la misma forma la conducta de los machos y las hembras en el laberinto elevado en cruz. Esta prueba es muy utilizada para evaluar la conducta ansiosa de roedores, de manera que la conducta en los brazos abiertos es indicativa de menores niveles de emotividad o ansiedad en el animal (Pellow y File, 1986). Más recientemente, otros autores han incorporado el análisis de las llamadas variables etológicas al estudio global de la conducta en el laberinto elevado, de manera que las exploraciones verticales hacia arriba y las dirigidas al suelo de la sala, juntamente con las conductas de acercamiento-alejamiento también aportan información, especialmente cuando se tiene en cuenta en qué parte del laberinto se producen estas conductas. Así, se considera que las exploraciones y los estiramientos que se producen en los brazos abiertos denotan ‘más riesgo’ que las que se producen en los brazos cerrados del laberinto (Rodgers y Dalvi, 1997; Wall y Messier, 2001). Los organismos presentan una serie de estrategias defensivas de evaluación de riesgo cuando se enfrentan a fuentes potenciales de peligro. Estas conductas de evaluación del riesgo consisten en la aproximación cautelosa por ejemplo hacia la apertura de túneles, seguida de extensiones con el cuerpo y la cabeza con

el fin de explorar manteniendo una postura defensiva, generalmente con el cuerpo estirado y pegado al suelo, con el fin de evaluar posibles peligros en el ambiente con el mínimo riesgo (Rodgers y Dalvi, 1997). El registro de este comportamiento en los diferentes componentes del laberinto elevado en cruz nos aporta una medida con gran relevancia etológica en el estudio de la ansiedad en esta prueba.

Con respecto a las diferencias de sexo, las hembras del Estudio I mostraron un incremento en el número de entradas totales y en la distancia recorrida total en comparación con los machos, indicando que en general fueron más activas. Las hembras del Estudio II también mostraron mayores niveles de actividad comparadas con los machos. Ellas recorrieron distancias más largas en los brazos cerrados del laberinto y observamos una tendencia significativa en el mismo sentido con respecto a la variable distancia total recorrida. Asimismo, también realizaron más incorporaciones verticales que los machos y la latencia de entrada en los brazos cerrados fue más pequeña que la de los machos. Todo ello confirma que las hembras muestran consistentemente una mayor actividad motora en una situación de novedad como es el laberinto elevado en cruz, lo cual es consistente con otros trabajos previos que también reportan efectos significativos del sexo, de modo que las hembras son más activas que los machos (Gray, 1971; Lehmann et al., 1999b; Aguilar et al., 2003).

En el Estudio I, el enriquecimiento aumentó el porcentaje de entradas en los brazos abiertos sin afectar el número total de entradas o la distancia total recorrida en el laberinto. Además, al analizar la distancia recorrida en las pruebas de discriminación social tampoco detectamos diferencias significativas (datos que no se muestran), sugiriendo que la administración de nuestro procedimiento de EA durante 8 y 12 semanas no comportó un incremento de la actividad durante la realización de estas pruebas conductuales. Este resultado indicó una reducción general de la emotividad, efecto que es consistente con otros trabajos (Escorihuela et al., 1999; Francis et al., 2002), aunque otros autores han reportado un aumento de la emotividad en el laberinto como resultado del enriquecimiento (Zhu et al., 2006). Al ampliar la duración del tratamiento de enriquecimiento ambiental a 12 semanas esperábamos obtener efectos más contundentes de reducción de la ansiedad en el laberinto elevado en cruz. El EA demostró ser una intervención eficaz en la disminución de la emotividad de los animales en esta prueba, aumentando el número de entradas y la distancia recorrida en los brazos abiertos del laberinto, por lo tanto mostrando efectos más robustos que en el experimento previo, indicando que tal vez la duración del tratamiento de EA es

una variable importante y que aporta mayor consistencia a los resultados. Sin embargo, en ninguno de los dos experimentos encontramos diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto, que es otra de las variables principales que indican una clara reducción en la ansiedad, aunque en otros trabajos tampoco obtienen diferencias significativas entre animales enriquecidos y controles en el número de entradas ni en tiempo de permanencia en los brazos abiertos, y no obstante encuentran que el tratamiento produce una disminución de la ansiedad en los ratones, aumentando el número de entradas en los brazos cerrados del laberinto (Roy et al., 2001).

Por otro lado, también se ha sugerido que la disminución en emotividad que se observa frecuentemente en los animales enriquecidos en pruebas clásicas de ansiedad puede explicarse más en términos de reducción de la fobia a la novedad, y consecuentemente, un aumento en la motivación por explorar los espacios nuevos (Fernandez-Teruel et al., 1997; Roy et al., 2001). A este respecto, en el experimento del laberinto elevado del estudio II otras conductas exploratorias denominadas ‘etológicas’ como las incorporaciones verticales (rearings) y que denotan evaluación del riesgo, como las posturas de estiramiento (‘stretchings’).

El EA aumentó el número de incorporaciones verticales (rearings) en el laberinto y específicamente las aumentó en las zonas desprotegidas de este (brazos abiertos y centro) y aumentó el número de posturas de evaluación del riesgo o estiramientos en los brazos abiertos hacia lugares más alejados, mostrando una conducta más valiente, o más curiosa (novelty seeking) y en cambio presentó menores valores de esta conducta en los brazos cerrados hacia los brazos abiertos del laberinto comparados con los animales control, que podemos considerar como una actitud más defensiva y con un mayor componente de ansiedad (Wall y Messier, 2001).

Podemos concluir que las hembras, independientemente del tratamiento, fueron más activas que los machos en el laberinto elevado en cruz; el enriquecimiento aumentó las entradas en los brazos abiertos y las conductas exploratorias de riesgo, lo cual, en conjunto, puede interpretarse en términos de reducción de la ansiedad y/o aumento de la actividad exploratoria en situaciones de novedad. Por último, y a diferencia de los resultados obtenidos en las pruebas de interacción y discriminación social, el tratamiento de EA no produce efectos diferenciales en función del sexo en el laberinto elevado en cruz.

Exploración en la Tabla de Agujeros y actividad eje HPA

La tabla de agujeros es una prueba que se aprovecha de la tendencia natural de las ratas a explorar los agujeros del suelo. Aunque esta prueba evalúa la curiosidad del animal y su conducta depende de la actividad inespecífica, también presenta un componente de reactividad debido a la novedad de la situación en el que claramente están implicados factores emocionales y a menudo es utilizada como situación experimental inductora de novedad ante la cual se evalúa la respuesta del eje HPA (Marquez et al., 2005). Por esto, además de analizar la exploración de los animales, decidimos evaluar el grado de estrés asociado a la exposición a esta prueba mediante el estudio de la reactividad del eje HPA.

- *Conducta exploratoria*

De nuevo, aparecieron diferencias de sexo, en la actividad motora, las hembras recorrieron mayores distancias que los machos durante la prueba, lo que va en la misma dirección que los datos obtenidos en el laberinto elevado en cruz, y que apuntan consistentemente a una mayor actividad de las hembras ante situaciones de novedad. El número de defecaciones fue globalmente menor en las hembras en comparación con los machos, lo cual sugiere una disminución de la emotividad (Aguilar et al., 2003).

Globalmente, el enriquecimiento aumentó la exploración de los animales en los agujeros durante los primeros minutos de la prueba. Los animales enriquecidos realizaron un mayor número de exploraciones (head dips) y dedicaron más tiempo a explorar los agujeros que los animales control durante los primeros minutos de exposición al ambiente nuevo. El análisis de los datos indicó que los animales control mostraron una inhibición de la conducta exploratoria durante los dos primeros minutos, lo cual podría deberse a una mayor reactividad inicial ante la situación de novedad. Asimismo, aunque los valores totales de la conducta exploratoria no difieren entre los grupos, el enriquecimiento también aumentó significativamente el número de incorporaciones verticales. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en estudios previos, en donde observamos que el EA aumentaba la conducta exploratoria en machos Sprague-Dawley (Escorihuela et al., 1994a,b), y machos de las cepas romanas (Fernandez-Teruel et al., 1992, 1997, 2002a). Datos de otros autores también son consistentes con un aumento de la conducta exploratoria de los animales enriquecidos respecto a los controles en otro tipo de

pruebas como el campo abierto en la tabla de agujeros, incluso en ratas que habían sido expuestas prenatalmente a ácido valproico, un modelo de autismo (Schneider et al., 2006).

- *Reactividad del eje HPA*

Intervenciones durante la infancia, como el estrés prenatal o la separación maternal han demostrado provocar alteraciones tanto conductuales como en la respuesta hormonal de estrés (Lehmann et al., 1999a; Wigger y Neumann, 1999; Finamore y Port, 2000). Claramente, la exposición a un ambiente enriquecido durante etapas tempranas de la vida del organismo también provoca efectos duraderos. Es importante estudiar si el tratamiento de EA produce diferencias en la reactividad del eje HPA durante la etapa adulta.

Cuando estudiamos la respuesta hormonal tras la exposición de 5 minutos a la tabla de agujeros, observamos que el enriquecimiento ambiental provocó una disminución significativa de los niveles de corticosterona en machos y hembras, sin que aparecieran efectos significativos del EA en los niveles de ACTH posteriores a la tabla de agujeros. El tratamiento no afectó los niveles basales de corticosterona y ACTH, aunque algunos autores han mostrado que los niveles basales de ACTH y corticosterona no parecen estar relacionados con la reactividad del eje HPA al estrés (Marquez et al., 2005).

En concordancia con estudios previos, las hembras mostraron mayores niveles de ACTH y corticosterona, tanto basales como en respuesta a la situación estresante (Rhodes y Rubin, 1999; Rhodes et al., 2002).

El hecho de que el tratamiento de EA haya disminuido la respuesta de corticosterona ante esta prueba que envuelve cierto componente ansiogénico es consistente con otros estudio, por ejemplo, en un estudio con ratones BALB/c no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona basal entre enriquecidos y controles, ni en las respuestas conductuales ante la exposición a un olor de depredador (gato) en la jaula de los animales, sin embargo, la respuesta de corticosterona en respuesta a este tipo de estrés fue menor en el grupo de ratones enriquecidos respecto a los animales control (Roy et al., 2001).

El EA también muestra efectos beneficiosos revertiendo los déficits causados por el estrés prenatal y la separación materna en la actividad del eje HPA. En el estudio de Morley-Fletcher et al. (2003) el enriquecimiento aumentó las conductas sociales de juego en ratas adolescentes y redujo la reactividad del eje HPA en ratas que habían sufrido estrés prenatal. Francis et al. (2002) criaron a las ratas en una situación de EA desde el destete hasta el día 70 de vida y encontraron que el tratamiento de enriquecimiento revirtió los efectos de la

separación maternal (3h/día, 2-14 días de vida) en el eje HPA y las respuestas conductuales al estrés, sin modificar los niveles de expresión de mRNA de CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Los niveles de corticosterona durante y tras el estrés agudo por inmovilización fue significativamente menor en las ratas que habían recibido handling postnatal (H) respecto a las ratas que habían recibido separación maternal (MS), pero no respecto a las ratas MS+EA. En el campo abierto, las ratas MS mostraron una exploración disminuida mientras que las H y MS+EA dedicaron más tiempo a explorar la zona central del aparato que las ratas MS controles. En el paradigma de la neofobia alimentaria, las MS presentaron una mayor latencia de empezar a comer en un ambiente nuevo tras 24 horas de privación de comida que las ratas H o MS+EA. Este estudio mostró que el EA durante la adolescencia revirtió los efectos de la separación maternal en el eje HPA y en las respuestas conductuales al estrés (Francis et al., 2002).

Otros autores encuentran que ratas macho enriquecidas presentan niveles basales y en respuesta a estrés agudo por inmovilización similares de ACTH y CORT que animales aislados (Schrijver et al., 2002). E incluso en el estudio de Moncek et al. (2004) vieron que el EA, consistente en la estabulación de los animales durante 40 días en jaulas grandes, en grupos de 10 individuos, donde los objetos se cambiaban 3 veces a la semana, aumentó el peso de las glándulas adrenales y el contenido de corticosterona adrenal así como las concentraciones de corticosterona basal en ratas wistar macho, sugiriendo que las ratas criadas en un ambiente enriquecido estaban sometidas en cierto modo a un tipo de estrés crónico. La situación de enriquecimiento hace que las ratas estén expuestas permanentemente a una gran variedad de estímulos diferentes en comparación a las ratas estabuladas de forma estándar, lo que puede causar activación hormonal intermitente de forma fisiológica. Aún así, otros datos indicaron que las ratas expuestas al enriquecimiento no desarrollaron las consecuencias negativas para la salud que acompañan al estrés crónico. En este estudio, el timo no había involucionado y las concentraciones de testosterona no habían disminuido. Así, el hecho de que estos animales no presenten alteraciones negativas asociadas a la situación de estrés crónico tal vez indique que el EA puede disminuir las consecuencias negativas de este tipo de estrés. De hecho, el estrés moderado presentado de forma predecible y controlada puede ser beneficioso para el individuo y constituir un tipo de inoculación ante el estrés (Moncek et al., 2004).

Respuesta de Sobresalto

Además del laberinto elevado en cruz que nos permite estudiar la conducta ansiosa, y de la respuesta del eje HPA ante una situación de novedad como es la tabla de agujeros, otra aproximación distinta que permite analizar la reacción emocional es el paradigma de la respuesta de sobresalto. Así, la intensidad de la respuesta de sobresalto puede proporcionarnos una medida de la reacción refleja de ansiedad ante un estímulo incondicionado y nos permite estudiar si los animales pueden habituarse al estímulo que produce la respuesta de sobresalto (Faraday, 2002).

No encontramos diferencias de sexo en la magnitud de la respuesta de sobresalto, lo que contrasta con algunos estudios con ratas Wistar y Sprague-Dawley, que apuntan a una respuesta de sobresalto mayor en machos que en hembras (Lehmann et al., 1999b; Aguilar et al., 2003), aunque otro estudio con ratas wistar evaluadas a los 60, 100 o 300 días de edad no encontró diferencias de sexos en la respuesta de sobresalto (Borrell et al., 2002). No obstante debemos tener en cuenta que los datos brutos mostraron que los machos realizaron una mayor respuesta de sobresalto que las hembras, no obstante cuando se incluyó el peso de los animales como covariable en el análisis general las diferencias de sexo desaparecieron. La gran diferencia media de pesos entre los machos y hembras puede explicar en parte la diferencia observada en los valores brutos de la respuesta de sobresalto debido a las características del sistema de transducción, a mayor peso del animal mayor respuesta de sobresalto observada debido a que el sensor detecta un mayor cambio en la respuesta. No obstante, en los determinados trabajos no se hace referencia a este tipo de cuestiones técnicas, con lo que no debemos descartar que probablemente, algunas de las diferencias observadas por algunos autores en cuando a la mayor reactividad de la respuesta de sobresalto de los machos se deban, en parte, a este tipo de factores que estén interviniendo en el registro de los resultados, ya que lo que detecta el aparato es un cambio global en la fuerza que ejerce el animal sobre los mecanismos de detección. Este hecho se halla superado en el estudio con humanos, donde se realizan otro tipo de medidas más sutiles, por ejemplo mediante la colocación de electrodos para el registro electromiográfico de la respuesta de parpadeo (Ludewig et al., 2003) En algunos estudios con humanos no se han encontrado diferencias en respuesta de sobresalto entre hombres y mujeres (Swerdlow et al., 1993; Ludewig et al., 2003), e incluso el estudio de Kofler et al. (2001) se encontró que los machos realizaban menores respuesta de sobresalto que las hembras, con lo que

estos resultados con humanos van en el sentido opuesto a los resultados provenientes de los estudios con ratas en los que la respuesta global de organismo es medida, con la posible influencia del peso en los registros.

Nuestro tratamiento de EA no afectó la reactividad en la respuesta de sobresalto, en consonancia con los resultados de Schneider et al. (2006) que tampoco halló diferencias en esta variable a causa del EA. Se ha visto que otras intervenciones tampoco producen efectos en la respuesta de sobresalto, como el caso de la separación maternal (Lehmann et al., 1999a). En el estudio de Lehmann et al. (1999a) las crías fueron separadas de sus madres durante 24 horas seguidas el día postnatal 4, o el día 9, o el día 18 y se estudiaron los efectos derivados de esta intervención en varios parámetros conductuales, entre ellos la respuesta de sobresalto. Encontraron que el tratamiento de MS no afectó a la respuesta de sobresalto, de modo que todos los grupos mostraron la misma reactividad emocional. En cambio en el estudio de Varty et al. (2000), ratas enriquecidas y ratas aisladas socialmente presentaban mayores niveles de respuesta de sobresalto comparadas con las ratas controles estándar. Sorprendentemente, en este estudio no se encontraron diferencias significativas de habituación a lo largo de los ensayos, la respuesta se redujo un 53 % en el grupo control social, un 57% en los animales enriquecidos y un 46 % en el grupo de animales aislados.

En cambio, nosotros no encontramos habituación de la respuesta de sobresalto en ninguno de los grupos experimentales a lo largo de las 12 presentaciones iniciales del estímulo de sobresalto, quizás utilizando una sesión más larga y diseñada específicamente para medir habituación mediante la presentación repetida de estímulos un mayor número de veces podríamos hallar efectos en habituación. De hecho, hemos de tener en cuenta que en el estudio de Varty et al. (2000) comentado anteriormente la cantidad de ensayos para calcular la respuesta de habituación fue mayor que el realizado en nuestro estudio. Así, Varty et al. (2000) midieron la habituación a la respuesta de sobresalto comparando la respuesta presentada durante los primeros 6 ensayos respecto a la intensidad de las respuestas durante los últimos 6 ensayos de la sesión, que estaban separados por 24 presentaciones intercaladas del estímulo de sobresalto. En el estudio de Geyer et al. (1993), el aislamiento social produjo un déficit en la habituación de la respuesta de sobresalto, aunque tal vez diferencias en los parámetros estímulares o en aspectos más generales como la duración de las sesiones puedan explicar la ausencia de habituación observada en nuestros animales independientemente del tratamiento recibido, tal vez utilizando un mayor número de ensayos hubiéramos obtenido una habituación de la respuesta.

Inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto

Probablemente, uno de los resultados más controvertidos de esta investigación apareció en esta prueba que evalúa los filtros atencionales o sensoriomotores. Globalmente el EA disminuyó el porcentaje de inhibición prepulso en machos y hembras respecto a los grupos control. Esto es, los animales no enriquecidos mostraron niveles significativos de inhibición en las tres intensidades de prepulso utilizadas (un 25-30% con el prepulso de 60dB, un 50-55% con prepulsos de 70dB y un 65-70% con prepulsos de 80dB de intensidad). En cambio los porcentajes de inhibición de los animales enriquecidos en los prepulsos de 60 70 y 80dB fueron de 5% (no significativo), 35% y 50-60%, respectivamente. De hecho, los animales enriquecidos inhibieron significativamente menos que los control en las en los ensayos con prepulsos 60 y 80, no observándose diferencias significativas entre los grupos con el prepulso de intensidad máxima.

Globalmente tampoco encontramos diferencias de sexo en los valores de PPI mostrados por los diferentes grupos experimentales. A este respecto, la literatura ofrece resultados contradictorios. Algunos autores encuentran un aumento en el PPI en ratas macho respecto de las hembras (Faraday et al., 1999; Lehmann et al., 2000), mientras que otros no hallan diferencias de PPI en función del sexo (Swerdlow et al., 1993; Ellenbroek et al., 1998). Y en otro estudio donde las ratas son expuestas a una toxina prenatal no se encontraron diferencias de sexo en el porcentaje de inhibición prepulso aunque sí en la edad de aparición de los déficit en ratas, las hembras presentaron más tarde las alteraciones en PPI que los machos, lo que se parece a las diferencias sexuales en cuanto a edad de aparición de los síntomas de la esquizofrenia (Borrell et al., 2002).

Aunque la medida de la respuesta de sobresalto y del PPI se realice en una única sesión debemos tener en cuenta que son fenómenos diferentes y que los efectos en PPI son dissociables de la reactividad al estímulo de sobresalto (Bakshi y Geyer, 1999; Varty et al., 2000).

Hasta ahora, diversas evidencias experimentales indican que modificaciones ambientales afectan el PPI, siendo la más relevante de todas ellas el aislamiento social durante el periodo juvenil y la adultez temprana (desde el destete hasta los 3 meses de edad), que provoca una disminución más contundente y duradera en el PPI (Geyer et al., 1993; Bakshi y Geyer, 1999; Powell et al., 2002), aunque otros procedimientos como la privación

maternal durante la lactancia también altera el PPI (Ellenbroek y Cools, 2002). El presente estudio llega a la misma conclusión pero mediante una manipulación ambiental completamente opuesta a estos procedimientos de privación social y ambientes empobrecidos, basada en un aumento de estímulos sensoriales y sociales durante el desarrollo del sujeto enriquecido. Los resultados obtenidos en PPI mediante el aislamiento social parecen ser muy consistentes, hasta el punto de utilizarse como un modelo para provocar en ratas determinadas alteraciones conductuales que se observan en varios trastornos psicopatológicos, como por ejemplo la esquizofrenia.

Así, dos de los efectos más importantes que se estudian como consecuencia del aislamiento social en ratas son los déficit en filtros sensoriales y el incremento en la actividad locomotora (Powell et al., 2002). En este contexto, el filtro sensoriomotor se refiere concretamente a la capacidad de suprimir una respuesta motora en base a la detección de un estímulo sensorial normalmente acústico o lumínico. Un déficit en este filtro sensoriomotor puede verse reflejado en trastornos de inhibición que provocarían la fragmentación cognitiva y la sobreestimulación sensorial que presentan los pacientes esquizofrénicos. Paradójicamente, encontramos que nuestros resultados replican los observados en animales aislados (Varty et al., 2000). En el estudio de Varty se obtuvo de nuevo una disminución del PPI en ratas a causa del aislamiento social, sin embargo las ratas enriquecidas mostraron niveles similares de PPI que las control estándar (Varty et al., 2000).

Aunque también hay estudios que no encuentran los déficit de PPI en ratas aisladas (Finamore y Port, 2000) e incluso que encuentran un aumento en el PPI por un tratamiento de aislamiento social de 10 días junto con una mayor reactividad emocional (Nunes Mamede Rosa et al., 2005). Asimismo el paradigma de separación maternal tampoco parece obtener resultados consistentes en PPI, no obteniendo diferencias entre animales separados maternalmente y controles (Finamore y Port, 2000; Lehmann et al., 2000).

Por otro lado, hay otros efectos comunes entre manipulaciones tan opuestas como el EA y el aislamiento social. Por ejemplo, tanto las ratas enriquecidas como las aisladas en comparación con las control estabuladas de forma social en grupos de 2-3 en jaulas estándar muestran un incremento de la actividad locomotora y de las estereotipias inducidas por anfetamina, además de un aumento de la dopamina en la corteza cerebral (Bowling y Bardo, 1994). Esto último es especialmente relevante porque se sabe que de entre las vías implicadas en la regulación del filtraje sensorial medido mediante el paradigma de PPI, las proyecciones dopaminérgicas al núcleo accumbens y al mPFC son de gran importancia.

Parece que la regulación del filtro sensorial por parte del mPFC requiere de niveles óptimos de transmisión dopaminérgica, de manera que los déficit en PPI pueden deberse a demasiada o a escasa activación dopaminérgica, resultando una forma de U invertida para los niveles óptimos de actividad de la DA a nivel del mPFC (Zhang et al., 2005). De momento sabemos que el enriquecimiento y aislamiento producen alteraciones en DA mesocortical y en la corteza prefrontal medial (mPFC) (Zhang et al., 2005). Por ello, el estudio de los cambios neuroquímicos en la actividad dopaminérgica en el mPFC de animales enriquecidos y aislados en comparación con grupos de animales criados en condiciones sociales en jaulas estandar aportaría datos relevantes a esa hipótesis y a los mecanismos de acción relacionados con los efectos de estos tratamientos y con la disminución de la inhibición prepulso.

Por otro lado, hay estudios donde parece que, en general, el tratamiento de EA no causa efectos de PPI en ratas que no han sufrido ninguna lesión, pero atenúan los déficit observados en ratas que han sufrido algún tipo de daño. Por ejemplo, Schneider et al. (2006) han mostrado que ratas Wistar macho expuestas en el día 12.5 de gestación (periodo prenatal) al ácido valproico (VPA) muestran una serie de alteraciones conductuales que recuerdan al trastorno autista, como son: menor sensibilidad al dolor, alta sensibilidad a estímulos no dolorosos, disminución de la inhibición prepulso, hiperactividad locomotora con estereotipias, disminución de la actividad exploratoria social y latencia incrementada para conductas sociales.

En contraste con nuestros resultados, el tratamiento de EA ha demostrado ser eficaz atenuando el déficit en PPI observados en estas ratas. El grupo VPA enriquecido presentó un 20% de inhibición prepulso, mientras que el grupo VPA control no mostró inhibición ante el estímulo prepulso de 75dB. Sin embargo, en este estudio los grupos control y control-enriquecido no presentaron diferencia en el porcentaje de inhibición prepulso (Schneider et al., 2006). En estos estudios, parece que en general, el tratamiento de EA no causa efectos de PPI en ratas que no han sufrido ninguna lesión, pero atenuaría los déficit observados en ratas que han sufrido algún tipo de daño, como las ratas del modelo de ácido valproico.

Tampoco debemos obviar otros factores que pueden haber causado estos déficits de PPI en nuestras ratas enriquecidas. Por ejemplo, en un estudio de Weiss et al. (1999) se vio que el simple hecho de estabular los animales en grupos de forma social estándar con una rejilla en el suelo en vez de viruta, bastó para provocar déficits en PPI. Los autores de este estudio sugerían la posibilidad que el suelo de rejilla podría haber actuado como una forma de

estrés crónico de intensidad intermedia, suficiente para provocar el déficit observado en PPI. Debemos tener en cuenta que después del destete, nuestras ratas enriquecidas, pasan a vivir en las jaulas grandes donde el suelo es de rejilla, y tal vez, este haya sido un factor que puede haber influido creando cierto estrés a los animales de forma crónica, a diferencia de los animales control criados en jaulas estándar en contacto directo con la viruta del suelo. Sin embargo, a este respecto, los datos obtenidos en el laberinto elevado en cruz, en la tabla de agujeros y en la respuesta del eje HPA no corroboran esta hipótesis.

Laberinto Hebb-Williams

El laberinto Hebb-Williams ha sido utilizado frecuentemente para detectar cambios en las funciones cognitivas como resultado del tratamiento de enriquecimiento (Winokur, 1998; Kobayashi et al., 2002). Los resultados obtenidos en esta prueba indicaron que: i) las hembras realizaron un número menor de sesiones de entrenamiento que los machos hasta el inicio de las sesiones de resolución de los problemas; ii) no observamos diferencias entre sexos en la resolución de los problemas; iii) el tratamiento de EA mejoró la ejecución de los problemas del laberinto en machos y hembras respecto a los animales control.

Tradicionalmente, en este laberinto se han medido únicamente el número de errores cometidos por los animales, mientras que en nuestro trabajo hemos medido también otras variables que se tienen en cuenta en otros estudios sobre aprendizaje espacial, como son las latencias y las distancias recorridas. En general la variable sexo afecta significativamente en los resultados de latencia, probablemente esto indica una diferencia en la velocidad de carrera entre machos y hembras y no tanto diferencias en rendimiento cognitivo.

Además los efectos significativos del tratamiento se ven en el número de errores y las distancias recorridas, que son las variables tradicionalmente asociadas a la progresión en el aprendizaje. Así, el tratamiento de EA mejoró la ejecución de los problemas del laberinto en machos y hembras respecto a los animales control. Los animales enriquecidos realizaron un menor número de errores y necesitaron recorrer menos distancia para llegar a la meta. Aunque hay estudios que reportan una mejor ejecución por parte de los machos en tareas espaciales como el Morris Water Maze (Berger-Sweeney et al., 1995; Perrot-Sinal et al., 1996), no todos los estudios encontraron diferencias sexuales en habilidad cognitiva en ratas en el laberinto Hebb-Williams (Das y Broadhurst, 1959). Entre los animales control tampoco observamos diferencias entre sexos en el número de errores cometidos a lo largo

de los problemas. Asimismo, el hecho de que las hembras requirieran un menor número de sesiones de entrenamiento, indica que adquirieron el criterio de aprendizaje más rápidamente que los machos, mostrando cierta superioridad en la fase de adquisición de esta tarea espacial. Este resultado contrasta con el obtenido en el estudio de Stanford y Brown (2003), donde los ratones enriquecidos macho necesitaron menos sesiones para llegar a criterio que las hembras enriquecidas, aunque luego no se observaron diferencias entre sexos durante la ejecución de los problemas del laberinto. No obstante, en este estudio tampoco se observaron diferencias de sexos en la adquisición del laberinto en la versión acuática, en la que otros componentes motivacionales parecen estar involucrados. Tal vez el hecho de que las hembras muestren menor reactividad emocional haya podido influir en las primeras sesiones de entrenamiento y haber acelerado el proceso de aprendizaje, aun así nuestras ratas hembra enriquecidas tampoco mostraron una menor emotividad que los machos en el laberinto elevado en cruz o en la respuesta de sobresalto, al igual que las hembras control tampoco difirieron de su respectivo grupo de machos, parece ser que este efecto observado es específico de esta tarea de aprendizaje compleja. O tal vez las hembras de nuestro estudio hayan necesitado de menos sesiones de entrenamiento debido a que el criterio de adquisición era temporal (<90s) y posteriormente observamos que las hembras realizaron los problemas presentando menores latencias que los machos. Las hembras aprendieron más rápido la tarea, sin embargo cuando se enfrentaron a los 12 problemas surgieron las diferencias debidas al tratamiento de enriquecimiento y las hembras enriquecidas resolvieron más eficazmente el laberinto que las hembras control, pero no difiriendo de los machos del mismo tratamiento. De nuevo, las hembras fueron más activas, en el sentido de que recorrieron la distancia de la salida a la meta en un menor tiempo, presentando menores latencias que los machos. De hecho el cálculo de las velocidades entre los diferentes grupos experimentales (los datos no se muestran) indicó que las hembras recorrían más distancia en menos tiempo que los machos.

En este caso el nivel de actividad no influyó en el nivel de ejecución, puesto que no afectó al número de errores que cometían ambos grupos de sujetos, puesto que el grupo de enriquecidos macho también presentó una menor latencia de llegada a la meta respecto al grupo de controles macho.

Con el objetivo de dar una interpretación más funcional y práctica de nuestros datos y siguiendo el procedimientos de Stanford y Brown, (2003) estudiamos cual era el nivel de dificultad implícito en los problemas a través del análisis del número de errores cometidos

en da problema parra todos los animales en conjunto. Dividimos los problemas en 3 niveles de dificultad, de manera que los problemas 1, 3, 4, y 12 fueron los más fáciles, los problemas 2, 6, 8, 9, 10 y 11 fueron los de dificultad intermedia y los problemas 5 y 7 los más difíciles. Esta clasificación es ligeramente diferente a la que realizaron Stanford y Brown (2003), para estos autores los problemas 1, 3, 4 y 12 fueron los fáciles, los problemas 2, 9, 10 y 11 fueron los de dificultad intermedia y los problemas 5, 6, 7 y 8 fueron los mas difíciles. Nuestra clasificación no difirió de la de estos autores en los problemas fáciles, pero vemos que la diferencia entre nuestra clasificación y la de estos autores se basa en 2 problemas concretos, el 6 y el 8, que nosotros clasificamos como intermedios, mientras que ellos clasifican como difíciles. Cuando dividimos los problemas en función del grado de dificultad observamos que los animales enriquecidos no diferían de los controles en los problemas fáciles, en cambio a medida que aumentaba el nivel de dificultad de los problemas, los animales enriquecidos mostraron ser superiores a los controles. Estos efectos pueden ser debidos a un efecto tierra en los problemas fáciles porque los enriquecidos no pueden mejorar más el rendimiento o a un efecto techo en los problemas intermedios y difíciles, donde los animales control llegan a un nivel asintótico (Renner y Rosenzweig, 1987). Estos resultados son consistentes con otros trabajos, que muestran que normalmente no se observan efectos del enriquecimiento en tareas relativamente sencillas, pero sí cuando las exigencias de la tarea aumentan (Escorihuela et al., 1995b; Larsson et al., 2002).

También realizamos otro tipo de análisis con el objetivo de evaluar la memoria de trabajo mediante el análisis de la ejecución a lo largo de la sesión, teniendo en cuenta la evolución de los animales entre los ensayos del 1-6, sin embargo no observamos diferencias entre los grupos en cuanto a la disminución de los errores entre el primer ensayo y el último, todos los grupos mostrando la misma pendiente de la curva, este hecho también fue observado por Dell y Rose en 1986 (citado en Renner y Rosenzweig, 1987) entre animales enriquecidos y aislados, proponiendo que las diferencias entre los animales se debían a una ejecución asintótica por parte de los animales aislados y proponiendo que los animales enriquecidos realizaron menos errores repetitivos pero que no diferían con los aislados en el número de errores iniciales. Tal vez por esta razón no observamos diferencias en nuestros resultados entre animales enriquecidos y controles en la ejecución de los problemas fáciles, debido al menor número de errores repetitivos, aunque es un dato que no hemos analizado.

Parece ser que los factores emocionales no influyen en el aprendizaje en el laberinto Hebb-Williams, como sí hace en el laberinto acuático de Morris. Las diferencias en ejecución no parecen ser debidas a distintos niveles de motivación entre los animales enriquecidos y controles. Se apunta que bajos niveles de motivación aumentarían la conducta exploratoria de los animales y esto interferiría en el resultado, de hecho las medidas de ejecución basadas en el tiempo suelen reflejar conductas no encaminadas a la resolución de problemas, como la exploración, mientras que las basadas en errores serían más válidas reflejando aprendizaje y memoria (Standford y Brown, 2003). Como registramos errores, distancia recorrida y latencia podemos dissociar factores cognitivos y no cognitivos en la ejecución del laberinto. El hecho de que en los problemas fáciles tanto enriquecidos como controles recorran la misma distancia para resolver el laberinto apunta a que no hay diferencias de motivación entre los animales.

Como vemos, en esta tarea de aprendizaje completa, el tratamiento de enriquecimiento afectó de forma positiva a los sujetos, que realizaron la tarea cometiendo un menor número de errores, recorriendo una menor distancia y mostrándose superiores en los problemas que implicaban una mayor complejidad. Asimismo, hemos de tener en cuenta que cuando los animales empezaron el entrenamiento en el Hebb-Williams habían transcurrido 10 meses desde la finalización del tratamiento de EA, los animales tenían 14 meses de edad, lo que sugiere que el enriquecimiento tiene efectos duraderos en tareas de aprendizaje y memoria complejas, incluso 10 meses después de permanecer estabulados de forma estándar.

5. CONCLUSIONES

1. El enriquecimiento ambiental produjo una disminución de pesos en machos y hembras respecto a los animales control. Cuando ampliamos la duración del tratamiento de EA a 12 semanas (Estudio II) respecto a 8 semanas (Estudio I), los efectos del enriquecimiento se hicieron más acentuados en los machos en esta medida.
2. Los machos mostraron una mayor conducta de exploración social hacia los juveniles que las hembras y esta diferencia se acentuó cuando se utilizaron juveniles hembra.

3. El EA aumentó la exploración y el reconocimiento social en los machos y los disminuyó en las hembras.
4. Las hembras presentaron mayores niveles de actividad motora como se muestra por el aumento de la distancia recorrida en el laberinto elevado en cruz y la tabla de agujeros y por la menor latencia observada en la resolución de los problemas del laberinto Hebb-Williams.
5. El EA disminuyó la emotividad de machos y hembras como se muestra por la mayor conducta en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, la mayor exploración durante los primeros minutos de la exposición a la tabla de agujeros y la menor reactividad del eje HPA ante esta última prueba respecto a los animales control.
6. El EA no alteró los niveles basales de las hormonas ACTH y corticosterona.
7. Las hembras mostraron mayores niveles de ACTH y corticosterona basales y en respuesta a la exposición a la tabla de agujeros con respecto a los machos.
8. El EA no afectó a la respuesta ante el estímulo de sobresalto acústico ni la habituación de la respuesta.
9. El EA disminuyó el porcentaje de inhibición prepulso en machos y hembras respecto a los grupos control.
10. Las hembras mostraron una adquisición más rápida del aprendizaje en el laberinto Hebb-Williams en comparación con los machos.
11. El EA mejoró el aprendizaje espacial en el laberinto Hebb-Williams en machos y hembras respecto a los animales control: disminuyó el número de errores, la distancia recorrida y la latencia de llegada a la meta.

III. SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL: Estudio de los efectos del Enriquecimiento Ambiental en la conducta de autoadministración de cocaína

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre la adicción a drogas

La adicción a drogas es una enfermedad crónica y recurrente con consecuencias médicas, sociales y políticas evidentes. La adicción es un trastorno persistente de la función del SNC en la cual se desarrolla un consumo compulsivo de drogas a pesar de las serias consecuencias negativas para el individuo afectado. De acuerdo con el manual diagnóstico (DSM-IV, Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales) de la American Psychiatric Association (APA), los síntomas básicos de la dependencia a sustancias son: 1) el desarrollo de tolerancia tras el consumo repetido, 2) la presencia de abstinencia debido a la retirada de la droga, 3) la escalada en el patrón de consumo asociado a la dificultad de reducir el consumo, 4) el deseo de dejar de consumir, 5) el empleo excesivo de tiempo o recursos mentales para la obtención de la sustancia, 6) la reducción en las actividades sociales, y 7) la toma de la sustancia a pesar de las consecuencias negativas asociadas al consumo. Así, el trastorno adictivo se caracteriza por el uso compulsivo y crónico de la droga, por la dificultad de dejar de consumir, y por una mayor probabilidad de recaer al consumo incluso tras largos periodos de abstinencia (Hyman y Malenka, 2001).

La gama de sustancias que pueden generar este tipo de dependencia es amplia, y actualmente los agentes primarios de abuso son opiáceos, cocaína, anfetaminas, marihuana, alcohol y nicotina. Un informe realizado por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT), calcula que unos 10 millones de europeos, es decir, más de un 3 % del total de la población adulta, han consumido cocaína al menos una vez en la vida. Los porcentajes nacionales de personas que admiten haber consumido esta sustancia varían entre un 0.5% y un 6%, y a la cabeza de la clasificación están Italia (4,6%), España (5,9%) y el Reino Unido (6,1%). Se estima que unos 3,5 millones de adultos han consumido cocaína durante el último año, es decir, un 1% del total de la población adulta (OEDT, 2006).

La adicción a drogas es un trastorno complejo en el que interactúan diversos factores. Múltiples variables genéticas y su interacción con el ambiente modulan la vulnerabilidad a la adicción (Kreek et al., 2005), de modo que se hace necesario estudiar los factores de

riesgo que intervienen en el inicio del consumo de drogas y en la progresión hacia la adicción. Además, el consumo de drogas provoca cambios neurobiológicos, y se encuentra asociado a otros trastornos psiquiátricos y rasgos de personalidad, así como de respuesta al estrés. De todas formas, hay que tener en cuenta que no todas las personas que experimentan con drogas desarrollan adicción; de hecho, sólo un 15-17 % de los consumidores de drogas cumplen los criterios definidos en el DSM-IV (Anthony et al., 1994).

Como comentamos anteriormente, la vulnerabilidad a desarrollar estos patrones de consumo incontrolado depende de una combinación de múltiples factores, tanto genéticos como ambientales (Kreek et al., 2005). Mientras que los estudios epidemiológicos muestran que los factores genéticos contribuyen en un 30-60% a la vulnerabilidad a sufrir adicción, además se ha visto que existen factores ambientales que influyen en las diferentes etapas del proceso adictivo, ya sea en la adquisición o inicio del consumo, en el uso regular y la dependencia, y también en la tendencia posterior a la recaída, incluso tras largos periodos de abstinencia (Tsuang et al., 1999).

Aunque la neurobiología de la adicción no se conoce de forma completa, sabemos que para la cocaína y muchos otros agentes de abuso los efectos adictivos involucran la activación de receptores dopaminérgicos en regiones encefálicas críticas que participan en la motivación y refuerzo (Koob et al., 1998). Las más importantes de estas áreas son el sistema mesolímbico dopaminérgico, y más especialmente las proyecciones que van desde el área tegmental ventral hacia el núcleo accumbens. Agentes como la cocaína parecen actuar elevando las concentraciones de dopamina en estas áreas, lo cual hace que este transmisor se encuentre más disponible para los receptores al interferir en la recaptación de la dopamina liberada en la sinapsis mediante su acción en el transportador de la dopamina (Zhu et al., 2005).

La exposición crónica a drogas de abuso causa cambios persistentes en el cerebro a diferentes niveles, incluyendo cambios en la expresión de genes y de sus proteínas resultantes, así como en los sistemas neuronales y en la conducta del individuo; por tanto, establecer los mecanismos implicados en la vulnerabilidad a la adicción es una tarea crucial en el diseño de intervenciones preventivas en la comunidad que disminuyan el impacto social de este trastorno (Kalivas, 2005).

Por ejemplo, uno de los factores ambientales que hace a un individuo más vulnerable al abuso de drogas es el estrés, de manera que se ha descrito una gran asociación entre

estresores psicosociales durante la infancia y un incremento en el riesgo de sufrir depresión, ansiedad y abuso de drogas en la etapa adulta (Kendler et al., 2000). Adultos que han experimentado situaciones de abuso o negligencia durante la infancia presentan un mayor riesgo de sufrir adicción a drogas durante la adultez (Dinwiddie et al., 1992). A este respecto, una forma de estudiar cómo los efectos de las influencias ambientales durante las primeras etapas de vida afectan a la vulnerabilidad a la adicción en la etapa adulta es mediante el uso de modelos animales, y un modelo animal muy utilizado en el estudio de las adicciones es el paradigma de la autoadministración intravenosa de drogas, en el cual el animal es entrenado a realizar respuestas operantes que resultan en la infusión de la droga a través de un catéter implantado a nivel intravenoso. Mediante este modelo el sujeto se autoadministra la cantidad de droga que elige y se evitan otros factores indeseables asociados a la administración de la droga por parte del experimentador, como las inyecciones no contingentes o el procedimiento de las dos botellas donde la palatabilidad de la sustancia puede influir en el consumo. Por ello, se considera que el paradigma de la autoadministración intravenosa es el más representativo del consumo de drogas en humanos, y además este paradigma permite también el estudio de las distintas fases que intervienen en el proceso adictivo, como son la adquisición, el mantenimiento, el incremento en el consumo, la dependencia, la retirada, la recaída y el tratamiento (Carroll et al., 2004).

1.2. Efectos del EA en la conducta adictiva

Algunos autores han mostrado que el enriquecimiento ambiental durante el desarrollo también puede influir en la sensibilidad de los animales a las drogas de abuso así como a la vulnerabilidad a desarrollar patrones de consumo adictivos (Bowling y Bardo, 1994), pero hasta el momento hay muy pocos estudios que hayan evaluado los efectos del EA en el modelo de autoadministración intravenosa. Bardo et al. (2001) evaluaron la conducta de autoadministración de anfetamina intravenosa en ratas macho y hembra que habían sido criadas en condiciones de aislamiento, en grupos de 8-10 individuos en jaulas estándar y en grupos en jaulas de enriquecimiento. Las ratas permanecían en estas condiciones desde el destete y el experimento empezó a los 51 días de edad. Observaron que el enriquecimiento disminuía la autoadministración de anfetamina a dosis bajas (0.03 mg/kg infusión) en los machos y en las hembras en comparación con las ratas aisladas, pero no aparecieron

diferencias significativas entre las ratas sociales estabuladas en jaulas estándar y las ratas enriquecidas. En el trabajo de Green y colaboradores (2002) el enriquecimiento también disminuyó la autoadministración de anfetamina en ratas cuando se utilizaron dosis bajas de droga en programas de razón fija 1 (FR1) (0.006mg/kg infusión) y de razón progresiva (PR) (0.02 mg/kg infusión) en comparación con las ratas criadas en condiciones de aislamiento. En cambio las respuestas para dosis elevadas de anfetamina fueron similares en las dos condiciones de crianza, lo que parece indicar que el enriquecimiento puede ejercer un papel protector reduciendo el consumo de anfetamina a dosis bajas (Green et al., 2002).

En relación al estudio de las otras fases del proceso adictivo en el paradigma de la autoadministración de drogas, se ha evaluado la extinción y la recaída en ratas enriquecidas que se habían autoadministrado anfetamina. Así, se vio que tras el consumo intravenoso de anfetamina, las ratas enriquecidas en comparación con las ratas aisladas, presentaron una extinción más rápida y menos sensibilidad al efecto reforzante de la droga en la recaída, de manera que necesitaron dosis más altas de anfetamina para volver a reinstaurar el consumo, lo cual estaba indicando una reducción en el incentivo motivacional de la anfetamina (Stairs et al., 2006).

A pesar de que estos estudios apuntan hacia una disminución del consumo de anfetamina en las ratas enriquecidas, los estudios dedicados a examinar los efectos de otro tipo de sustancias psicotrópicas son escasos. Shenk et al. (1987b), compararon el consumo de cocaína intravenosa entre ratas aisladas y ratas criadas de forma social, y los resultados indicaron que las ratas aisladas se autoadministraban más dosis de cocaína con respecto a las ratas criadas en condiciones sociales. Sin embargo, en el paradigma de las dos botellas colocadas en la jaula de estabulación, en donde el animal puede decidir entre consumir el agua de una botella o la solución con droga contenida en la otra, se vio que los animales enriquecidos ingerían más cantidad de cocaína que los aislados, mientras que no se observaron diferencias entre los dos grupos cuando se estudió el consumo de morfina con respecto al de agua (Hill y Powell, 1976). Además, las ratas enriquecidas también muestran un mayor condicionamiento por preferencia de lugar (CPP) ante la administración de anfetamina y de morfina que las ratas aisladas (Bowling y Bardo 1994). Parece ser que, por lo tanto, los efectos del enriquecimiento ambiental dependen del grupo de referencia con que se comparen, del tipo de droga estudiada y del paradigma utilizado para medir el consumo de droga. Por ejemplo, se ha visto que el enriquecimiento ambiental aumenta el

consumo de alcohol y sacarina en el paradigma de las dos botellas respecto a animales estabulados en grupos (Rockman et al., 1986,1988; Fernandez-Teruel et al 2002a), pero disminuye el consumo de barbital respecto a los animales aislados (Zimmerberg y Brett, 1992).

En el estudio de Boyle et al. (1991) no se observaron diferencias en la autoadministración de cocaína entre el grupo social y el aislado aun cuando el aumento de la actividad locomotora tras la inyección de cocaína fue mayor en el grupo de animales sociales. Este resultado sugirió que las condiciones de crianza modificaron la sensibilidad de las ratas a las propiedades estimulantes de la cocaína relacionadas con la estimulación de la actividad motora, pero no modificaron las propiedades reforzantes de la cocaína en el paradigma de la autoadministración. Esta disociación entre los efectos estimulantes en la actividad motora y los efectos reforzantes de las drogas se ha observado también con otros paradigmas y con otro tipo de sustancias; por ejemplo, la administración de morfina produce menos alteraciones locomotoras en animales enriquecidos que en animales aislados; sin embargo, los animales enriquecidos presentan mayor condicionamiento de preferencia de lugar por la administración de agonistas κ opioides en comparación con el grupo de animales que han sufrido aislamiento (Smith et al., 2003). En el estudio de Gehrke et al. (2006), las ratas fueron aisladas o enriquecidas desde el destete hasta los 55 días de vida y entonces se las trató con dosis altas de metanfetamina que provocaban una disminución monoaminérgica (10 mg/kg cada dos horas, 4 inyecciones en total). Ocho días después se midieron la hiperactividad locomotora inducida por la metanfetamina y el condicionamiento de lugar (0.3 o 1mg/kg); las ratas enriquecidas mostraron un aumento de la actividad motora en respuesta a la metanfetamina tras sesiones repetidas de condicionamiento, pero este efecto no se observó en las ratas aisladas. Por contra, las ratas enriquecidas no mostraron condicionamiento de preferencia de lugar tras la administración de dosis bajas de metanfetamina mientras que sí apareció en las ratas aisladas (0.3 mg/kg) sugiriendo que los efectos reforzantes de la metanfetamina se habían anulado por la combinación con el enriquecimiento (Gehrke et al., 2006).

Por otro lado, se ha visto que el enriquecimiento modifica algunos efectos conductuales de la anfetamina. Así, la administración aguda de anfetamina produce un mayor incremento de la actividad locomotora en las ratas enriquecidas en comparación con las aisladas (Hill y Powell, 1976; Bowling et al., 1993; Bowling y Bardo, 1994; Bardo et al., 1999). Aunque, por el contrario, las ratas enriquecidas comparadas con las ratas aisladas muestran una

disminución de la sensibilización locomotora en respuesta a inyecciones repetidas de amfetamina (Bardo et al., 1995; Smith et al., 1997). Por tanto, parece ser que el EA produce un aumento en los efectos iniciales de la amfetamina mientras que atenúa los efectos de la administración repetida. Todo ello indica además que la sensibilidad a los efectos agudos de la droga no parece ser un predictor adecuado del patrón de autoadministración repetida de la droga.

A nivel neuroquímico, se ha visto que el EA altera el sistema mesolímbico dopaminérgico, que media los efectos motivacionales o reforzantes de varios tipos de estímulos. Por un lado, las ratas enriquecidas en comparación con las ratas aisladas presentan una mayor utilización de glucosa en el núcleo accumbens tras la exposición a un ambiente nuevo (Gonzalez-Lima et al., 1994); por otro lado, las ratas enriquecidas fueron más sensibles que las ratas aisladas a la disminución del metabolismo de DA en el núcleo accumbens inducida por la administración de amfetamina (Bowling et al., 1993).

1.3. Diferencias de sexo en conducta adictiva

Hombres y mujeres difieren en las respuestas conductuales, biológicas y subjetivas a varias drogas de abuso. Datos clínicos indican que las mujeres inician el consumo de cocaína antes que los hombres, sufren más intoxicación tras niveles similares de consumo de alcohol y tardan menos tiempo a desarrollar una adicción a cocaína, opiáceos y alcohol que los hombres (Lex, 1991). Estos resultados clínicos se han replicado en estudios experimentales con animales de laboratorio. Por ejemplo, utilizando el paradigma de la autoadministración, las ratas hembra tienden a ser más vulnerables a los psicoestimulantes durante varios estadios del proceso adictivo, como por ejemplo, durante las primeras sesiones de adquisición (Lynch y Carroll, 1999; Roth y Carroll, 2004; Jackson et al., 2006), durante la fase de mantenimiento del consumo, donde las ratas hembra presentan una transición más rápida hacia la toma incontrolada de droga, así como durante la recaída (Lynch y Carroll, 2000).

También se ha visto que en ratas y monos los tratamientos conductuales o farmacológicos reducen el consumo de drogas en mayor proporción en las hembras en comparación con los machos (Campbell et al., 2002; Cosgrove et al., 2002; Cosgrove y Carroll, 2003).

Las razones de las diferencias sexuales en el consumo de drogas no están claras. En humanos, se ha visto que las hormonas sexuales contribuyen a estas diferencias de sexo

(Lynch et al., 2002), pero es posible que también sean un reflejo del cambio en los patrones socioculturales (Brady y Randall, 1999). Los modelos animales de autoadministración de drogas son importantes para ayudar a esclarecer la causa de estas diferencias de sexo en el uso y abuso de drogas y los procesos en que se sustentan, porque ellos proveen ambientes controlados de autoadministración donde se eliminan factores socioculturales y de consumo previo de otras sustancias. Por ejemplo, es casi imposible estudiar la iniciación al uso de drogas ilegales en humanos, a no ser que sea por la información retrospectiva del paciente o por estudios longitudinales, por lo que los estudios experimentales en animales centrados en la adquisición de la autoadministración de drogas pueden ayudar a determinar los factores de vulnerabilidad que determinan el inicio del consumo en humanos (Roth et al., 2004). En el presente trabajo nuestro interés principal fue determinar los efectos diferenciales de la crianza en un ambiente enriquecido sobre el sexo de los individuos.

Los antecedentes indican que, consistentemente, un mayor porcentaje de ratas hembra adquieren la conducta de autoadministración de cocaína (Lynch y Carroll, 1999) y anfetamina (Roth y Carroll, 2004) y de forma más rápida comparadas con ratas macho. Aunque existe algún dato contradictorio, como en el estudio de Caine et al. (2004) donde utilizando una dosis más elevada de droga, paradójicamente los machos adquirieron la conducta de autoadministración de cocaína en menos días que las hembras.

En la fase de mantenimiento de la conducta de autoadministración los resultados no parecen tan consistentes. Por un lado, las hembras consumieron más cafeína que los machos (Heppner et al., 1986) y mantuvieron niveles más altos de autoadministración de cocaína que los machos en un programa de reforzamiento de razón fija 1 (FR1) (Lynch y Carroll, 1999). Pero por otro lado, otro estudio mostró que las diferencias de sexos aparecidas en la fase de adquisición de autoadministración de metanfetamina desaparecían en la fase de mantenimiento con FR1 (Roth y Carroll, 2004). Además, el sexo tampoco influyó en la función de la curva dosis-respuesta para autoadministración de cocaína bajo FR5 en ratas (Caine et al., 2004). En general, parece que los programas de reforzamiento de razón baja no son sensibles para detectar diferencias entre sexos en los efectos reforzantes de drogas, mientras que se observan diferencias de sexo más acentuadas bajo programas de refuerzo más exigentes, como los programas de razón progresiva (PR), en los que cada vez se requiere un mayor número de respuestas para conseguir la dosis de droga. Esto es, las ratas hembra alcanzaron mayores niveles de respuesta que los machos bajo este tipo de

programas en la autoadministración de nicotina (Donny et al., 2000), cocaína (Lynch y Taylor, 2004) y metanfetamina (Roth y Carroll, 2004).

Otro de los parámetros utilizados en la valoración del grado de severidad de la adicción es la pérdida de control y el incremento en el consumo que se observa tras un período de estabilidad en la conducta de autoadministración. Con respecto a esto, algunos resultados muestran que las ratas hembra presentan una conducta de consumo más inestable que los machos (Lynch et al., 2002). En un estudio donde las ratas tuvieron acceso continuado a la droga las 24 horas del día durante 7 días, las hembras se autoadministraron mayores cantidades de cocaína y mostraron un mayor descontrol en el consumo diurno (Lynch y Taylor, 2004), así como una mayor progresión en el consumo en comparación con los machos (Ahmed y Koob, 1998, 1999).

Al estudiar la recaída tras un período de extinción, las hembras aumentaron la búsqueda de droga (drug-seeking), y tras una inyección recuerdo o ‘priming’ de cocaína apretaron más veces la palanca asociada a droga en comparación con los machos; además, la dosis de cocaína necesaria para provocar la recaída fue menor en las hembras que en los machos (Lynch y Carroll, 2000). En otro procedimiento donde se pretendió reinstaurar la conducta de autoadministración tras un periodo de abstinencia de 10 días, las hembras presentaron mayores niveles de respuesta bajo un programa de razón progresiva (PR) que los machos (Lynch y Taylor, 2004). De los estudios anteriores se desprende que las hembras pueden adquirir la conducta de autoadministración más rápidamente y pueden autoadministrarse dosis más altas de droga que los machos, al tiempo que parecen ser más vulnerables que ellos a recaer en el consumo de drogas psicoestimulantes.

No obstante, las diferencias de sexo en la autoadministración de opiáceos no están tan claras. El estudio de Lynch y Carroll (1999) mostró que las hembras adquirían la conducta de autoadministración de heroína intravenosa a través de un número de sesiones menor que los machos, aunque en otro estudio no se encontraron estas diferencias de sexo (Stewart et al., 1996). En la fase de mantenimiento, las hembras presentaron mayores niveles de consumo de morfina oral (Hadaway et al., 1979), fentanil oral (Klein et al., 1997) y heroína intravenosa (Carroll et al., 2001) en comparación con los machos. Cicero et al. (2003) también obtuvieron un mayor consumo de heroína y morfina a dosis bajas en ratas hembra que en ratas macho. Pero otros estudios no han descrito diferencias de sexo en la administración de metadona oral en monos (Vivian et al., 1999), y tampoco en la fase de mantenimiento de la autoadministración de heroína en ratas, aun cuando se habían

observado diferencias de sexo durante el período de adquisición (Stewart et al., 1996; Lynch y Carroll., 1999).

Algunos estudios realizados con monos han encontrado diferencias de sexo en la adquisición del consumo de alcohol (Pakarinen et al., 1998). Otros trabajos han descrito que los monos hembra consumían menos alcohol que los machos en la fase de mantenimiento en un procedimiento operante (Vivian et al., 2001), pero en el paradigma de las dos botellas se vio que las hembras consumían alcohol más frecuentemente que los monos (Juarez et al., 1993); además, este último resultado también se ha replicado en ratas (Blanchard y Glick, 1995). En otro estudio hecho con ratas, las hembras presentaron una mayor preferencia por alcohol que los machos y aumentaron su consumo cuando la concentración de alcohol en la botella se dobló (de 5% a 10%) mientras que los machos regularon su consumo (Lancaster y Spiegel, 1992). Parece ser que, en general, las hembras muestran un consumo mayor de alcohol cuando se utiliza el procedimiento de las dos botellas en la jaula, pero no siempre se observaba este patrón cuando se utilizan procedimientos de autoadministración operante (Vivian et al., 2001).

Cuando intentan establecerse los mecanismos de acción de las diferencias sexuales en los patrones de consumo de drogas hay que considerar la contribución de las hormonas sexuales. Los estudios que han evaluado la implicación de la testosterona en la conducta adictiva no obtienen resultados concluyentes (Forgie y Stewart, 1993; Ogilvie y Rivier, 1997); sin embargo, se encuentran resultados más consistentes cuando se evalúan los efectos de los estrógenos y la progesterona. Así por ejemplo, se ha visto que ratas hembra en la fase de estró, cuando declinan los niveles de estrógeno tras el pico máximo alcanzado en proestro, escalan el consumo de cocaína en comparación con las otras fases del ciclo y presentan un punto de corte más elevado que los machos en un programa de razón progresiva (Lynch y Carroll, 2000). Los mismos autores han evaluado el papel de los estrógenos comparando la adquisición de autoadministración de cocaína en ratas hembra ovariectomizadas con ratas hembra control y observando que el porcentaje de ratas que adquirirían la conducta de autoadministración era mayor en el grupo control (Lynch et al., 2001).

A nivel neuroquímico, un efecto común de las drogas de abuso es que directa o indirectamente incrementan los niveles de dopamina en el estriado (Koob et al., 1998), y en esta región se han descrito diferencias entre sexos (Becker, 1999); por ejemplo, se estudiaron fragmentos de tejido del estriado 'in vitro' y se observó que el relevo de

dopamina estimulado por anfetamina fue mayor en hembras que en machos (Becker y Ramírez, 1981). También se han descrito mayores concentraciones de dopamina en otras áreas cerebrales, como la médula, el puente, el talamo y el hipotálamo en hembras en comparación con machos (Das y Chaudhuri, 1995), lo cual sugiere que múltiples regiones del cerebro pueden estar contribuyendo a las diferencias sexuales en el consumo de drogas. Además, en algunos casos se ha comprobado que las diferencias de sexo persisten en la ausencia de hormonas sexuales, más concretamente, el funcionamiento de dopamina entre machos castrados y hembras ovariectomizadas fue significativamente distinto (Castner et al., 1993; Bazzett y Becker, 1994).

Por último, también comentar que diversos estudios han encontrado diferencias sexuales en la respuesta a tratamientos encaminados a reducir el consumo de drogas. Por ejemplo, las ratas hembra responden mejor a tratamientos farmacológicos que los machos. Campbell et al., (2002) encontraron que ratas hembra mostraron más sensibilidad a los efectos de un tratamiento con baclofen, un agonista GABAérgico (GABA_B), las ratas hembra tratadas con baclofen adquirieron la autoadministración de cocaína más lentamente que los machos y además disminuyó el porcentaje de hembras que adquirieron la autoadministración en comparación con los machos, mientras que el grupo de hembras control de este experimento adquirió la autoadministración en menos sesiones que los machos. También se ha encontrado que las hembras presentan una mejor respuesta ante tratamientos no farmacológicos, por ejemplo las ratas hembra presentaron una mayor supresión de la conducta de autoadministración de cocaína ante la presencia de un reforzador alternativo como una rueda de actividad (Cosgrove et al., 2002), e incluso en un experimento con monos rhesus se encontró que las hembras mostraron una reducción mayor en el consumo de PCP que los machos ante la presencia de sacarina como reforzador alternativo, en programas de refuerzo de dosis bajas (Cosgrove y Carroll, 2003).

1.4. Actividad motora inespecífica

Finalmente, resultados obtenidos por otros autores (Fiala et al., 1977; Black et al., 1989; Pham et al., 1999; Moncek et al., 2004;), así como los datos de los Estudios I y II del presente trabajo muestran que el tratamiento de EA disminuye el peso de los animales de forma duradera, y se ha sugerido que la disminución de peso como consecuencia del enriquecimiento que se observa de manera consistente en estos estudios, especialmente en

los machos, puede ser debida principalmente a dos factores: un aumento de la actividad motora inespecífica o una disminución en la ingesta de alimentos.

Así, diversos autores han indicado que las ratas enriquecidas muestran diferentes patrones de actividad que las ratas aisladas, de manera que en algunos casos las ratas enriquecidas presentan una menor actividad locomotora ante una situación de novedad respecto a las ratas aisladas (Jones et al., 1990; Bowling et al., 1993; Smith et al., 1997). Las ratas enriquecidas también entraron en un compartimento nuevo, manipularon objetos nuevos y se habituaron más rápido a los nuevos estímulos que las ratas aisladas (Renner y Rosenzweig, 1986a; Zimmermann et al., 2001). Parece ser que estas diferencias en las respuestas a la novedad pueden contribuir a las diferencias en la vulnerabilidad al abuso de drogas (Zhu et al., 2005), con lo cual tal vez el nivel de actividad basal también sea un factor relacionado con el consumo de drogas. Así, con el fin de descartar diferencias en el consumo de alimento que podrían evidenciar diferencias en los sistemas motivacionales básicos evaluamos la conducta de ingesta en los animales de esta serie experimental. También diseñamos un estudio para medir la conducta locomotora inespecífica durante las 24 horas del ciclo luz-oscuridad en la propia jaula de los animales, y en la misma sala donde estaban estabulados, con el fin de obtener una medida lo más real posible de actividad basal inespecífica. Los estudios destinados a responder a la pregunta de si el enriquecimiento cambia el nivel de actividad inespecífica de los animales han sido escasos, si bien se considera que los animales realizan mayores niveles de actividad en la situación de enriquecimiento, no se sabe si al cambiar las condiciones de estabulación y permanecer en jaulas estándar estas diferencias en actividad permanecen. En el estudio de Martínez-Cué et al. (2002) se evaluó la actividad locomotora inespecífica durante 24 horas en un modelo murino del Síndrome de Down, el ratón Ts65Dn, en respuesta al enriquecimiento, y se encontró que el EA afectó diferencialmente a machos y hembras, disminuyendo la actividad en las hembras trisómicas y aumentándola en los machos trisómicos. Asimismo, también se encontraron diferencias de sexo en los animales no trisómicos en respuesta al enriquecimiento, las hembras normales enriquecidas aumentaron la actividad basal en comparación con las hembras normales no enriquecidas, mientras que los machos normales enriquecidos tendieron a mostrar una reducción de la actividad respecto a los machos normales no enriquecidos.

En el presente estudio y con el fin de determinar la habilidad de las ratas enriquecidas y controles para ejecutar respuestas operantes para obtener un refuerzo diferente a la droga

también realizamos un período de entrenamiento por pellets de comida, como un método de adquisición de la conducta operante y con el fin de facilitar el posterior entrenamiento en la autoadministración de cocaína.

1.5. Planteamiento y objetivos específicos

Las condiciones de crianza de los animales en diferentes ambientes alteran la sensibilidad y el consumo de drogas. Los resultados provenientes del estudio de los efectos del EA en el paradigma de la autoadministración parecen indicar, globalmente, una disminución en los efectos reforzantes de la anfetamina a dosis bajas, con lo cual el EA ejerció un papel protector ante el consumo de anfetamina. No obstante, los efectos del EA en el consumo de otros psicoestimulantes como la cocaína no son tan consistentes y de hecho no encontramos antecedentes en relación al estudio de los efectos del EA sobre la autoadministración intravenosa de cocaína comparando animales enriquecidos respecto a animales estabulados en grupos en condiciones estándar. Además, ya comentamos anteriormente que se ha descrito de forma consistente que las hembras presentan una mayor consumo de drogas en diferentes estadios del proceso adictivo.

Por otro lado, la actividad locomotora está relacionada con la vulnerabilidad al consumo de drogas, y se sabe que generalmente las hembras muestran mayores niveles de actividad que los machos y que el EA suele disminuir la actividad locomotora en situaciones de novedad en comparación a animales aislados. Igualmente, de forma consistente, los resultados presentados en los Estudios I y II confirman que los animales enriquecidos pesan menos que los control, sobretodo las ratas macho. No está claro si estas diferencias de peso se deben a una menor ingesta de alimento por parte de los animales enriquecidos con respecto a los controles o a una menor actividad locomotora basal inespecífica por lo que también nos propusimos evaluar estos parámetros en nuestros animales; así como su conducta en el aprendizaje de una tarea de condicionamiento operante por comida para detectar posibles diferencias en la motivación por refuerzos naturales que de base pudieran relacionarse con las posibles diferencias en la autoadministración de drogas.

Por todo lo comentado anteriormente, los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

- i) Estudiar los efectos del EA en la actividad locomotora basal inespecífica de machos y hembras.
- ii) Estudiar los efectos del EA en la ingesta de comida en machos y hembras
- iii) Estudiar los efectos del EA en la conducta operante de autoadministración de comida en machos y hembras
- iv) Estudiar los efectos del EA en la adquisición y el mantenimiento de la autoadministración intravenosa de cocaína en machos y hembras.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Sujetos

Se utilizaron ratas Spague-Dawley de ambos sexos procedentes del estabulario general de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales se destetaron a los 21 días, el día 23 fueron pesados y distribuidos en los diferentes grupos experimentales. Las ratas destinadas al tratamiento de Enriquecimiento Ambiental (EA) se colocaron por sexos en grupos de 13 en jaulas de enriquecimiento (100 x 43 x 50 cm.), mientras que las destinadas a los grupos control se distribuyeron en grupos de 2 machos o 2-3 hembras en jaulas de macrolon estándar (50 x 25 x 14 cm.). A partir de la cuarta semana tras el inicio del tratamiento todos los animales fueron pesados semanalmente. Al finalizar las 12 semanas de tratamiento de EA todos los animales fueron estabulados individualmente en jaulas estándar. Las condiciones ambientales de estabulación de los animales eran de un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con comienzo de la luz a las 08:00h. La temperatura se mantenía constante a $22\pm 2^{\circ}$ C y la comida y el agua se administraron *ad libitum*, excepto durante el entrenamiento de autoadministración operante de comida. Todas las pruebas, excepto la actimetría y las sesiones iniciales del entrenamiento con refuerzo por comida se realizaron durante la fase de luz del ciclo.

2.2. Procedimiento general

2.2.1. Enriquecimiento Ambiental

Para el tratamiento de EA se utilizó el mismo procedimiento descrito en el capítulo I. Los sujetos se mantuvieron en esta situación durante 12 semanas a partir del destete. Una vez finalizado el tratamiento los animales fueron colocados individualmente en jaulas de macrolon estándar (25 x 25 x 14cm.).

2.2.2. Pruebas

2.2.2.1. Actimetría

El aparato consiste en una placa horizontal y dos cuadros de células fotoeléctricas distribuidas a modo de cuadrados concéntricos que detectan el movimiento y permiten medirlo automáticamente. Registramos la actividad motora espontánea del animal ininterrumpidamente a lo largo de un ciclo de luz-oscuridad durante 23:30 horas mediante cuatro placas de actimetría controladas por el programa Actitrack (Panlab, S.L., Barcelona). Entre las 9:30-10 h se colocaba la jaula con el animal sobre la placa; previamente habíamos retirado una parte de la viruta de la jaula con el fin de evitar artefactos en la recogida de datos. El animal tenía acceso a comida y agua *ad libitum* durante todo este periodo. Las mediciones se realizaron en la misma sala donde estaban estabulados los animales.

2.2.2.2. Ingesta de comida y peso de los animales

El día de inicio de este experimento se pesó la cantidad de comida en cada jaula y se registró el peso de los animales. Durante las 4 semanas posteriores, cada 3-4 días se pesaban los animales y la comida restante que había en cada jaula, y se restablecía la comida hasta unos 250 gr si quedaba demasiado poca. La comida consumida (en gramos) se dividía por el número de días que habían pasado desde el último registro para calcular así una medida del consumo medio diario del animal.

2.2.2.3. Cajas de Autoadministración operante

En esta prueba se utilizaron 4 jaulas modulares de condicionamiento operante (25cm x 25 cm x 25cm; LE1005, Panlab S.L., Barcelona, España). Cada jaula estaba colocada dentro de otra caja de insonorización con un aparato de ventilación para atenuar el sonido exterior. Cada una de las jaulas se iluminaba con una luz roja (1.2W, 24V) situada en la parte

superior de un panel colocado en el lado derecho; en este panel también había una apertura situada a 4 cm del suelo donde se podía colocar una botella de agua. En el panel del lado izquierdo de cada jaula había un receptáculo de 3.5 x 3.5cm, a través del cual se suministraban los pellets de comida al animal mediante un suministrador de pellets situado en la parte externa de la jaula. A cada lado del dispensador de comida a 4 cm del suelo de rejilla había dos palancas de metal, la palanca designada como activa era retráctil mientras que la palanca inactiva era fija, en dos jaulas la palanca activa se situaba en la derecha y en las otras dos en la izquierda; encima de cada palanca, un disco de 4 cm de diámetro que se iluminaba mediante una bombilla de 2.4W, 24V, servía como estímulo discriminativo para señalar la presentación inminente del refuerzo, el cual también iba acompañado de la emisión de un tono de 2900 Hz, 80dB. El generador del tono se localizaba en medio de las dos luces. Las infusiones de cocaína se administraban mediante una jeringa de 20 ml situada en la parte externa de la superficie de la caja de insonorización, controlada por una bomba. El émbolo de la jeringa se conectaba mediante un tubo de plástico con el catéter del animal; este tubo estaba colocado en el interior de otro tubo flexible de malla metálica (para evitar que el animal lo dañara) que se enroscaba en la parte externa del catéter. El aparato y la recogida de datos eran controlados por el programa Pakwin (Panlab S.L., Barcelona, España).

2.2.2.4. Entrenamiento de refuerzo por comida

Aproximadamente 10 días antes del inicio del entrenamiento con refuerzo de comida se restringió la alimentación del animal, su peso fue gradualmente reducido al 85% y se mantuvo a este nivel durante todo el entrenamiento.

Como paso previo a la auto-administración de cocaína, las ratas fueron entrenadas a responder por bolitas de comida o ‘pellets’ (45 mg pellets; Bio-Serv, Frenchtown, NJ, USA). Se realizaron sesiones diarias en las que la rata debía apretar la palanca designada como ‘activa’ para obtener un pellet de comida. Las respuestas en la palanca inactiva no tenían ninguna consecuencia pero eran registradas. La sesión inicial consistía en una sesión nocturna de 14 horas (de 19:00-9:00h), al inicio de la cual se administraban 10 pellets no contingentes (1 cada 50 segundos). La sesión empezaba con la aparición de la palanca retráctil y la iluminación de la luz situada en el panel derecho o ‘luz de cámara’, la palanca inactiva ya estaba extendida pero ninguna de las luces de encima de las palancas estaba encendida. Si la rata apretaba la palanca activa se le suministraba un pellet a través del

dispensador, se encendía la luz situada encima de la palanca activa y se presentaba un sonido que también indicaba la aparición del refuerzo durante 5 segundos, a este período lo denominamos 'pellet'. Inmediatamente después cesaba el sonido y tanto la luz de la palanca activa como la de cámara se apagaban durante 10 segundos, a este periodo lo denominamos 'tiempo fuera'. Durante el total de estos 15 segundos ('pellet' + 'tiempo fuera') las respuestas del animal en cualquier palanca no producían ninguna consecuencia pero eran registradas para su posterior análisis. Utilizamos un programa de entrenamiento de razón fija 1 (RF1+15 s de no contingencias). Cuando acababa el período de tiempo fuera se volvía a encender la luz de cámara y la secuencia comenzaba de nuevo (si el animal aprieta la palanca activa recibe el refuerzo + un período de no contingencias de 15 segundos, etc). Si el animal respondía en la palanca activa durante el tiempo de administración de los 10 pellets no contingentes se ponía en marcha la secuencia de 5"pellet + 10"tiempo fuera. Esta sesión inicial de 14 horas se repetía un máximo de 3 ocasiones, en las que si la rata no se administraba al menos 50 pellets era eliminada del experimento. Durante esta sesión inicial se colocaba una botella de agua en el panel derecho de la cámara.

Normalmente las ratas necesitaban una única sesión para aprender las contingencias y entonces se realizaban sesiones de 2 horas de duración durante la fase de luz del ciclo, en la primera de las cuales se administraba un pellet no contingente al inicio de la sesión. Estas sesiones de entrenamiento de 2 horas seguían los mismos parámetros definidos anteriormente y continuaban hasta que la rata recibía 100 pellets en tres sesiones consecutivas y sin recibir ningún pellet administrado por el experimentador.

Razón progresiva de auto-administración de comida

Tras la finalización del entrenamiento de refuerzo por comida, los animales realizaron una única sesión de 4 horas bajo un programa de razón progresiva, que se iniciaba recompensando con un pellet la primera palancada pero donde el número de respuestas en la palanca activa para obtener el refuerzo aumentaba progresivamente a razón de 2, 4, 6, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, etc. Analizamos el número de palancadas totales, el número de pellets conseguidos o 'breaking point'(BP) y la última serie de respuestas completada con éxito. La sesión finalizaba a las 4 horas o una hora después del último refuerzo recibido. Al finalizar el entrenamiento de

refuerzo por comida los animales volvieron a las condiciones de alimentación *ad libitum* al menos durante 5 días antes de la cirugía.

2.2.2.5. Implantación quirúrgica del catéter

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (90mg/kg, IP) y xilacina (10mg/kg, IP) y se procedió a la implantación de un catéter en la vena yugular. Los catéteres fueron suministrados por Brian Fromant (St John's Innovation Centre, Cowley Road, Cambridge, UK). El procedimiento de cateterización empezaba con una pequeña incisión en la superficie de la piel situada encima de la vena yugular derecha. Poco a poco el tejido se separaba hasta lograr una apertura de 1-2 cm de largo que permitiera la manipulación correcta de la vena. Una vez localizada la vena se daba la vuelta al animal y se le practicaba un corte de unos 3 cm. en la espalda, en el lugar donde se situaría la parte exterior de la cánula. El tubo del catéter se pasaba de forma subcutánea por la espalda derecha hasta la incisión realizada en el cuello. Tras localizar la vena y limpiarla de los tejidos adheridos a ella se realizaba un pequeño corte, y con la ayuda de un dilatador se introducía el catéter hasta una medida de 3.1 cm, se aseguraba bien mediante tres nudos con hilo de sutura del 5/0 y se colocaba una gotita de pegamento superglue en los nudos. El catéter iba conectado a una jeringa que contenía una solución de 20 UI de heparina/ml y 0.4mg/ml de gentamicina diluidos en 0.9% de solución salina. Se comprobaba la colocación correcta del catéter introduciendo 0.2 ml de esta solución salina en la vena mediante el catéter. Se cerraba la incisión del cuello y entonces se posicionaba correctamente el catéter en la espalda, se suturaba la herida y se tapaba la apertura del catéter mediante un pequeño tapón y una pequeña rosca metálica para evitar que el animal lo dañara. Las ratas permanecieron 4-5 días en período de descanso en sus jaulas antes de empezar el experimento de autoadministración de cocaína. Diariamente se mantenía la viabilidad de los catéteres mediante la introducción de 1ml de solución salina con gentamicina (0.4 mg/kg) y heparina (10UI/kg), antes y después de cada sesión de autoadministración. Al final del experimento se comprobaba el buen funcionamiento del catéter mediante la administración de tiopental (20 mg/ml/kg) y se requería la pérdida del reflejo postural en menos de 5 segundos para considerar correcto el funcionamiento del catéter.

2.2.2.6. Auto-administración de cocaína

Las sesiones de auto-administración tuvieron lugar 5-6 días a la semana y fueron de 2 horas de duración. La cocaína, en forma de clorhidrato (cedida por el Ministerio de Sanidad) se disolvió en 0.9% de salino estéril a una concentración de 0.5mg/0.1ml respecto a la base libre. Inicialmente, las ratas apretaban la palanca para obtener una infusión de cocaína de 0.5mg/kg en un volumen de 0.1ml por infusión administrada bajo un programa de refuerzo de razón fija 1 (RF1), de manera que una respuesta en la palanca activa resultaba en una infusión intravenosa de 100 µl de solución de cocaína durante 5 segundos a través del catéter. Las respuestas en la palanca inactiva fueron registradas pero no produjeron ninguna consecuencia. La luz de cámara se iluminaba al inicio de la sesión, cuando el animal apretaba la palanca activa recibía una infusión de cocaína, se encendía la luz sobre la palanca activa y se presentaba el sonido durante 5 segundos (período ‘infusión’), tras lo cual todos los estímulos cesaban y se producían 10 segundos de oscuridad (período ‘tiempo fuera’), tras lo cual se volvía a encender la luz de cámara y se iniciaba de nuevo la secuencia. También se registraron las respuestas en la palanca activa durante los períodos de ‘infusión’ y de ‘tiempo fuera’, aunque éstas no provocaban ninguna consecuencia. Las ratas permanecieron durante 7 días bajo este programa de refuerzo de razón fija 1. Si la rata se auto-administraba 10 o más infusiones en las sesiones de 2 horas durante un mínimo de 5 días, la razón fija se elevaba a 3 el octavo día y posteriormente a 5 durante los siguientes 5 días (del 9-13). Las sesiones duraban un máximo de 2 horas o finalizaban cuando el animal se administraba un máximo de 50 infusiones, para evitar la sobredosificación.

Razón progresiva de auto-administración de cocaína

Los animales que acabaron la fase de auto-administración de RF5 obteniendo un mínimo de 10 refuerzos por sesión durante las dos últimas sesiones, realizaron después una sesión de 4 horas bajo un programa de razón progresiva (el día 14) (Richardson y Roberts, 1996). Esta sesión comenzaba recompensando con una infusión de cocaína la primera palancada pero a partir de aquí el número de respuestas en la palanca activa para obtener el refuerzo iba aumentando progresivamente a razón de 2, 4, 6, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, etc. Analizamos el número de palancadas totales, el número de infusiones recibidas o ‘breaking point’ (BP) y la última serie de respuestas completada con éxito. La sesión finalizaba a las 4 horas del inicio o una hora después del último refuerzo recibido.

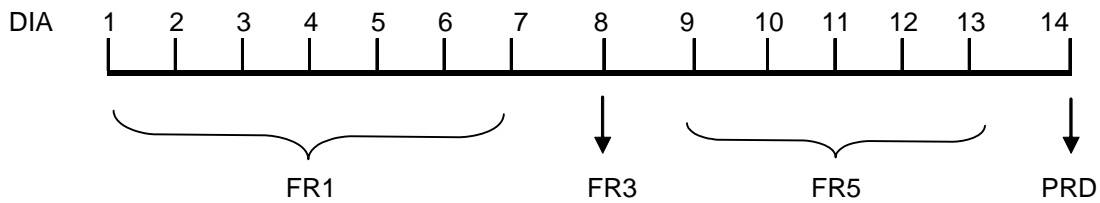


Figura 13. Se muestra la secuencia seguida en el experimento de autoadministración de cocaína durante los 14 días de autoadministración: 7 días en el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1), 1 día en el programa de razón fija 3 (FR3), 5 días en el programa de razón fija 5 (FR5) y un día de razón progresiva (PRD).

2.3. Secuencia experimental

El Estudio III se centró en la evaluación de la conducta de auto-administración operante de comida y cocaína, una vez finalizadas la prueba de actimetría y el control de la ingesta. En la Tabla 1 se muestra la secuencia experimental seguida durante todo el estudio. Inmediatamente después de acabar el tratamiento de EA iniciamos el control de la ingesta de comida a lo largo de 4 semanas y realizamos las pruebas de actimetría para medir la actividad basal inespecífica de los animales. En esta fase inicial del estudio utilizamos 44 animales de los grupos: CM (n=12), CF (n=11), EM (n=9) y EF(n=12). A continuación iniciamos la privación progresiva de comida hasta que los animales redujeron su peso en un 85% y después fueron entrenados a responder por comida. Una vez adquirida la respuesta operante se reestableció la disponibilidad de comida *ad libitum* en las jaulas de estabulación. Seguidamente, los animales se sometieron a la implantación quirúrgica de un catéter en la vena yugular para la realización de los experimentos de autoadministración de cocaína.

En este estudio realizamos una segunda serie experimental de enriquecimiento con el fin de completar la muestra de los grupos experimentales. Inicialmente, la muestra fue de 65 animales, pero se redujo a 63 sujetos porque 1 macho control murió durante la cirugía y una hembra enriquecida no adquirió la conducta operante en el entrenamiento con refuerzo de

comida. La relación de animales incluidos en cada uno de los grupos experimentales en el experimento fue: CM (n=21), CF (n=11), EM (n=19) y EF(n=12).

Todos los experimentos se realizaron en una habitación completamente pintada de negro con una iluminación difusa, excepto la actimetría y el control de ingesta de alimentos, que se realizaron en la sala de estabulación de los animales en las condiciones habituales de iluminación.

Tabla 5. Secuencia experimental. Se muestran los procedimientos seguidos durante el Estudio III, la duración del tratamiento de enriquecimiento ambiental, la edad de los sujetos durante las pruebas de conducta y el número asignado a los experimentos.

Procedimiento	Semanas	Experimento
Destete	Día 21	
Enriquecimiento Ambiental (EA)	4-16	
Actimetría y control de ingesta	17-20	10
Privación de comida	20	
Entrenamiento por refuerzo de comida	21-23	11
Implantación quirúrgica del catéter	24	
Auto-administración de cocaína	25 en adelante	12

2.4. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS (versión 14.0). Los descriptivos se muestran como media \pm error estándar (SE).

Los resultados de la actimetría se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas, con dos factores intersujetos ('tratamiento' y 'sexo') y un factor intrasujetos ('tiempo') con 23 niveles correspondientes a los 23 intervalos de 1 hora en que se agruparon los datos. También analizamos la actividad total acumulada, la actividad total en la fase diurna del ciclo y la actividad total durante la fase nocturna mediante dos ANOVAS de dos factores ('tratamiento' y 'sexo'). En el estudio sobre la ingesta y el peso de los animales a lo largo de los 25 días posteriores a la finalización del tratamiento, los datos se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas con dos factores intersujetos ('Tratamiento' y 'Sexo') y un factor intrasujetos ('día') con ocho niveles correspondientes a los 8 días de registro de comida y pesos.

En el entrenamiento por refuerzo de comida, el número de respuestas en la palanca activa durante los períodos ‘pellet’ y ‘tiempo fuera’, el número total de respuestas en las palancas activa e inactiva, el tiempo total empleado y la tasa de refuerzos durante las sesiones de entrenamiento por comida fueron analizados mediante ANOVAs de medidas repetidas con dos factores intersujetos (‘tratamiento’ y ‘sexo’) y un factor intrasujetos (‘sesión’ con tres niveles, correspondiendo a las 3 últimas sesiones de entrenamiento). El número de sesiones necesarias para llegar a criterio y los datos de la sesión de razón progresiva por comida, referentes al ‘punto de corte’, ‘número total de palancadas activas’, ‘última serie realizada’, ‘palancadas activas durante el periodo pellet’, ‘palancadas activas durante el periodo de tiempo fuera’ y el ‘tiempo total empleado en la sesión’, se analizaron mediante ANOVAs de dos factores (‘tratamiento’ y ‘sexo’).

En la fase de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de razón fija 1 (FR1), el número total de infusiones recibidas, el número de respuestas en la palanca activa durante los períodos ‘droga’ y ‘tiempo fuera’, así como el número total de respuestas en la palanca activa e inactiva durante las sesiones de autoadministración de cocaína fueron analizados mediante ANOVAs de medidas repetidas con dos factores intersujetos (‘Tratamiento’ y ‘Sexo’) y un factor intrasujetos (‘sesión’) con siete niveles, correspondiendo a cada una de las sesiones de autoadministración bajo FR1. El porcentaje de ratas que cumplieron el criterio de adquisición de cocaína fue analizado mediante una prueba no paramétrica Chi-cuadrado.

Con el objetivo de complementar el análisis del estudio, también analizamos los datos de las 7 sesiones de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de razón fija 1 (FR1) únicamente referentes a las 34 ratas que cumplieron el criterio de autoadministración y pasaron a la siguiente fase. El número de infusiones recibidas, el número de respuestas en la palanca activa durante el periodo ‘droga’ y ‘tiempo fuera’, así como el número total de respuestas en la palanca activa e inactiva durante las sesiones de autoadministración de cocaína en los programas de adquisición (FR1) y mantenimiento (FR5) fueron analizados mediante ANOVAs de medidas repetidas con dos factores intersujetos (‘tratamiento’ y ‘sexo’) y un factor intrasujetos (‘sesión’ con siete (FR1) o cinco (FR5) niveles, respectivamente). El análisis de las variables correspondientes a la sesión de FR3 se hizo con ANOVAs de dos factores (‘tratamiento’ y ‘sexo’). Los datos de la sesión de razón progresiva por cocaína referentes al ‘punto de corte’, ‘número total de palancadas activas’, ‘última serie realizada’, ‘palancadas activas durante el periodo pellet’, ‘palancadas

activas durante el periodo de tiempo fuera' y el 'tiempo total empleado en la sesión', se analizaron mediante ANOVAs de dos factores ('tratamiento' y 'sexo').

Posteriormente realizamos las descomposiciones de las interacciones significativas en los análisis de medidas repetidas y las otras comparaciones entre grupos posteriores a los análisis de la varianza con la prueba post-hoc Student-Neuman-Keuls (SNK). Se requirió un nivel de significación $p < 0.05$ para considerar los resultados estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio de los efectos del EA en la actividad motora basal: Actimetría.

Cuando evaluamos la actividad motora basal en la prueba de actimetría, el análisis estadístico mostró cambios significativos en el nivel de actividad de los animales a lo largo del ciclo luz-oscuridad (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'tiempo': $F_{(22,880)}=32.608$, $p < 0.001$, Figura 14A). Globalmente, las hembras mostraron cambios significativamente mayores que los machos en los niveles de actividad a lo largo del tiempo (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'tiempo' x 'sexo': $F_{(22,880)}=1,952$, $p < 0.05$). Más concretamente, a las 21:00h, una hora después del inicio de la fase oscura del ciclo (20:00h), observamos un aumento brusco de la actividad en todos los grupos, tal y como era de esperar, siendo el grupo de hembras control el que registró un incremento de la actividad mayor en comparación con el resto de los grupos (Figura 14A). En este análisis, no aparecieron efectos globales significativos del tratamiento, pero si analizamos los datos de la actividad total acumulada a lo largo de los períodos de luz y de oscuridad observamos efectos globales significativos del sexo en la actividad realizada durante el periodo de luz (ANOVA, efecto 'sexo': $F_{(3,43)}= 4.162$, $p < 0.05$, Figura 14B), confirmando que las hembras fueron más activas en esta fase del ciclo. No aparecieron efectos significativos del sexo en el período de oscuridad (ANOVA n.s, $F < 1.65$, Figura 14C). Tampoco aparecieron efectos significativos del tratamiento de enriquecimiento ambiental en el análisis de medidas repetidas ni en los ANOVAs de los cálculos totales en las fases oscura y clara del ciclo, lo cual indicó que el tratamiento no afectaba la actividad motora basal de los animales en las jaulas del estabulario.

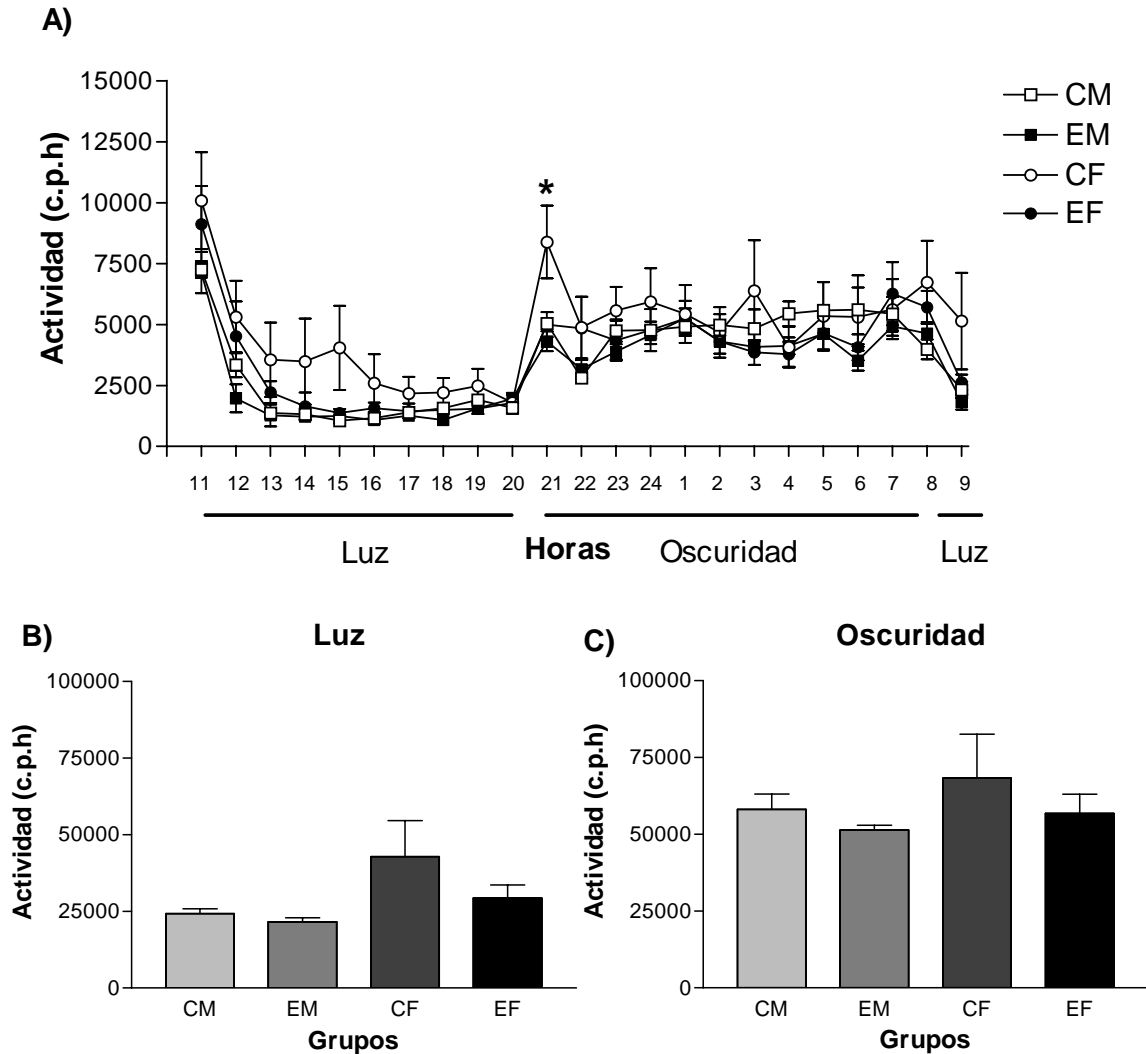


Figura 14. Se muestran las medias \pm EE de las cuentas por hora (c.p.h) realizadas por los animales durante las 23 horas de registro de la actividad motora basal en su jaula habitual (A), actividad total durante el periodo de luz (B), y actividad total durante el periodo de oscuridad (C) para los diferentes grupos experimentales: machos control (CM), machos enriquecidos (EM), hembras control (CF) y hembras enriquecidas (EF). * $p < 0.05$, CF respecto al resto de grupos.

3.2. Efectos del EA en la ingesta y el peso de los animales

En la figura 15 se muestra la ingesta de comida diaria y el peso de los animales correspondiente a las 8 pesadas realizadas a lo largo de los 25 días siguientes a la finalización del EA. El análisis estadístico mostró que los animales variaron la ingesta a lo largo de este periodo (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'dia': $F_{(7,280)}=9.181, p < 0.001$), de manera que el grupo de hembras comieron menos que los machos a lo largo de las sesiones (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'dia' x 'sexo': $F_{(7,280)}= 6.974, p < 0.001$; ANOVA, efecto 'sexo': $F_{(1,40)}=279.9, p < 0.001$, Figura 15A). La descomposición de la interacción mostró diferencias de sexo en todas las sesiones, siendo los machos quienes

realizaban un mayor consumo diario de comida. Tampoco obtuvimos efectos significativos del tratamiento de enriquecimiento ambiental en el consumo de comida.

Aparecieron efectos significativos del peso a lo largo de las sesiones (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'dia': $F_{(7,280)}=49.65$, $p<0.001$), indicando que los machos registraron variaciones superiores a las hembras a través de los días (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'dia'x 'sexo': $F_{(7,280)}=13.41$, $p<0.001$). El ANOVA global detectó efectos significativos de los factores sexo y tratamiento ($F_{(1,40)}=496.52$, $p<0.001$ y $F_{(1,40)}=8.75$, $p<0.01$, respectivamente), indicando que, globalmente, además de las diferencias de peso esperadas entre machos y hembras, los animales enriquecidos pesaban menos que los animales control (Figura 15B). Así, los resultados de la actimetría y de la ingesta nos permiten afirmar que la disminución de peso observada en los animales enriquecidos no fue debida a una diferencia en el consumo de alimentos ni en la actividad locomotora basal.

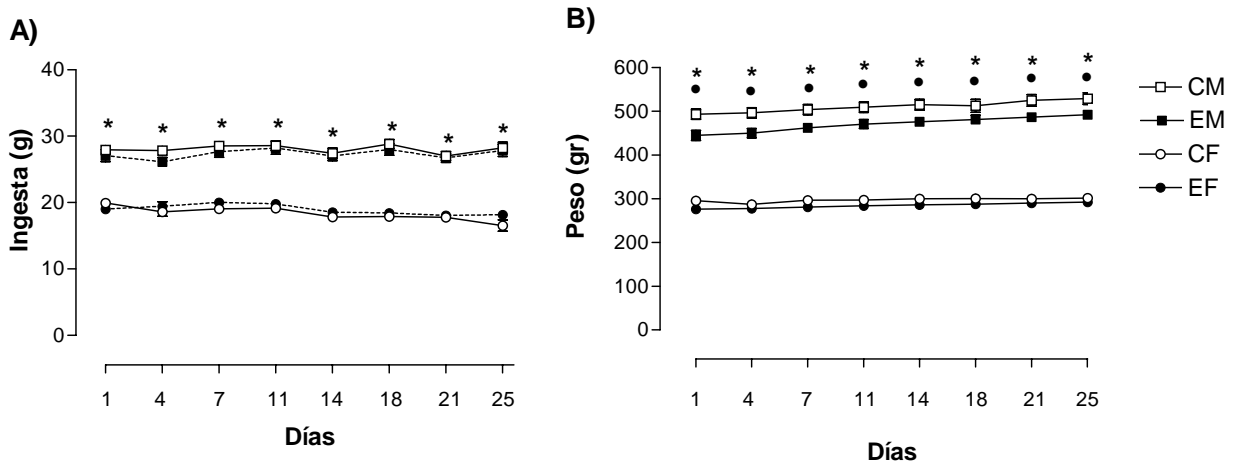


Figura 15. Se muestra la media \pm SE de la ingesta diaria (en gramos) (A) y el peso de los animales (B) a lo largo de los 25 días en que se efectuaron los 8 registros, * $P<0.05$ machos respecto a las hembras del mismo tratamiento, ● $P<0.05$ animales enriquecidos respecto a los sujetos control.

3.3. Efectos del Enriquecimiento Ambiental sobre la adquisición de auto-administración de cocaína

3.3.1. Entrenamiento de refuerzo por comida

En la Figura 16 se representa el número de días que necesitaron las ratas para alcanzar el criterio de adquisición del entrenamiento de auto-administración de comida, de obtener 100 pellets de comida durante 3 días consecutivos. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,62)}<0.61$, n.s), lo cual confirmó que no hubo diferencias

en el aprendizaje inicial de la conducta operante de apretar la palanca para la obtención del refuerzo.

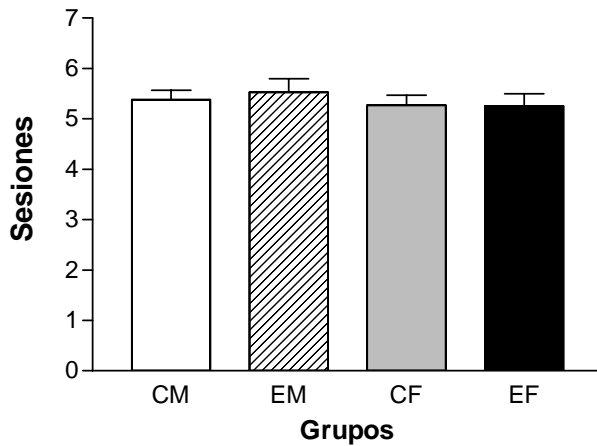


Figura 16. Se muestra la media \pm SE del número de sesiones de entrenamiento de refuerzo por comida que necesitaron los animales de los diferentes grupos experimentales para alcanzar el criterio de adquisición.

Analizamos los datos de los 3 últimos días de auto-administración de comida para detectar diferencias de ejecución más sutiles (Figura 17). Prácticamente todos los animales consumieron los 100 pellets disponibles a lo largo de las sesiones, y tampoco se produjeron diferencias entre los grupos en el tiempo requerido para consumir los 100 pellets. Con respecto al número de respuestas en la palanca activa durante el periodo ‘pellet’, el ANOVA con medidas repetidas de las variables transformadas mostró que en general, estas respuestas disminuyeron a lo largo de las sesiones de entrenamiento (efecto ‘sesión’: $F_{(2,118)}=6.314$, $p<0.01$, Figura 17A), lo cual significa que globalmente, los animales aprendieron la secuencia en que se presentaron las contingencias y fueron disminuyendo la conducta de apretar a la palanca en el periodo de no contingencias a través de las sesiones. También apareció una interacción significativa: ‘sesión’ x ‘tratamiento’ ($F_{(2,118)}=4.922$, $p<0.01$), que se explica por la mayor disminución observada en las respuestas de los animales enriquecidos a lo largo de las 3 sesiones. El análisis intersujetos detectó un efecto significativo del ‘sexo’ ($F_{(1,59)}=8.85$, $p<0.01$), que se muestra por los valores más bajos de las hembras con respecto a los machos.

No aparecieron efectos significativos en el análisis de las respuestas activas efectuadas durante el periodo de ‘tiempo fuera’ ($F_{(2,118)}<1.6$, n.s.), ni en el total de respuestas activas efectuadas durante las sesiones ($F_{(2,118)}<1.18$, n.s.). En el análisis no paramétrico de las respuestas efectuadas en la palanca inactiva durante estas 3 sesiones indicó que tampoco había diferencias significativas entre los grupos en esta variable, presentándose una media

en todos los grupos menor de 6 en el número de respuestas efectuadas en la palanca inactiva (Figura 17 B).

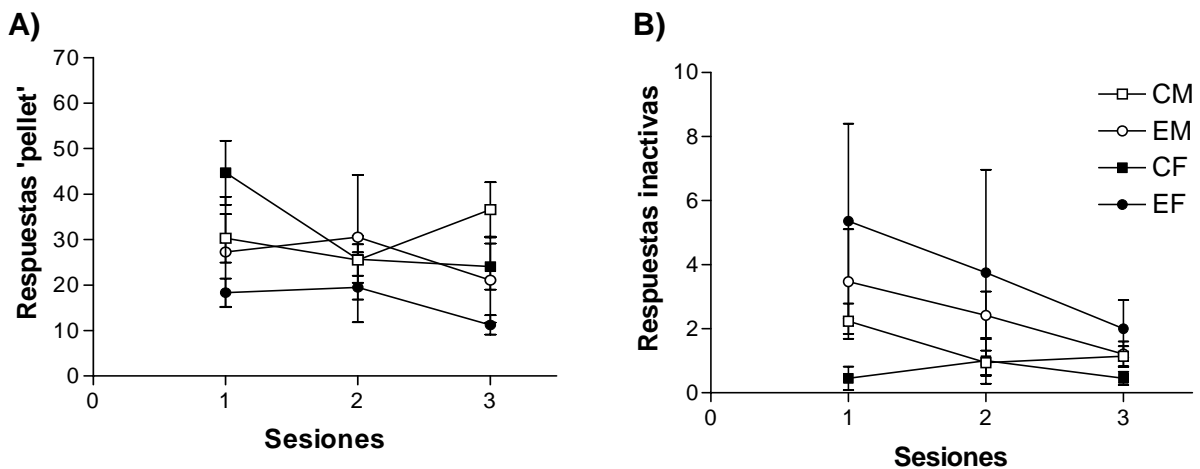


Figura 17. Se muestra la media \pm SE del número de respuestas en la palanca activa durante el periodo 'pellet' (A) y el número de respuestas en la palanca inactiva (B) durante las 3 últimas sesiones de entrenamiento de refuerzo por comida de los diferentes grupos experimentales.

3.3.2. Efectos del EA en la sesión de razón progresiva por comida.

No observamos efectos significativos en el número total de pellets obtenido en la sesión de razón progresiva (que indicaría el punto de corte o 'breaking point'), y tampoco en el número de respuestas activas totales ni en el número de respuestas activas correspondiente a la última serie realizada para conseguir el refuerzo (Figura 18). Así, todos los grupos mostraron niveles similares de ejecución ante este programa de refuerzo más exigente.

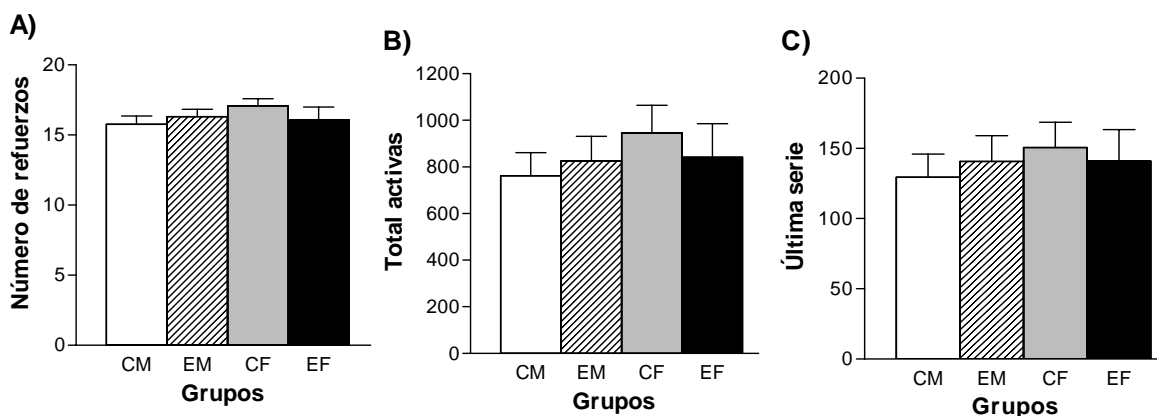


Figura 18. Se muestra la media \pm SE del número de refuerzos recibidos durante la sesión de razón progresiva por comida o 'breaking point' (A), el número de respuestas totales en la palanca activa (B), el valor de la última serie de respuestas completada durante la sesión (C), el número de respuestas durante el período de tiempo fuera (TO'), y el tiempo total de la sesión (E) para los diferentes grupos experimentales, * $P < 0.05$ hembras control respecto a hembras enriquecidas.

3.3.3. Adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de razón fija 1 (FR1).

Si analizamos la ejecución global de los 63 animales que realizaron la primera fase de autoadministración, observamos que los animales variaron el consumo de cocaína a lo largo de las 7 sesiones de FR1 (ANOVA con medidas repetidas, efecto ‘sesión’: $F_{(6,354)}=19.98$, $p<0.001$). El análisis mostró una interacción ‘sesión’ x ‘tratamiento’ indicando que el tratamiento aumentó globalmente la autoadministración de cocaína a lo largo de las sesiones (Figura 19). La descomposición de la interacción mostró, concretamente, diferencias significativas entre los grupos enriquecidos y control en la quinta sesión, donde las hembras enriquecidas presentaron una mayor autoadministración que las hembras control (Figura 19). Asimismo, el análisis global intersujetos descubrió un efecto ‘sexo’ ($F_{(1,59)}=4.312$, $p<0.05$), indicando que globalmente las hembras se autoadministraron más cocaína que los machos en la fase de adquisición.

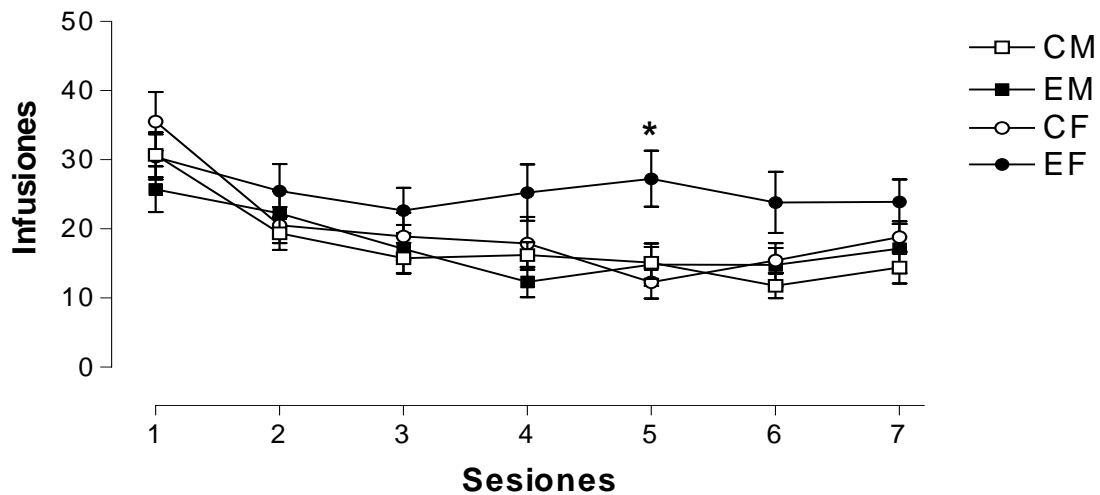


Figura 19. Se muestra la media \pm SE del número de infusiones recibidas (0.5mg/Kg por infusión) durante las 7 sesiones de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1) para los diferentes grupos experimentales (n=63), * $p<0.05$ grupo enriquecido respecto al grupo control del mismo sexo.

Durante los períodos de tiempo ‘droga’ y ‘tiempo fuera’, en los que no se producen contingencias, los animales mostraron globalmente una disminución de las respuestas a lo largo de las sesiones de auto-administración de FR1 ($F_{(6,354)}=21.92$, $p<0.001$ y $F_{(6,354)}=11.737$, $p<0.001$, respectivamente), lo cual indicaba que las ratas aprendieron a no responder cuando los estímulos discriminativos desaparecían.

Sin embargo, detectamos un comportamiento diferente al de los otros grupos en las hembras enriquecidas. Así, el análisis de las respuestas en la palanca activa realizadas durante el período de ‘droga’ y ‘tiempo fuera’ mostró que las interacciones ‘sesión’ x ‘sexo’ x ‘tratamiento’ eran significativas en ambos casos ($F_{(6,354)}=2.750$, $p<0.05$: $F_{(6,354)}=3.442$, $p<0.05$, respectivamente), lo cual indicaba que el tratamiento afectaba de manera diferente a machos y hembras a lo largo de la fase de adquisición con respecto a estas variables. En ambos casos se observa que las hembras control comenzaron con el número de respuestas más alto que el resto de grupos en la sesión 1 pero las respuestas disminuyen progresivamente hasta la sesión 7. En cambio, el grupo de hembras enriquecidas comienza con un número de respuestas intermedio o más bien bajo y termina en la sesión 7 con el número de respuestas más alto, siendo el grupo que muestra la curva de pendiente menor. Con respecto a los machos enriquecidos y control, las dos curvas son bastante paralelas, de manera que prácticamente se superponen en varios puntos. La descomposición de la primera interacción mostró diferencias significativas en la sesión 5, donde el grupo de hembras enriquecidas realizó un mayor número de respuestas que el grupo de hembras control (Figura 20A). La descomposición de la segunda interacción mostró diferencias significativas en la primera sesión, donde las hembras control realizaron un mayor número de respuestas en la palanca activa durante el periodo de ‘tiempo fuera’ respecto al grupo de machos control (Figura 20B).

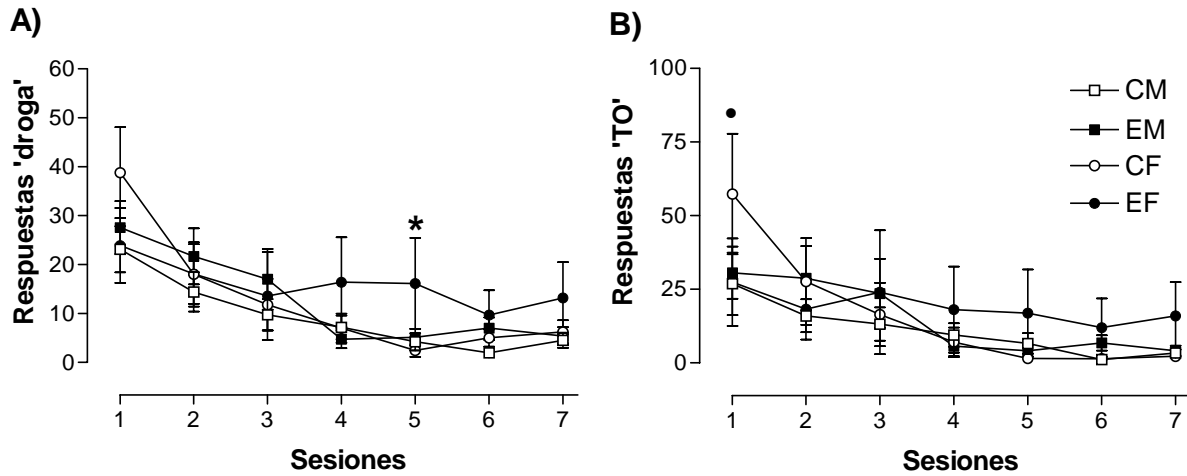


Figura 20. Se muestra la media \pm SE del número de respuestas en la palanca activa durante el período 'droga' (A) y el período tiempo fuera 'TO' (B) en las sesiones de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1) para los diferentes grupos experimentales, * $P < 0.05$ hembras enriquecidas respecto al grupo de hembras control, ● $P < 0.05$ hembras control respecto a los machos control.

De nuevo, si analizamos el número de respuestas activas totales a lo largo de las sesiones vemos que en general se produce una disminución de estas respuestas en todos los grupos (efecto 'sesión': $F_{(6,354)}=19.898$, $p < 0.001$, Figura 21), excepto en el grupo de las hembras enriquecidas, donde los valores permanecen más estables que en los otros grupos a lo largo de las 7 sesiones de adquisición (efecto 'sesión' x 'sexo' x 'tratamiento': $F_{(6,354)}=2.702$, $p < 0.05$). La descomposición de la interacción mostró que en la cuarta sesión el grupo de hembras enriquecidas hizo un número mayor de palancadas activas totales en comparación con el grupo de machos enriquecidos y en la quinta sesión el grupo de hembras enriquecidas hizo más respuestas en la palanca activa que ningún otro grupo (Figura 21). En contraste, no observamos diferencias significativas en el número de las respuestas en la palanca inactiva entre los grupos en ninguna de las sesiones ($F < 2.08$, n.s.).

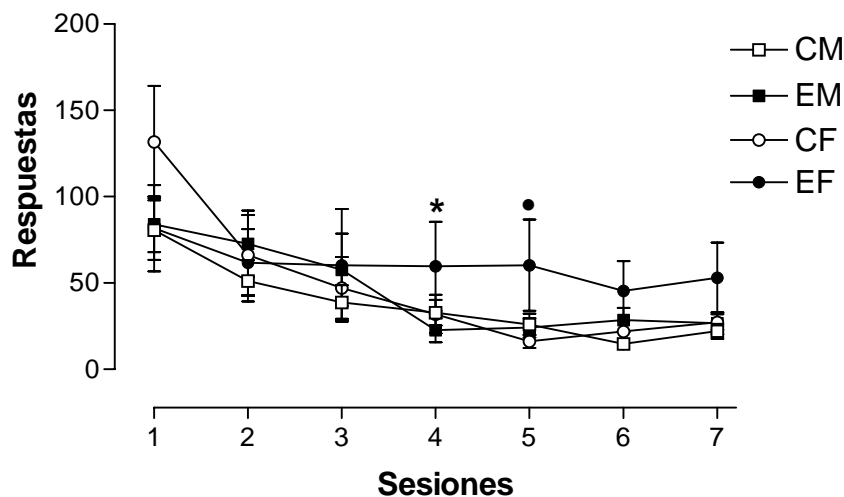


Figura 21. Se muestra la media \pm SE del número total de respuestas en la palanca activa durante las 7 sesiones de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1) para los diferentes grupos experimentales. * $P < 0.05$ hembras enriquecidas respecto al grupo de machos enriquecidos, ● $P < 0.05$ hembras enriquecidas respecto al resto de grupos.

3.3.4. Selección de los animales que alcanzan el criterio en FR1 y análisis de la conducta de auto-administración en los programas FR1, FR3 y FR5

De los 63 animales que realizaron la primera fase de adquisición de auto-administración de cocaína bajo el programa de FR1, 34 alcanzaron el criterio de adquisición requerido y continuaron la secuencia experimental en las fases de FR3 (una sesión) y FR5 (5 sesiones). Esto es, un total de 29 animales no completaron la secuencia experimental principalmente por dos motivos: a) no alcanzaron el criterio de adquisición requerido de haberse autoadministrado un mínimo de 10 infusiones durante 5 de las 7 sesiones de adquisición en FR1, o b) por un mal funcionamiento del catéter. En concreto, 6 ratas fueron excluidas del análisis por no mantener la viabilidad del catéter: 2 machos control, 2 machos enriquecidos, 1 hembra control y 1 hembra enriquecida. Otros 23 animales no cumplieron el criterio de adquisición de auto-administración de cocaína en FR1 y por tanto no continuaron la secuencia experimental: 9 machos control, 9 machos enriquecidos, 2 hembras control y 3 hembras enriquecidas. En la figura 22 se muestra el porcentaje de sujetos de cada grupo experimental que cumplieron el criterio y finalizaron todo el procedimiento de auto-administración. Analizamos estos datos mediante una prueba no paramétrica Chi-cuadrado obteniendo una tendencia a la significación del factor sexo ($\chi^2_{(1)}=3,54$, $p=0.06$), mientras que no aparecieron efectos significativos del tratamiento.

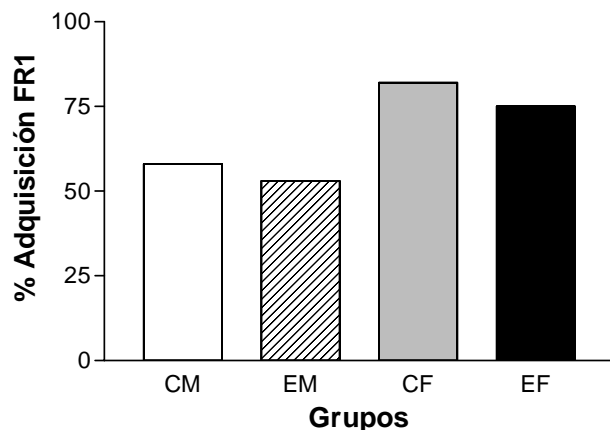


Figura 22. Se muestra el porcentaje de animales de cada grupo experimental que adquirió el criterio de adquisición a lo largo de las 7 sesiones de autoadministración de cocaína en FR1.

A continuación presentamos los análisis de las fases de adquisición, mantenimiento y de la sesión de razón progresiva correspondientes a la autoadministración de cocaína de los 34 animales que alcanzaron el criterio de adquisición en la fase FR1.

En la figura 23 se representa el número de infusiones autoadministradas por estos animales que cumplieron criterio de adquisición a lo largo de las primeras sesiones de FR1. Observamos un efecto significativo en las sesiones (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'sesión': $F_{(6,180)}=8.46$, $p<0.001$) y una interacción significativa 'sesión' x 'tratamiento': $F_{(6,180)}=3.06$, $p<0.05$, debido a que globalmente, los animales enriquecidos se autoadministraron un número mayor de infusiones que los animales control. Las diferencias aparecieron claramente a partir de la quinta sesión de autoadministración (Figura 23, FR1). El análisis intersujetos también mostró un efecto global de 'tratamiento' ($F_{(1,30)}=5.728$, $p<0.05$) que confirmaba el mayor consumo total de los grupos enriquecidos con respecto a los grupos control. La descomposición de la interacción indicó que había diferencias significativas durante las 3 últimas sesiones de FR1; de manera que los animales enriquecidos presentaron niveles significativamente superiores de consumo de cocaína respecto a los grupos control en las sesiones 5, 6 y 7. En referencia a las otras variables estudiadas, no detectamos cambios relevantes con respecto a los resultados obtenidos con la muestra total.

Con respecto al número de respuestas totales en la palanca activa a lo largo de las sesiones, el ANOVA con medidas repetidas de las variables transformadas mostró que en general, las respuestas disminuyeron a lo largo de las sesiones de adquisición (efecto 'sesión': $F_{(6,180)}=11.07$, $p<0.001$, Figura 24), y se encontró una tendencia a la interacción 'sesión' x 'tratamiento' x 'sexo': $F_{(6,180)}=2.05$, $p=0.085$, que se explicaría por los mayores niveles iniciales de respuesta en la palanca activa de los machos enriquecidos y que luego

disminuyen durante las últimas 4 sesiones de FR1, mientras que las hembras enriquecidas no presentan una disminución tan acusada, sino que continúan presentando los niveles mayores a lo largo de las sesiones (Figura 24).

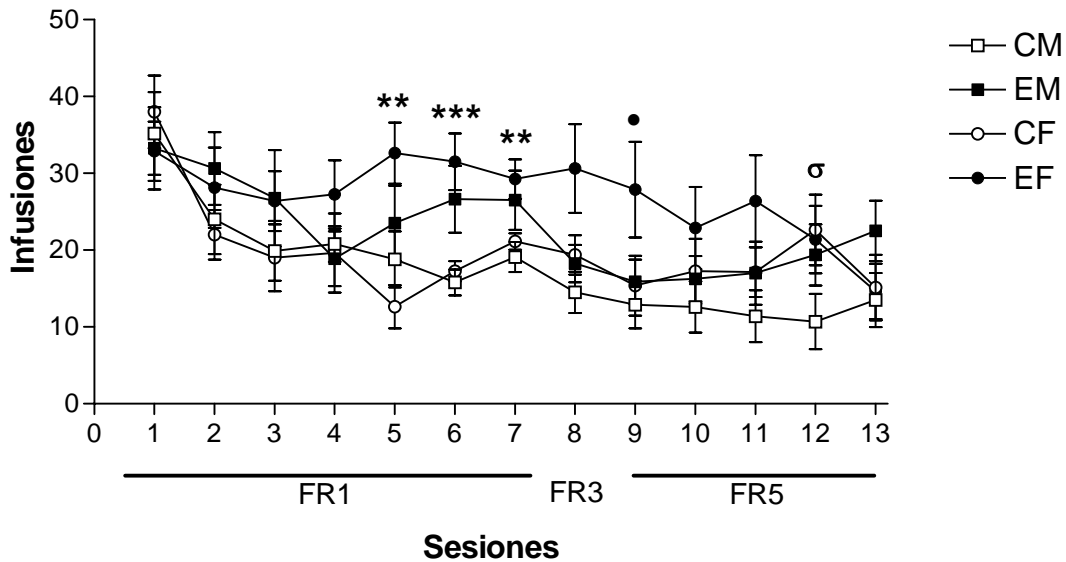


Figura 23. Se muestra la media \pm SE del número de infusiones recibidas (0.5mg/Kg por infusión) durante todas las sesiones de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1), de razón fija 3 (FR3) y de razón fija 5 (FR5) para los sujetos de los diferentes grupos experimentales que han cumplido el criterio de adquisición (n=34). ** p<0.05, ***p<0.001, animales enriquecidos respecto a los animales control del mismo sexo, ● p<0.05, hembras enriquecidas respecto a hembras control, σ p<0.05 hembras control respecto a machos control.

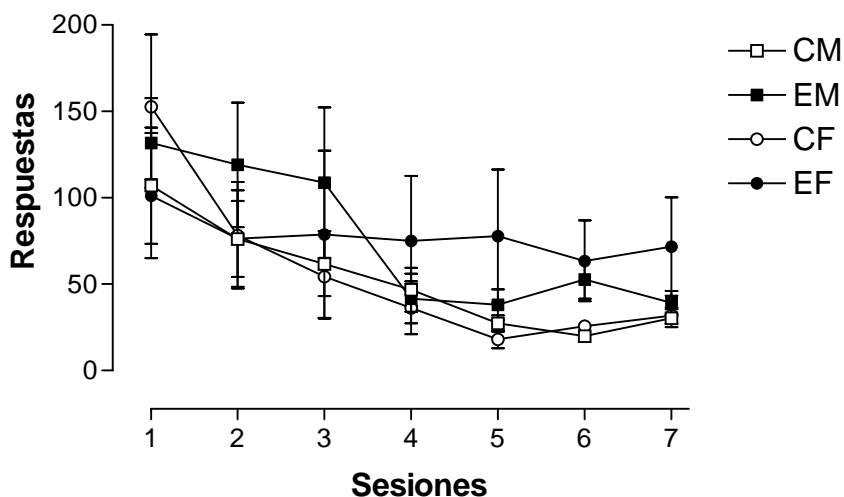


Figura 24. Se muestra la media \pm SE del número total de respuestas en la palanca activa durante las 7 sesiones de adquisición de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 1 (FR1) para los sujetos de los diferentes grupos experimentales que han cumplido el criterio de adquisición (n=34).

En el análisis de la sesión de autoadministración en FR3 aparecieron efectos significativos del sexo ($F_{(1,33)}=5.87$, $p<0.05$) y del tratamiento ($F_{(1,33)}=4.44$, $p<0.05$), indicando que en esta sesión las hembras se autoadministraron más infusiones que los machos y los animales enriquecidos más que los controles (Figura 23, FR3).

Durante la auto-administración bajo el programa de FR5, el análisis estadístico indicó que todos los animales mostraron variaciones en el número de infusiones recibidas a lo largo de las 5 sesiones (ANOVA con medidas repetidas, efecto 'sesión': $F_{(4,120)}=3.352$, $p<0.05$). Obtuvimos una interacción 'sesión' x 'sexo' x 'tratamiento' significativa ($F_{(4,120)}=3.007$, $p<0.05$), que se explica, en parte, por el hecho de que el grupo de machos enriquecidos muestra una progresión ascendente en comparación con el grupo de machos control que se mantiene en unos niveles de autoadministración relativamente estables a lo largo de las sesiones. En cambio, el grupo de hembras enriquecidas muestra una progresión más bien descendente que se hace muy acusada en las dos últimas sesiones mientras que el grupo de hembras control aumenta la autoadministración a lo largo de las sesiones 10, 11 y 12 (Figura 23, FR5).

En esta fase FR5 de mantenimiento no observamos efectos significativos en los períodos 'droga' y 'tiempo fuera', ni en las respuestas realizadas en la palanca inactiva. Pero cuando analizamos el número total de respuestas en la palanca activa durante las sesiones de FR5 apareció de nuevo la interacción 'sesión' x 'sexo' x 'tratamiento' significativa ($F_{(4,120)}=3.125$, $p<0.05$, Figura 25), que se explicaría por los diferentes patrones de conducta observados entre las ratas que recibieron el tratamiento de enriquecimiento ambiental. Esto es, los machos enriquecidos muestran una progresión ascendente superior a la de los machos control a lo largo de las sesiones, mientras que las hembras enriquecidas muestran una progresión descendente entre las sesiones 9-13 que contrasta con la pendiente de signo contrario de las hembras control. La descomposición de la interacción mostró efectos significativos en la primera sesión de FR5, las hembras enriquecidas realizaron un mayor número de respuestas en la palanca activa en comparación con las hembras control.

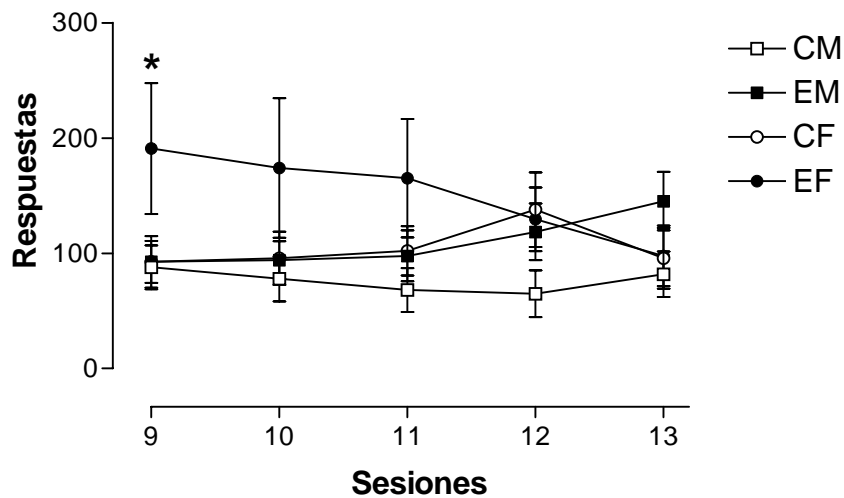


Figura 25. Se muestra la media \pm SE del número total de respuestas en la palanca activa durante las 5 sesiones de autoadministración de cocaína bajo el programa de refuerzo de razón fija 5 (FR5) para los diferentes grupos experimentales, * $P < 0.05$ hembras enriquecidas respecto a las hembras control.

3.3.5. Conducta de auto-administración en el programa de razón progresiva por droga (PR).

Tras la última sesión de FR5 las ratas que cumplieron el criterio de auto-administración estable de autoadministrarse un mínimo de 10 infusiones en las sesiones 12 y 13 fueron sometidas a una sesión de razón progresiva (PR). De las 63 ratas que empezaron la secuencia experimental sólo 21 llegaron hasta esta última sesión de PR: 7 ratas CM, 6 EM, 4 CF y 4 EF, y aunque se trata de un número de animales reducido, especialmente en lo que respecta a los grupos de hembras, analizamos los datos obtenidos con el objetivo de presentar un resultado indicativo pendiente de confirmación en posteriores estudios. Así, el análisis mostró una tendencia a la interacción entre ‘sexo’ y ‘tratamiento’ en el número de infusiones recibidas en la sesión de razón progresiva (ANOVA, $F_{(1,20)}=3.88$, $p=0.065$, Figura 26A). Se observa que las hembras control tienden a autoadministrarse un mayor número de infusiones que los machos control en esta sesión, mientras que los machos enriquecidos se administraron un mayor número de infusiones superior al de las hembras enriquecidas. Al analizar la variable transformada de las respuestas totales en la palanca activa durante la sesión de razón progresiva por cocaína también hallamos una tendencia a la interacción entre ‘sexo’ y ‘tratamiento’ ($F_{(1,20)}=3.90$, $p=0.065$, Figura 26B), en la que se

observa el mismo patrón comentado anteriormente para el número de infusiones recibidas durante esta sesión.

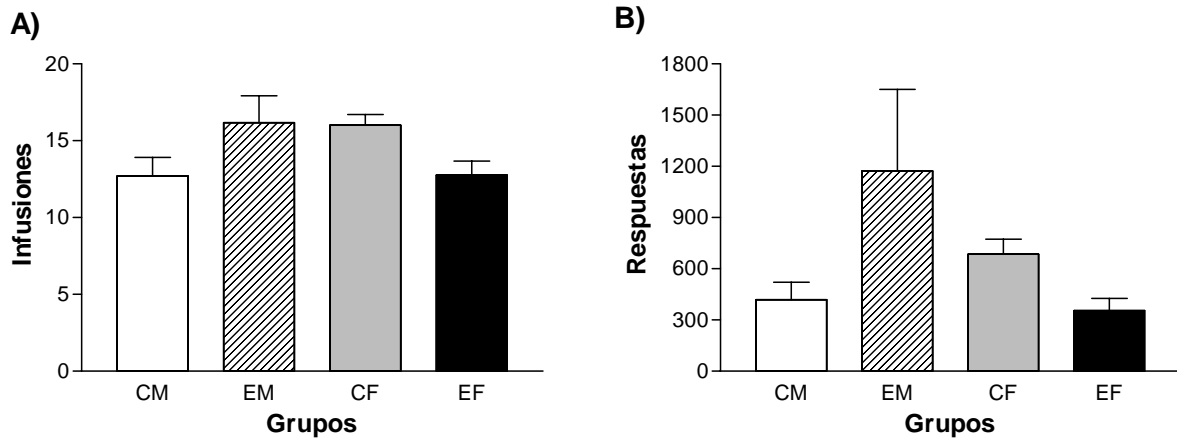


Figura 26. Se muestra la media \pm SE del número total de infusiones recibidas (A), y el número total de respuestas en la palanca activa (B), durante la sesión de razón progresiva por cocaína para los diferentes grupos experimentales: machos control (CM, $n=7$), machos enriquecidos (EM, $n=6$), hembras control (CF, $n=4$) y hembras enriquecidas (EF, $n=4$).

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el enriquecimiento ambiental administrado durante la infancia y por un período de 3 meses influye en el consumo de cocaína en ratas las Sprague-Dawley de ambos sexos. Esto es, el enriquecimiento ambiental aumentó la conducta de autoadministración de cocaína intravenosa durante las etapas de adquisición y mantenimiento en machos y hembras.

Por otra parte, los resultados de la primera parte de nuestro estudio mostraron que el enriquecimiento no afectó la actividad motora basal inespecífica en la jaula de estabulación de los animales a lo largo de un ciclo de 24 horas. No observamos efectos significativos en los niveles de actividad durante las horas de oscuridad, mientras que las hembras mostraron más actividad que los machos en la fase de luz. Globalmente no aparecieron efectos del tratamiento en ninguno de los dos períodos del ciclo. Aunque las mediciones de actimetría se realizaron una vez finalizado el período de tratamiento, es muy probable que las ratas

enriquecidas realizaran más actividad en las jaulas de enriquecimiento que los animales control en las jaulas de estabulación estándar, el tratamiento ofrece la oportunidad de interactuar con los objetos, un mayor espacio disponible para realizar desplazamientos y aumenta la posibilidad de contacto social con un número mayor de individuos. Esta situación podría haber causado las diferencias de peso que luego persisten de forma duradera aunque las condiciones de estabulación sean diferentes.

Cuando analizamos los datos de ingesta de alimento y peso de los animales, observamos que el tratamiento de EA de 12 semanas de duración no alteró el consumo de alimentos en los machos ni en las hembras. Observamos efectos generales del sexo, de manera que las hembras consumieron menores cantidades de comida y pesaban menos que los machos en todos los registros tomados. Los análisis de estos datos indicaron que había efectos globales significativos del sexo y del tratamiento. De nuevo en este estudio, el tratamiento disminuyó el peso de machos y hembras, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en los Estudios I y II. Ahora podemos deducir que las diferencias de peso observadas no son debidas a una menor ingesta de comida por parte de los animales enriquecidos ni a un mayor nivel de actividad locomotora basal de los sujetos enriquecidos en las condiciones de estabulación.

Con respecto a la adquisición de la conducta operante de autoadministración de comida, observamos que los diferentes grupos experimentales no difirieron en el número de sesiones requeridas para alcanzar el criterio, lo cual indicó que el enriquecimiento no modificaba la capacidad de las ratas para adquirir la respuesta operante de administración de comida y que no había diferencias entre sexos en esta variable.

En la sesión de razón progresiva por comida los análisis tampoco mostraron efectos significativos en el valor de 'punto de corte' ni en el número de pellets consumidos durante esta sesión. Ello sugiere que los distintos grupos de animales no diferían en el grado de motivación por obtener el refuerzo de comida aún y las diferencias obtenidas en los registros de ingesta de comida entre machos y hembras. Esto es, probablemente la restricción de comida que se producía durante la adquisición de la conducta operante por refuerzo de comida inducía niveles de motivación suficientes como para que no se detectaran diferencias entre sexos en esta fase del entrenamiento.

Con respecto a la autoadministración de cocaína, cuando analizamos la conducta de los 63 animales que realizaron las sesiones de autoadministración en FR1, observamos que los animales enriquecidos consumieron más cocaína que los animales control; y más

concretamente, fueron las hembras quienes mostraron la mayor conducta de búsqueda de droga, como se muestra por el mayor número de respuestas totales en la palanca activa durante las sesiones de adquisición y sobretodo, por el aumento de respuestas en la palanca activa en la fase 'droga' y de 'tiempo fuera'.

El hecho de que no hubiera diferencias significativas en el total de respuestas en la palanca activa durante el entrenamiento por comida o en las respuestas en la palanca inactiva durante la fase de autoadministración de cocaína bajo FR1, sugiere que las diferencias en la cantidad de cocaína ingerida no se deben a diferencias en los niveles de actividad basal; y de hecho, tampoco detectamos efectos globales del tratamiento en la actimetría. Además, Koeltzow y Vezina (2005) observaron que los efectos activadores de la cocaína sobre la actividad locomotora se suprimían durante la fase de adquisición la autoadministración, y que las respuestas condicionadas de los animales que habían adquirido la conducta de autoadministración de cocaína se manifestaron por un aumento en las respuestas operantes de apretar la palanca pero no en un incremento en la actividad locomotora medida durante las sesiones de autoadministración de una hora de duración. En nuestro, estudio las hembras enriquecidas aumentaron globalmente el número de respuestas totales en la palanca activa, mostrando un mayor deseo de consumir de cocaína, mientras que no aumentaron el número de respuestas en la palanca inactiva, lo cual muestra que no aumentaron la actividad motora inespecífica. En conjunto ello indica que el aumento de respuestas en la palanca activa fue debido a los efectos reforzadores de la cocaína y no a una alteración no específica de la respuesta operante; esta explicación se sustenta también por el hecho de que no se produjeron diferencias entre los grupos en la conducta operante durante las sesiones de entrenamiento por comida, y de hecho, el grupo de hembras enriquecidas fue el que mostró menos respuestas durante el período de no contingencias.

Sin embargo, el aumento de la autoadministración de cocaína producido por el enriquecimiento contrasta con los resultados de Bardo et al. (2001). Estos autores obtuvieron, por un lado, que machos y hembras enriquecidos disminuían la autoadministración dosis bajas de anfetamina en comparación con los animales criados en situación de aislamiento social, y que este efecto desaparecía cuando se utilizaron dosis altas de anfetaminas; por otro lado, no se observaron diferencias entre los animales enriquecidos y los estabulados de forma social. En conjunto los resultados de Bardo et al. (2001) sugieren que las diferencias podían ser debidas a la situación de aislamiento de los animales control o, alternativamente, a que los efectos de la cocaína y la anfetamina en la

autoadministración intravenosa de drogas están mediados por diferentes sistemas neurobiológicos (Schenk et al., 1986).

En nuestro estudio, también aparecieron diferencias globales de sexo, lo cual es consistente con datos previos de otros autores que encuentran que las hembras se autoadministran más cocaína que los machos, sobretodo en las fases iniciales de adquisición (Lynch y Carroll 1999; Roth y Carroll, 2004). Además, observamos que en los grupos de hembras también hubo un mayor porcentaje de sujetos que adquirieron la conducta de autoadministración; si bien este dato no fue significativo en el análisis que mostró una tendencia a la interacción. Además, para la realización de este estudio tuvimos que llevar a cabo dos series de enriquecimiento con el fin de completar la muestra de machos, y también debemos considerar en la misma dirección otros datos de la literatura según los cuales y utilizando dosis bajas como en el presente estudio, las hembras requieren un número inferior de sesiones de autoadministración hasta alcanzar el criterio de adquisición en comparación con los machos. Con respecto a las diferencias de sexo observadas en el consumo de otro tipo de drogas, como por ejemplo la fenciclidina (PCP), se vio que el 100% de los monos rhesus hembra adquirieron la conducta de autoadministración mientras que sólo lo hicieron el 36.4% de los machos (Carroll et al., 2000). Cuando se comparó la adquisición de machos y hembras en condiciones que promueven una adquisición lenta como son las bajas dosis de droga, las hembras adquiriendo la autoadministración más rápidamente que los machos; en cambio, bajo condiciones que promueven una rápida adquisición como son las dosis altas, el preentrenamiento operante o la privación de comida, los machos y hembras no difirieron en la velocidad de adquisición (Lynch et al., 2001; Lynch y Taylor, 2004).

En referencia a los efectos diferenciales del enriquecimiento en función del sexo, Zimmerberg y Brett (1992) estudiaron la preferencia por d-anfetamina o barbital en ratas enriquecidas y ratas aisladas durante 60 días tras el destete, y observaron que los machos control aislados prefirieron la d-anfetamina, mientras que las hembras control aisladas prefirieron el barbital; estas diferencias sexuales fueron abolidas por el enriquecimiento, de manera que los animales enriquecidos no mostraron preferencia por ninguna de estas drogas y, además, ingirieron menores cantidades en comparación con los animales aislados. Los resultados de los datos obtenidos en el presente estudio con cocaína correspondientes a los animales que alcanzaron el criterio de adquisición bajo condiciones de FR1 indican un efecto del tratamiento de enriquecimiento todavía más potente al tiempo que se anularon las diferencias de sexo en el análisis global. Esto es, durante las últimas tres sesiones de FR1

los animales macho enriquecidos aumentaron la media del número de infusiones respecto a los machos control. A este respecto, hay que tener en cuenta el criterio de adquisición de recibir un mínimo de 10 infusiones, de manera que los animales que no se autoadministraron más de 10 infusiones durante las últimas sesiones de adquisición no continuaron la secuencia experimental. Así, es lógico suponer que al realizar el análisis de los datos de RF1 excluyendo los animales que presentaron los valores de respuesta más bajos podía producirse un aumento general en el valor de la media de las infusiones recibidas en los diferentes grupos experimentales. No obstante, el resultado obtenido fue en cierta medida sorprendente, puesto que el aumento mayor en el grupo de machos enriquecidos con respecto al resto de grupos; teniendo en cuenta además que el número de sujetos que no alcanzaron el criterio de adquisición en los grupos de machos control y enriquecidos era muy similar al 50% en ambos. Esto sugiere que si bien el enriquecimiento no aumenta el número de animales que alcanzarán el criterio de autoadministración, parece que aumenta el consumo de droga en los animales que lo alcanza. Además, al observar las curvas de autoadministración que obtuvimos podría interpretarse que el tratamiento tuvo efectos extremos en los machos, de manera que aumentó el consumo de droga en los sujetos que alcanzaron el criterio, pero también disminuyó el consumo en los sujetos que no lo alcanzaron, mostrando patrones de comportamiento extremos ambos subgrupos animales. Hemos de comentar también que los animales excluidos del análisis por no alcanzar el criterio no se debió a factores de aprendizaje o a efectos en la conducta operante inespecífica ya que no mostraron déficits durante el preentrenamiento por comida, o durante la primera sesión de autoadministración de cocaína, donde se alcanzaron los niveles más elevados de consumo en todos los grupos debido a la falta de experiencia previa con la droga.

Cuando en la octava sesión el programa de refuerzo aumentó a la ejecución de tres respuestas para la obtención de una infusión de cocaína, las hembras continuaron presentando niveles de autoadministración mayores que los machos, y los grupos enriquecidos presentaron, al igual que en la fase anterior, un mayor nivel de autoadministración con respecto a los animales control.

A lo largo de las cinco sesiones de autoadministración de cocaína correspondientes al programa de razón fija cinco volvieron a aparecer efectos globales significativos de los factores sexo y tratamiento, y la interacción se hizo evidente porque, por un lado, el grupo de machos control se autoadministró menos infusiones y mostró a su vez un patrón estable

de consumo a lo largo de las sesiones, mientras que el grupo de hembras control aumentó progresivamente el consumo hasta la cuarta sesión de esta fase de mantenimiento, aunque mostró una disminución en el número de infusiones de la última sesión de RF5. Por su parte, el enriquecimiento aumentó globalmente la conducta de autoadministración en machos y hembras, aunque los machos enriquecidos recibieron más infusiones que los machos control mostrando una escalada en el consumo a lo largo de las sesiones; en cambio, las hembras enriquecidas mostraron un mayor consumo que el resto de grupos durante las tres primeras sesiones de esta fase de mantenimiento pero disminuyeron el número de infusiones autoadministradas en las dos últimas sesiones. Esto último fue debido principalmente a dos sujetos de cada uno de los grupos de hembras control y enriquecidas. Más concretamente, una hembra control y una hembra enriquecida realizaron sistemáticamente menos de 5 infusiones durante las 5 sesiones de FR5 y en la última sesión, la hembra enriquecida recibió una infusión mientras que la hembra control no recibió ninguna. Asimismo, las otras dos ratas, una hembra control y otra enriquecida recibieron un número de infusiones en torno a la media de su grupo a lo largo de estas sesiones, pero en la última, la hembra enriquecida sólo recibió 3 infusiones y la hembra control no recibió ninguna, con lo cual las medias de los dos grupos disminuyeron claramente en esta última sesión.

Con respecto a las respuestas realizadas en las palancas durante la fase de mantenimiento en condiciones de RF5, los datos mostraron que, al igual como ocurrió en las fases previas, el grupo de hembras enriquecidas hizo más palancadas que el resto de grupos, sin que aparecieran diferencias significativas entre los grupos en el número total de respuestas realizadas en la palanca inactiva.

Una forma de estudiar la motivación por el consumo de drogas en animales de laboratorio es mediante el programa de refuerzo de razón progresiva, en donde el animal debe aumentar el número de respuestas en la palanca activa para conseguir el refuerzo. Llegados a este punto, debemos comentar previamente a la interpretación de los datos obtenidos que la muestra de sujetos que realizaron esta sesión fue reducida, especialmente en los grupos de hembras; sin embargo, creemos que merecen ser incluidos teniendo en cuenta que deben ratificarse en estudios posteriores incluyendo un mayor número de sujetos. Los sujetos de nuestro experimento que alcanzaron esta fase del entrenamiento fueron 7 machos control, 6 machos enriquecidos, 4 hembras control y 4 hembras enriquecidas. Globalmente en la variable 'punto de corte' o infusiones recibidas encontramos una tendencia a la

significación en la interacción sexo por tratamiento. De nuevo las hembras control se autoadministraron un mayor número de infusiones que los machos control bajo este programa de refuerzo, mostrando más motivación que ellos para conseguir la droga, lo cual es consistente con la literatura, que muestra que las hembras presentan un mayor consumo que los machos sobretodo ante este tipo de programas de refuerzo con una razón alta. En esta sesión el enriquecimiento afectó de forma diferente a machos y hembras ya que aumentó el punto de corte en los machos, quienes se autoadministraron una cantidad de infusiones mayor que los machos control, de manera consistente con la conducta presentada durante las sesiones previas de adquisición y mantenimiento de la conducta de autoadministración. En las hembras enriquecidas, y contrariamente a lo esperado, el enriquecimiento disminuyó el incentivo motivacional de la droga bajo el programa de refuerzo progresivo, lo cual se tradujo en un número menor de infusiones recibidas. En este punto debemos comentar que, en principio, esta disminución en el número de infusiones recibidas no se debe a la disminución observada durante la última sesión de FR5, ya que las ratas causantes de la bajada en la media del grupo no fueron incluidas en este análisis, y sólo las ratas que se autoadministraban consistentemente más de 10 infusiones realizaron la última sesión de de razón progresiva. Por tanto, las diferencias observadas parecen deberse exclusivamente a la motivación por la cocaína bajo este programa de reforzamiento. Aunque es difícil explicar la tendencia que muestran estos resultados y con las reservas comentadas anteriormente sobre el tamaño de la muestra, podemos especular que el EA pueda ejercer un papel protector ante el consumo de drogas, específicamente en las hembras, cuando las exigencias del consumo sean elevadas. En el experimento de Green et al. (2002), donde los animales realizaron 5 sesiones consecutivas bajo el programa de razón progresiva para autoadministrarse anfetamina (0.06 mg/kg por infusión), las ratas enriquecidas no difirieron de las aisladas durante las primeras 2 sesiones, pero mostraron una disminución en el punto de corte durante las tres últimas sesiones de razón progresiva. Cuando la dosis se aumentó a 0.2 mg/kg por infusión, desaparecieron las diferencias entre los grupos, de manera que los machos enriquecidos y controles aumentaron el punto de corte presentando valores similares de consumo. Posteriormente, determinaron la curva dosis-respuesta utilizando diferentes dosis de anfetamina y únicamente encontraron diferencias significativas entre los grupos a una dosis baja de 0.02 mg/kg, siendo los machos enriquecidos quienes recibieron menos infusiones; con las dosis elevadas de anfetamina, los grupos no mostraron diferencias significativas en el punto de corte. De este

estudio se desprende que las dosis bajas de anfetamina no son suficientes para mantener la respuesta operante en las ratas enriquecidas lo que resulta en una extinción de la conducta.

Así, debemos tener en cuenta que las diferencias encontradas entre los grupos bajo este programa de refuerzo pueden ser específicas de los efectos de la droga, ya que cuando realizamos la sesión de razón progresiva por comida no aparecieron diferencias entre los grupos en el punto de corte, indicando que hay una motivación similar por otros refuerzos incondicionados como la comida.

También podría suceder que el enriquecimiento cambiara la velocidad de extinción de la conducta de autoadministración de cocaína de forma dependiente del sexo. Así si la extinción estuviera acelerada en las hembras enriquecidas, las dosis de cocaína estarían cada vez más espaciadas en el tiempo de manera que no alcanzarían la concentración óptima necesaria en el cerebro para que se reestableciera la conducta de búsqueda de droga, lo cual llevaría a su vez a que se produjera antes la extinción. Otra explicación podría estar basada en la diferencia en el grado de sensibilidad hacia la cocaína por parte de los diferentes grupos experimentales o, a un diferente umbral de refuerzo. Entonces, en condiciones de autoadministración regular la droga está presente más a menudo y las concentraciones en el cerebro hacen que se active el umbral que mantiene la conducta de autoadministración; en cambio, si la obtención de la droga se hace más difícil y no alcanza el umbral de dosis necesario en el cerebro puede que la rata cese la autoadministración. A este respecto, Fowler et al. (1993) entrenaron a ratas aisladas y enriquecidas bajo un procedimiento de discriminación operante de dos palancas, en el que los sujetos debían discriminar una palanca asociada a la administración de 5 mg/kg de cocaína de otra palanca que suministraba salino. En las pruebas de generalización, las ratas aisladas mostraron mayor sensibilidad que las enriquecidas a los efectos de la droga, de manera que discriminaron con 1.01 mg/kg de cocaína; en cambio las ratas enriquecidas necesitaron mayor cantidad de droga, 1.55mg/kg para poder discriminar la palanca que administraba droga de la que administraba salino. El mismo procedimiento se realizó utilizando d-anfetamina y de nuevo, las ratas enriquecidas necesitaron dosis más altas de droga (0.33 mg/kg) que las ratas aisladas (0.19 mg/kg) para poder discriminar entre las dos palancas (Fowler et al., 1993). Asimismo, en otro estudio también se concluyó que el enriquecimiento disminuía la sensibilidad ante los efectos reforzantes de anfetamina y cocaína con respecto a los animales aislados. En este trabajo, el aislamiento produjo una sensibilización locomotora con dosis de anfetamina de 0.5 mg/kg, sin que se observara

sensibilización en los animales enriquecidos, y aunque ninguno de los grupos mostró sensibilización en respuesta a la administración repetida de cocaína, el grupo de animales aislados mostró un mayor incremento conductual asociado a la administración aguda de cocaína y anfetamina en una tarea de refuerzo condicionado y un incremento en la conducta operante por la obtención de comida respecto al grupo de animales enriquecidos, lo cual sugería también que en los animales aislados había una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la droga en comparación con los enriquecidos (Smith et al., 1997). Por tanto, podemos concluir que el enriquecimiento puede disminuir los efectos reforzantes de ciertas drogas de abuso ante determinadas condiciones experimentales.

Los resultados del presente estudio muestran que el enriquecimiento ambiental aumenta la autoadministración de cocaína en machos y hembras con respecto a los animales control que han sido estabulados de forma social por parejas o en grupos de tres. A este respecto, hemos de comentar que los estudios que han comparado los efectos del enriquecimiento utilizando un grupo de ratas control estabuladas de forma social han sido escasos, puesto que normalmente se han estudiado los efectos de las diferentes condiciones de crianza comparando los datos de los sujetos aislados con los de un grupo social que podía ser enriquecido o no. Es difícil interpretar los resultados cuando se comparan los efectos del enriquecimiento ambiental con los del aislamiento, sin poder disponer de una situación de estabulación estándar, porque cualquiera de las dos condiciones de crianza puede alterar los parámetros evaluados. Más concretamente, los efectos del enriquecimiento en la conducta adictiva se han comparado con los efectos del aislamiento en paradigmas de autoadministración de anfetamina, y en general, los resultados tienden a indicar una mayor sensibilidad inicial a los efectos agudos de la droga; no obstante, se observa posteriormente una sensibilidad menor a los efectos de presentaciones repetidas, así como un cierto papel protector cuando se utilizan dosis bajas de sustancia (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002). Sin embargo, los estudios con otras drogas ofrecen resultados contradictorios. Así, de una parte, el enriquecimiento aumentó el consumo de alcohol (Fernández-Teruel et al., 2002), el condicionamiento de preferencia de lugar ante la administración de agonistas κ opioides (Smith et al., 2003) y el consumo de cocaína (Hill y Powell, 1976), mientras que por otro lado en otros estudios se detectó una menor sensibilidad a los efectos de la cocaína por parte de las ratas enriquecidas con respecto a las aisladas (Fowler et al., 1993).

Otros estudios han examinado los efectos del enriquecimiento en autoadministración de drogas vía oral y los efectos obtenidos tampoco son concluyentes. En el trabajo de Hill y

Powell (1976), las ratas enriquecidas también presentaron un mayor consumo diario de cocaína oral respecto a los animales aislados, y también presentaron un mayor consumo de etanol (Rockman et al., 1988; Ferández-Teruel et al., 1997), si bien otros autores encuentran que los animales aislados se autoadministran menos cocaína que las ratas enriquecidas (Shenck et al., 1987b). Algunos autores no detectan diferencias en la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína entre grupos sociales y aislados (Boyle et al., 1991) o encuentran una mayor autoadministración de anfetamina en las ratas sociales en comparación con las aisladas (Phillips et al., 1994). Schenk et al. (1988) examinaron la autoadministración de anfetamina y no encontraron diferencias entre los grupos aislados y sociales utilizando una dosis alta (0.25 mg/kg por infusión), lo cual podría ser la causa de que no hubiera diferencias entre los grupos.

Un número importante de diferencias en los procedimientos metodológicos hace que las comparaciones entre los resultados de estos estudios con respecto al presente estudio sean difíciles, como son la cepa de ratas utilizadas, la duración de la sesión, la ruta de administración y la droga administrada así como las dosis utilizadas.

Hay indicios de que las alteraciones inducidas por las diferentes condiciones de crianza de los sujetos en respuesta a varias drogas de abuso son fruto de cambios en la función del sistema dopaminérgico mesolímbico (Bowling et al., 1993; Koob, 2000; Zhang et al., 2005) Igualmente, entre hombres y mujeres también existen diferencias en los sistemas neurotransmisión dopaminérgica que deben tenerse en cuenta en el estudio de los trastornos adictivos. Por ejemplo, cuando se examinó la respuesta de la dopamina inducida por estimulantes, se vio que las ratas hembra tendían a presentar una mayor respuesta dopaminérgica que los machos tras la administración de la droga, y además cuando estudiaron fragmentos de tejido del estriado 'in vitro' obseraron que el relevo de dopamina estimulado por anfetamina fue mayor en las hembras que en los machos (Becker y Ramírez, 1981).

Respecto a la función dopaminérgica, se sabe la presentación de estímulos reforzadores primarios como la comida, la novedad o diferentes drogas de abuso produce un incremento en la actividad de la dopamina en el núcleo accumbens, lo cual a su vez lleva a la activación locomotora y la conducta de acercamiento; por lo tanto podemos suponer que también la situación de enriquecimiento, en la que los animales están expuestos periódicamente a nuevos estímulos, podría alterar el sistema mesolímbico dopaminérgico. En relación con esto, en un estudio se vio que el enriquecimiento alteraba los niveles de DA en diversas

regiones cerebrales con respecto a los animales aislados (Riege y Morimoto, 1970), sin embargo, los datos de estudios más recientes no son concordantes porque no han encontrado diferencias entre ratas enriquecidas y aisladas en los niveles de receptores de dopamina D1 y D2 en el núcleo accumbens (Bardo y Hammer, 1991), ni en los niveles basales de dopamina o en el relevo de este neurotransmisor inducido por anfetamina en el núcleo accumbens (Bowling et al., 1993).

Tampoco se han encontrado diferencias entre animales enriquecidos y aislados en la síntesis de dopamina estimulada por la administración de morfina en los sistemas mesolímbico y negroestriado, aún cuando sí se detectaron diferencias mediante el paradigma del condicionamiento de preferencia de lugar, donde se observó que los animales enriquecidos mostraron un condicionamiento mayor al compartimento asociado a la morfina que el que mostraron los animales aislados. No obstante, las ratas aisladas fueron las que mostraron una mayor sensibilización motora ante administraciones repetidas de la droga, todo lo cual, sugiere además que los efectos locomotores y los efectos reforzantes de la morfina pueden depender de diferentes sustratos neuronales (Bardo et al., 1997). Estos resultados sugieren que los efectos de la estimulación de la conducta debido a la administración aguda de anfetamina en los animales enriquecidos pueden reflejar diferencias en la farmacocinética, o en la farmacodinámica de algunas regiones cerebrales diferentes del núcleo accumbens, es decir, las diferencias en la sensibilidad a los efectos conductuales de la anfetamina en los animales enriquecidos respecto a los aislados pueden depender de mecanismos distintos a las terminales mesolímbicas (Bardo et al., 1995). Por ejemplo, estas diferencias pueden deberse a cambios en regiones corticales, como la corteza prefrontal medial (mPFC), un área que juega un importante papel en el refuerzo de drogas, especialmente en la recaída y la conducta compulsiva de búsqueda de drogas (Wise, 2002; Everitt y Robbins, 2005).

Es posible que las ratas enriquecidas presenten una mayor conducta de búsqueda de cocaína porque son más sensibles a las propiedades incentivo-motivacionales de la cocaína. Robinson y Berridge (2000) han propuesto que tras el uso continuado de droga, el valor incentivo-motivacional de las drogas y de los estímulos asociados a ellas aumentan, lo que conduce a un aumento de la motivación por la búsqueda de droga y de la conducta de consumo de droga debido a la sensibilización de los sistemas de refuerzo. Además, se ha visto que la administración de cocaína produce cambios dopaminérgicos a varios niveles, por ejemplo actúa sobre el transportador de la dopamina (DAT), que interviene en la

regulación de la concentración de DA extracelular, ya que transporta la DA extracelular hacia el terminal presináptico (Bowling et al., 1993). Los psicoestimulantes, como la cocaína y la anfetamina, inhiben la función del DAT lo que lleva a un incremento en la concentración de DA extracelular. Pues bien, se ha visto que ratas enriquecidas presentan una disminución (35%) de la velocidad máxima (V_{max}) de la recaptación de DA en el cortex prefrontal medial (mPFC) comparadas con ratas estabuladas en condiciones de aislamiento social, y ello se debe a una menor expresión del DAT (39%) en la superficie celular; este efecto es específico del mPFC, ya que no se ha observado en el núcleo accumbens ni en el estriado (Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2005). Los autores de estos trabajos sugieren que la exposición repetida a la novedad durante el desarrollo podría activar sistemas neuronales en el mPFC produciendo alteraciones en las cascadas de señalización celulares, lo cual a su vez podría relacionarse con otros cambios a nivel de respuesta y funcionalidad celular (Zhu et al., 2005). En relación con esto, recientemente, también se ha demostrado que las ratas enriquecidas comparadas con las aisladas presentan una disminución en la densidad de los receptores D1 en la corteza prefrontal (PFC), y la administración de un agonista D1 (SKF38393) en el PFC produce un aumento en la locomoción y en los niveles de acetilcolina que es más reducida en el grupo de enriquecidos comparados con los animales aislados (Del Arco et al., 2007a).

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que el EA alteró la sensibilidad a los efectos reforzantes de la cocaína. Mientras que en el entrenamiento de refuerzo operante por comida no se observaron diferencias entre los diferentes grupos, el EA aumentó específicamente la conducta de autoadministración de cocaína en machos y hembras respecto a los grupos control en los programas de refuerzo de FR1, FR3 y FR5. Además, el enriquecimiento afectó especialmente a las hembras, que mostraron un mayor aumento en la conducta de búsqueda de drogas en comparación con los machos en estos programas de refuerzo, en cambio, cuando se realizó la sesión de razón progresiva el enriquecimiento afectó diferencialmente a machos y hembras, de modo que aumentó el consumo de cocaína en los machos y lo disminuyó en las hembras enriquecidas.

5. CONCLUSIONES

1. El EA no modificó los niveles de actividad motora basal en las jaulas de los animales durante las fases de luz-oscuridad.
2. Las hembras mostraron mayores niveles de actividad motora basal durante el período de luz en comparación con los machos.
3. El EA disminuyó el peso de machos y hembras.
4. El EA no modificó la ingesta de los animales respecto a los grupos control.
5. No se observaron diferencias de sexo ni de tratamiento en la adquisición de la conducta operante por la obtención de comida.
6. Las hembras mostraron una mayor conducta de autoadministración de cocaína que los machos en los programas de refuerzo de FR1, FR3 y FR5.
7. El EA aumentó la autoadministración de cocaína en machos y hembras respecto a los animales control en FR1, FR3 y FR5.
8. El tratamiento de EA afectó diferencialmente a machos y hembras en la autoadministración de cocaína en el programa de refuerzo de razón progresiva, aumentando el número de infusiones recibidas en los machos y disminuyéndolo en las hembras.
9. El EA aumentó la conducta de búsqueda de droga en las hembras como se observa de forma general por los niveles más elevados de respuestas totales en la palanca activa por parte de las hembras enriquecidas.

10. Un mayor porcentaje de hembras (aunque no significativo) adquirieron la autoadministración de cocaína con respecto a los machos, pero el tratamiento de EA no afectó al porcentaje de adquisición de autoadministración de cocaína.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados específicos que hemos obtenido en cada uno de los estudios del presente trabajo se han discutido en las secciones anteriores correspondientes. En este apartado final expondremos las aportaciones globales que consideramos más interesantes e intentaremos contrastarlas con el propósito de extraer algunas ideas o conclusiones generales.

A lo largo de este trabajo hemos ido presentando los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de conducta en machos y hembras y hemos podido ver que no todos los resultados van en la misma dirección, y si bien la literatura apunta generalmente a un efecto beneficioso del EA, establecer qué entendemos por ‘beneficioso’ no resulta siempre tan obvio. La Tabla 6 que se presenta a continuación contiene un resumen de los resultados más relevantes de cada uno de los experimentos, el análisis conjunto de los datos nos proporcionará un perfil conductual completo sobre los efectos del EA en los dos sexos a partir del cual podremos establecer las conclusiones finales.

Sobre los resultados principales de este trabajo

Nuestros datos indican que el EA produce efectos similares en machos y hembras en algunos de los parámetros evaluados mientras que en otros afecta predominantemente a un sexo o incluso ejerce efectos opuestos en uno y en otro. Por ejemplo, en la primera fila de la Tabla 6 se observa el resultado de disminución de peso de forma consistente a lo largo de los estudios, un efecto del EA que se produjo en machos y hembras, aunque en el Estudio II este efecto fue más acentuado y duradero en los machos. Ello podría ser debido a una mayor susceptibilidad de los machos a los efectos del EA aunque también podría explicarse por la diferencia de peso existente entre machos y hembras; en cualquier caso se trata de una variable que alcanza valores superiores en los machos, lo cual a su vez, amplía el margen de disminución con respecto a las hembras. Además, hay ciertas evidencias sugiriendo que en algunos casos las hembras pueden ser menos susceptibles que los machos a determinadas influencias ambientales en edades tempranas. Por ejemplo, se ha visto que la malnutrición temprana afecta el crecimiento corporal y cerebral (Crutchfield y Dratman, 1980; Jones y Friedman, 1982) y la conducta (Galler y Manes, 1980) de las ratas macho en mayor grado que las hembras, y lo mismo ocurre con otras intervenciones ambientales como los procedimientos de separación maternal (Lehmann et al 1999a); si bien, otros estudios parecen indicar una mayor sensibilidad de las hembras a los efectos otros tipos de intervenciones tempranas, como por ejemplo el estrés prenatal. Mc Cormick y

Tabla 6. Resumen de resultados principales

Estudio I	Estudio II	Estudio III
<p>Pesos -El EA disminuye el peso de machos y hembras</p> <p>Experimentos 1 y 2. Discriminación Social 30' con juveniles macho y Discriminación Social 30' con juveniles hembra -Los machos exploran más que las hembras en T1 y T2 -Los machos exploran más que las hembras a los juveniles hembra en T1 y T2 -En T2 hay reconocimiento social en todos los grupos -El EA aumenta la exploración de los machos adultos pero no de las hembras hacia los juveniles macho y hembra en T2.</p> <p>Experimento 3. Laberinto elevado en cruz -Las hembras realizaron más entradas totales que los machos -Las hembras recorrieron más distancia total que los machos -El EA aumentó el % de EBA</p>	<p>Pesos -El EA disminuye el peso de machos y hembras, especialmente en los machos</p> <p>Experimento 7. Discriminación Social 30' con juveniles macho -No reconocimiento social en T2 en ningún grupo -Disminución de la exploración en T2 en todos los grupos excepto en el de enriquecidos macho</p> <p>Experimento 8. Discriminación Social 15' con juveniles macho -Machos exploran más que hembras en T1 y T2 -El EA aumentó el reconocimiento social en machos y lo disminuyó en hembras</p> <p>Experimento 5. Laberinto elevado en cruz -Hembras realizaron más actividad que machos (+DBC y DT) y más exploración (+RBC y RT) -El EA disminuyó la emotividad (+TC, EBA, DBA, RCA, RT, RC y SA y -SCA)</p> <p>Experimento 4. Tabla de agujeros y respuesta HPA -El EA aumentó el número y tiempo de HD en los primeros 2' -El EA aumentó el número de rearings -Las hembras recorrieron más distancia que los machos -Las hembras defecaron menos que machos -Las hembras presentaron mayores niveles de ACTH y CORT basales y tras el HB -El EA disminuyó la CORT tras el HB en machos y hembras</p> <p>Experimento 6. Respuesta de sobresalto y PPI -Machos y hembras igual respuesta de sobresalto y no habituación -El EA disminuyó el PPI en machos y hembras</p> <p>Experimento 9. Laberinto Hebb-Williams -Las hembras adquirieron el criterio más rápido que los machos -El EA disminuyó el número de errores, la distancia total recorrida y las latencias de llegada -Las hembras presentaron menos latencia que los machos</p>	<p>Experimento 10. Actimetría, control de ingesta y pesos -El EA disminuye el peso de machos y hembras -Las hembras mostraron más actividad basal que los machos en el período de luz. -El EA no modificó la actividad motora basal de los animales -El EA no modificó la ingesta</p> <p>Experimento 11. Entrenamiento de refuerzo por comida -No diferencias de sexos en la adquisición -El EA no afectó a la adquisición -No diferencias de sexo ni tratamiento en las respuestas totales en la palanca activa en las sesiones de entrenamiento ni en la sesión de PR por comida</p>
<p>Experimento 12. Autoadministración de cocaína FR1 -Las hembras se autoadministraron más cocaína que los machos -Tendencia a un mayor % de hembras que adquieran el criterio de autoadministración en comparación con los machos -El EA aumentó la autoadministración de cocaína en machos y hembras -El EA aumentó las respuestas totales en la palanca activa en las hembras FR3 -Las hembras se autoadministraron más cocaína que los machos -El EA aumentó la autoadministración en machos y hembras FR5 -El EA aumenta el consumo y las respuestas totales en la palanca activa en todos los animales. Se observa una progresión en los machos, aunque disminuye en las hembras en las últimas sesiones PR -El EA aumenta las infusiones recibidas y las respuestas activas totales en los machos y las disminuye en las hembras</p>		

EA: Enriquecimiento Ambiental; T1: ensayo 1; T2: ensayo 2; EBA: entradas en brazos abiertos; DBC: distancia en los brazos abiertos; DT: distancia total; RBC: rearings en los brazos cerrados; RT: rearings totales; TC: tiempo en el centro; DBA: distancia en los brazos abiertos; RCA: rearings en el centro y en brazos abiertos; RC: rearings en el centro; SA: stretchings en los brazos abiertos; SCA: stretchings de los brazos cerrados a los abiertos; HD: head-dips; HB: tabla de agujeros; PPI: porcentaje de inhibición prepulso

colaboradores (1995) sometieron a estrés por inmovilización a ratas hembra durante los días 15-19 de gestación y posteriormente evaluaron la activación del eje HPA en la descendencia, encontrando una mayor respuesta de corticosterona y ACTH en respuesta al estrés por inmovilización en las ratas hembra que habían sufrido estrés prenatal en comparación con los machos (McCormick et al., 1995).

Con respecto a la actividad motora, los experimentos 3 y 5 indicaron que las hembras hacían más entradas totales y recorrieron distancias más largas en los brazos del laberinto elevado en cruz que los machos, en el experimento 4 las hembras recorrieron más distancia que los machos en la tabla de agujeros, en el experimento 10 de actimetría vemos que las hembras mostraban más actividad basal que los machos en las jaulas de estabulación durante el período de luz, todo lo cual confirma y es consistente con que las hembras son en general más activas que los machos. En cambio, en relación a la conducta exploratoria general no observamos diferencias entre sexos en la tabla de agujeros pero con respecto a la exploración social los machos mostraron valores de exploración más altos que las hembras (experimentos 1, 2, 7 y 8), lo cual nos permite precisar que hay que tener en cuenta los distintos componentes de la exploración, ya sea social o de las características físicas del ambiente, con respecto a los patrones de investigación. Además, el EA afectó de manera distinta estos tipos de exploración; por un lado, aumentó globalmente en los dos sexos la exploración inicial en la tabla de agujeros durante los dos primeros minutos (experimento 4) pero en los experimentos de discriminación social aumentó la exploración social en los machos adultos específicamente (experimentos 1, 2, y 8).

Con respecto a la emotividad (experimentos 3-6) el EA parece afectar de igual modo a machos y hembras en paradigmas que involucran un componente ansiogénico como el laberinto elevado en cruz o el estudio de la respuesta hormonal. Así, el EA sí disminuyó globalmente la emotividad de los animales en el laberinto elevado en cruz y la reactividad del eje HPA en respuesta a la exposición a la tabla de agujeros, lo cual se considera una situación de estrés intermedio. Además el efecto ansiolítico no se observa sólo por la disminución de los niveles plasmáticos de corticosterona tras la exposición al aparato sino también por el aumento inicial de la exploración a los agujeros que observamos en los animales enriquecidos, hecho que también se sustenta por la conducta realizada en el laberinto elevado en cruz, sobretodo cuando se tienen en cuenta aquellas medidas más etológicas en el análisis de la conducta (Rodgers y Dalvi, 1997).

Sin embargo, estas diferencias en variables emocionales no se corresponden con los datos obtenidos en la respuesta de sobresalto (experimento 6), en este paradigma no observamos diferencias entre sexos ni en función del tratamiento de EA en la respuesta, así como tampoco encontramos diferencias entre los grupos en la medida de habituación.

Probablemente, el mecanismo por el cual el EA puede generar resistencia al estrés en determinadas situaciones involucra procesos cognitivo-conductuales, celulares y moleculares. El EA proporciona diferentes formas de estimulación, ya sea cognitiva, social, acrobática, motora y sensorial, y para entender los mecanismos de acción del EA es importante dissociar los efectos de estos componentes. Se ha visto que tanto los componentes sociales como los físicos contribuyen a los efectos del EA por lo que sus efectos podrían sustentarse en diferentes sustratos neuronales (Schrijver et al., 2002). Otros investigadores han explicado los efectos del EA en respuesta al estrés en términos de percepción de control sobre el ambiente, basándose en que el enriquecimiento proporciona oportunidades constantes al animal para estructurar y organizar su ambiente otorgándole cierto grado de control sobre el entorno de manera que este aumento en la percepción del grado de control disminuiría el estrés del animal (Van Praag et al., 2000; Fox et al., 2006). Alternativamente, también se ha sugerido que el EA puede representar un mecanismo de inoculación al estrés, de manera que la introducción repetida de nuevos objetos y la oportunidad de explorarlos podría compararse a la exposición repetida a estrés intermedio, aumentando la estabilidad emocional de los animales enriquecidos (Larsson et al., 2002). Este efecto de inoculación al estrés podría explicar el efecto ansiolítico del EA y el aumento de la exploración hacia los estímulos nuevos que muestran nuestros datos y los de otros autores (Widman y Rosellini, 1990; Larsson et al., 2002). Sin embargo, no hay consenso con respecto a los efectos del EA sobre los niveles de corticosterona basal, si bien en nuestro estudio el EA no afectó a esta variable, y consistentemente otros trabajos tampoco encontraron diferencias en los niveles basales de corticosterona entre animales enriquecidos y controles (Pham et al., 1999; Roy et al., 2001), aunque otros autores sugieren que el EA disminuye la actividad del eje HPA en condiciones basales (Mohammed et al., 1993; Larsson et al., 2002), indicando que el EA disminuía los niveles de corticosterona basal (Belz et al., 2003) o tras la exposición a situaciones estresantes (Roy et al., 2001; Francis et al., 2002; Welberg et al., 2006) o incluso describen que los animales enriquecidos presentan mayores niveles basales de corticosterona que los controles (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Moncek et al., 2004). Según algunos autores esto último podría deberse a que los

animales enriquecidos tienen glándulas adrenales mayores como consecuencia de la exposición repetida a nuevos objetos (Moncek et al., 2004). Por otro lado, se ha visto que los animales enriquecidos presentan un aumento en los niveles de receptores de glucocorticoides en el hipocampo, lo cual podría causar un aumento de la sensibilidad a los glucocorticoides, y esto a su vez, aumentar el feedback negativo desde el hipocampo al hipotálamo, suprimiendo así el relevo de CRF (Mohammed et al. 1993; Olsson et al. 1994). Otro de los efectos comunes del EA en machos y hembras lo observamos en el laberinto Hebb-Williams, donde el EA mostró efectos beneficiosos en ambos sexos mejorando la ejecución de los animales enriquecidos con respecto a los animales control en los diferentes tipos de problemas. Este efecto de mejora del rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria es uno de los más consistentemente descritos en la literatura y a menudo se presenta asociado a efectos de plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal (para revisión ver Van Praag et al., 2000) hasta el punto de que se ha propuesto que el EA podría compensar los déficit conductuales y las deficiencias en la expresión de genes, la función sináptica y los fenómenos de plasticidad en los modelos murinos de enfermedades degenerativas o genéticas (Martínez-Cue, 2001). Por ejemplo, con respecto a la enfermedad de Huntington, se ha visto que el EA retrasa la aparición de los síntomas motores y el desarrollo de la enfermedad en ratones (Hockly et al., 2002). Incluso un estudio epidemiológico en pacientes humanos con Huntington mostró un claro papel de los factores ambientales en la modulación de la manifestación clínica de la enfermedad (Wexler et al., 2004) y que un ambiente estimulante mejoraba el funcionamiento físico, mental y social de una muestra de pacientes con Huntington (Sullivan et al., 2001b).

Pero en nuestro conjunto de datos observamos efectos diferenciales del EA en la discriminación social (experimento 8). Aparentemente las hembras enriquecidas discriminaron peor que ningún otro grupo a las ratas juveniles, en cambio los machos enriquecidos fueron quienes discriminaron mejor entre los dos tipos de animales juveniles. El experimento de Hebb-Williams demuestra que esto no es debido a un déficit de memoria, puesto que las hembras ejecutaron correctamente los problemas del laberinto. Otra hipótesis, que retomaremos más adelante, se basaría en cambios en la motivación social de estas hembras enriquecidas, de manera que la disminución en la discriminación podría ser debida en parte a una falta de motivación para la interacción con los congéneres juveniles.

Los efectos del tratamiento en el laberinto contrastan con los resultados obtenidos en la medida del filtraje sensoriomotor (experimento 6), donde el EA provocó una disminución de la inhibición prepulso, lo cual se interpreta habitualmente como que los mecanismos atencionales relacionados con el filtraje sensorial han sido alterados produciendo una disminución en la capacidad de detección o de procesamiento sensorial; paradójicamente, este efecto se ha descrito generalmente en animales que han sufrido aislamiento social desde el destete con el objetivo de modelar la sintomatología relacionada con los trastornos psicóticos (Geyer et al., 1993; Swerdlow et al., 2000). Aunque la mayoría de estudios muestran que los efectos del enriquecimiento y del empobrecimiento ambiental son opuestos, en ocasiones se observan cambios en la misma dirección, y normalmente estos cambios se han relacionado con el sistema de neurotransmisión dopaminérgico (Varty et al., 2000). Así, por ejemplo, se ha mostrado que ratas enriquecidas y aisladas presentan aumentos similares en algunas variables neuroquímicas como los niveles de dopamina cortical (Jones et al., 1992), sugiriendo que tal vez las variaciones en este neurotransmisor estén implicadas en el déficit en PPI observado en nuestras ratas enriquecidas.

En nuestro estudio no detectamos diferencias globales de sexo en los valores de PPI. A este respecto la literatura ofrece resultados contradictorios, de manera que algunos estudios realizados con animales de laboratorio describen una disminución en el PPI en ratas macho respecto a las hembras (Faraday et al. 1999, Lehmann et al 2000), mientras que otros no hallan diferencias de inhibición prepulso en función del sexo (Swerdlow et al., 1993). En otro estudio donde las ratas fueron expuestas a una toxina prenatal, no se encontraron diferencias de sexo en el porcentaje global de inhibición prepulso aunque sí en la edad de aparición de los déficit, de manera que fueron los machos quienes mostraron antes que las hembras las alteraciones en PPI que las hembras, lo cual se asemeja a las diferencias sexuales en cuanto a la edad de aparición de los síntomas de la esquizofrenia (Borrell et al., 2002). Los estudios con humanos muestran que los hombres presentan una mayor PPI que las mujeres (Swerdlow et al., 1993), pero estos resultados parecen poco consistentes. Blumenthal y Gescheider (1987) encontraron valores de PPI más reducidos en las mujeres con respecto a los hombres cuando utilizaron como prepulso un estímulo táctil, pero no obtuvieron este resultado en una replicación posterior utilizando varias intensidades diferentes de prepulso. En otro experimento realizado con niños y niñas de 8 años de edad también se observó inicialmente un PPI reducido en las mujeres, pero estas diferencias de sexo observadas tampoco se replicaron en otros experimentos con adultos o con niños de 5

años de edad (Ornitz et al., 1991). Otro estudio realizado en humanos demostró la estabilidad en el tiempo de los valores de PPI, replicándolo en los mismos sujetos una vez al mes durante 3 meses, no encontrando diferencias entre hombres y mujeres en inhibición prepulso (Ludewig et al., 2003).

En cuanto a los resultados obtenidos en el Estudio III sobre la autoadministración de cocaína observamos que el EA aumentó de forma diferencial el consumo de la droga en machos y hembras. Si bien los animales enriquecidos presentaron globalmente un consumo de cocaína mayor que los animales control, en nuestro experimento también aparecieron los efectos de sexo descritos en la literatura y que indican un mayor consumo de cocaína por parte de las hembras en comparación con los machos. Sin embargo, algunos estudios indican que el EA podría ejercer un papel protector en la autoadministración de otras sustancias psicoestimulantes como la anfetamina (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002), aunque este dato tampoco es consistente con el aumento en el consumo de alcohol y de cocaína observados mediante el paradigma de las dos botellas (Hill y Powell, 1978; Fernández-Teruel et al., 2002), o con el aumento del condicionamiento de preferencia de lugar ante la administración de agonistas κ opioides (Smith et al., 2003). En general, los resultados a favor de una autoadministración reducida en los animales enriquecidos sólo se obtienen cuando se utilizan dosis bajas de droga, y las diferencias más sustanciales se han obtenido comparando el consumo de los sujetos enriquecidos con respecto al grupo de animales aislados, sin que podamos disponer de datos comparativos con un grupo social, lo cual indica que tal vez estas diferencias se deban, en parte, a las alteraciones propias del aislamiento social y no a un efecto específico del enriquecimiento (Geyer et al., 1993).

Las inconsistencias observadas entre los resultados del presente trabajo en la autoadministración de cocaína y los resultados obtenidos por otros autores en la autoadministración de anfetamina podrían deberse también a diferentes adaptaciones neuronales en respuesta al enriquecimiento y a los mecanismos de acción de las drogas. Esto es, mientras que la anfetamina aumenta el relevo de DA inhibiendo la función del DAT y la recaptación de la DA, la cocaína actúa específicamente inhibiendo la función del DAT (Bowling et al., 1993). Por otro lado, algunos autores apuntan que las diferencias conductuales en la autoadministración de anfetamina y cocaína podrían también deberse a los efectos de la anfetamina sobre otros sistemas de neurotransmisión como la serotonina o la adrenalina (Zhu et al., 2004).

Pero volviendo al sistema dopaminérgico, las ratas enriquecidas presentaron una disminución de la función del transportador de dopamina (DAT) en la corteza prefrontal medial (mPFC) y a nivel conductual, la administración de un inhibidor selectivo del transportador de la dopamina (DAT), el BGR 12935, aumentó la actividad motora de las ratas enriquecidas con respecto a las aisladas y tras la administración repetida de esta sustancia sólo las ratas enriquecidas mostraron sensibilización motora (Zhu et al., 2004). Curiosamente, los efectos de disminución de la función del DAT y del metabolismo de la DA fueron específicos del mPFC y no se observaron en el estriado ni en el núcleo accumbens, sugiriendo que el aumento en la sensibilidad de los efectos locomotores de la administración de esta sustancia fue debido a estas alteraciones de la función dopaminérgica específicamente en el mPFC. Tal vez, estos cambios en los circuitos dopaminérgicos derivados del tratamiento de EA estén relacionados también con la disminución en el PPI y el aumento de autoadministración de cocaína observado en nuestras ratas enriquecidas en los Estudios II y III, respectivamente.

Además, trabajos previos han demostrado que el mPFC juega un papel importante mediando el refuerzo de drogas, la recaída de la conducta de búsqueda de drogas y la adicción (Everitt y Robbins, 2005). El mPFC tiene proyecciones excitatorias glutamatérgicas directas al núcleo accumbens, y de hecho, el relevo de DA en el mPFC inducido por la aplicación local de anfetamina produce una disminución del relevo de DA en el accumbens (Karreman y Moghaddam, 1996). Además, el EA también disminuyó el metabolismo de DA (disminuyó el contenido de DOPAC) en el mPFC y este efecto no se observó en los animales aislados, lo cual podría estar relacionado con la disminución de la función del DAT en el mPFC (Zhu et al., 2004). Así, la disminución de DOPAC en el mPFC podría reflejar una disminución en el relevo de DA y del contenido de DA en esta región, ello a su vez llevaría a un aumento en el relevo de DA en el estriado y el núcleo accumbens lo cual aumentaría la propensividad a la sensibilización conductual tras la repetida administración de cocaína (Zhang et al., 2005).

Como decimos, estos cambios descritos tras el enriquecimiento en la función dopaminérgica en el mPFC podrían estar relacionados también con el déficit en PPI observado en los sujetos de nuestro estudio. Se ha visto que manipulaciones farmacológicas de los sistemas serotoninérgicos, adrenérgicos, glutamatérgicos y dopaminérgicos alteran el PPI en ratas (Swerdlow et al., 2000). Es más, la administración de anfetamina también produce déficits en PPI, y pacientes esquizofrénicos también presentan estos déficits en PPI

(Braff et al., 1999). Recientemente, Zhang y colaboradores (2005) sugirieron que los déficits en PPI pueden deberse a un aumento de la transmisión dopaminérgica en regiones subcorticales y a una disminución de esta sustancia en la corteza, concretamente en el mPFC. Se ha visto que la regulación correcta del filtraje sensoriomotor requiere niveles de funcionalidad óptimos de transmisión dopaminérgica a nivel del mPFC, por lo que una función disminuida podría ser consecuencia de un exceso o una disminución de DA en el mPFC; así, se ha visto que una activación excesiva o deficiente de los receptores D1 produce una disminución del PPI en ratas y monos (Arnsten y Goldman-Rakic, 1998; Seamans et al., 1998), y en concordancia con ello, datos recientes indican que el enriquecimiento provoca una disminución de los receptores D1 en el mPFC (Del Arco et al., 2007a).

Los datos del Estudio II son en cierto modo paradójicos porque de una parte, la disminución en el PPI reflejaría un empeoramiento de los mecanismos de filtraje atencional en las ratas enriquecidas, mientras que en el experimento que se realizó a continuación y en el que se evaluó la capacidad de aprendizaje en el laberinto Hebb-Williams, los mismos animales no mostraron alteraciones en las funciones cognitivas, de hecho, estas mismas ratas enriquecidas presentaron una ejecución mejor que las controles en el laberinto incluso un año después de que acabara el enriquecimiento, lo cual indica además que los efectos del tratamiento en tareas de aprendizaje complejas son duraderas. Pero además, los resultados obtenidos en la evaluación del filtraje sensoriomotor no fueron los únicos que nos sorprendieron, de hecho, los efectos diferenciales del enriquecimiento en las pruebas de discriminación social fueron también inesperados. Consistentemente, los machos mostraron un aumento en los tiempos de interacción social con los juveniles en comparación con las hembras, y en este caso, el enriquecimiento potenció este patrón de modo que aumentó la exploración social en los machos y la disminuyó en las hembras, al igual que pasó con el reconocimiento social. No obstante, considerando la conducta de estas mismas hembras enriquecidas en el laberinto Hebb-Williams, donde mostraron niveles de ejecución similares a los machos enriquecidos, nos inclinamos a pensar que la disminución observada en el reconocimiento social no se debió específicamente a un fallo en los mecanismos de memoria, sino más bien reflejó la intervención de otros factores de carácter motivacional. Esto es, las hembras enriquecidas parecían presentar una motivación disminuida por la exploración social.

Sobre los procedimientos de EA y la heterogeneidad de los efectos descritos

Los protocolos experimentales del EA varían entre laboratorios, al igual que los objetos utilizados para el tratamiento, los cuales cambian en su composición, forma, tamaño, textura, olor y color. Además, otro componente presente en algunos protocolos de enriquecimiento son las ruedas de actividad, con importantes implicaciones sobre el aumento del ejercicio físico voluntario que hacen los sujetos y que produce efectos positivos similares al enriquecimiento ambiental (Will et al., 2004). En conjunto, no está bien establecido cual de los componentes del enriquecimiento es el causante de los cambios que produce en muchas facetas del organismo. Por un lado, la complejidad ambiental provee de mayores oportunidades para la estimulación social, somatosensorial y olfativa; además, la novedad que se consigue cambiando periódicamente los objetos o la posición de estos en el espacio proporciona estimulación cognitiva adicional que puede mejorar la formación de mapas cognitivos. Todos estos factores pueden comportar un aumento en la estimulación y en la actividad física, además de en las diferentes formas de interactuar con los individuos que forman parte del ambiente. En relación al ejercicio físico, cuando se estudian sus efectos de forma aislada se ha encontrado algunos efectos que coinciden con los del EA, como son un aumento de los niveles de BDNF y de la angiogénesis (Isaacs et al., 1992), de la proliferación y la supervivencia de las células del hipocampo (Van Praag et al., 1999) y del número de células de microglía en la corteza (Czurko et al., 1999) así como también se observan mejoras en tareas de aprendizaje (Radak et al., 2001).

Otro aspecto a tener en cuenta es el momento de la vida del individuo en el que se provee de la experiencia de EA, de manera que aunque parece ejercer efectos beneficiosos a cualquier edad también ha mostrado sus efectos morfológicos más contundentes cuando se aplica durante etapas tempranas del desarrollo (Renner y Rosenzweig, 1987). A modo de resumen, se ha visto que el EA administrado en etapas infantiles produce cambios en el peso y grosor cortical (Rosenzweig et al., 1962; Diamond et al., 1964) incrementa las ramificaciones y la longitud de las dendritas y el número de espinas dendríticas (Volkmar y Greenough, 1972; Berman et al., 1996), aumenta la neurogénesis hipocampal y la integración de estas nuevas células en circuitos funcionales (Kempermann et al., 1997a,b; Segovia et al., 2006) y los niveles de neurotrofinas como el BDNF y el NGF que están relacionados en la comunicación neuronal (Ickes et al., 2000; Rampon et al., 2000a). Estos cambios son consistentes con las alteraciones en la expresión de genes relacionados con la

función sináptica y la plasticidad celular y con la expresión de proteínas sinápticas como la sinaptofisina y la PSD-95. El EA también induce alteraciones en la expresión de las subunidades de los recetores NMDA y AMPA, fortaleciendo las sinapsis además de inducir formas específicas de plasticidad como la potenciación a largo plazo (LTP) (Green y Greenough, 1986).

Los resultados con animales de laboratorio nos ofrecen la posibilidad de estudiar con precisión las interrelaciones que se producen entre el sujeto y el ambiente específico en el que se desarrolla. Las implicaciones prácticas y teóricas de este tipo de investigaciones son enormes. El cerebro es un órgano enormemente plástico que responde de forma constante a los estímulos externos que configurarán de algún modo al individuo. En humanos, se ha descrito que sucesos negativos o traumáticos durante la infancia y a lo largo de la vida, pueden provocar efectos negativos a largo plazo. Asimismo, también se han mostrado efectos beneficiosos del enriquecimiento ambiental en la prevención de los déficit asociados a la edad o paliando situaciones adversas en la infancia de niños desfavorecidos con el objetivo de mejorar sus funciones cognitivas y su desarrollo emocional.

Pero no todos los organismos pueden ser igualmente susceptibles a las determinadas experiencias del medio y algunos pueden mostrar mayor flexibilidad conductual que otros. Una variable que determina particularidades en el funcionamiento cerebral de algún modo es el sexo del individuo, no sólo por la diferente carga genética y hormonal sino también por los diferentes patrones culturales que moldearán o influirán el desarrollo del individuo favoreciendo o inhibiendo determinados modos de comportamiento. Establecer hasta qué punto determinados comportamientos sociales son fruto de las convenciones establecidas o si estas convenciones son fruto de determinantes biológicos subyacentes es una tarea difícil y controvertida. No obstante, e independientemente de las razones de estas diferencias, se evidencia la distinta respuesta que se produce ante un mismo evento en dos organismos distintos, y más aún si uno es un hombre y otro una mujer.

V. CONCLUSIONES GENERALES

Ausencia de efectos

1. El tratamiento de EA no afectó a los niveles de ingesta ni a la actividad motora basal en las jaulas de los animales durante los períodos de luz-oscuridad respecto a los animales control.
2. El EA no alteró los niveles basales de las hormonas ACTH y corticosterona.
3. El EA no afectó a la respuesta ante el estímulo de sobresalto acústico ni la habituación de la respuesta.
4. No se observaron diferencias de sexo ni de tratamiento en la adquisición de la conducta operante por la obtención de comida

Diferencias de sexo

5. El EA provocó una disminución de peso
6. Los machos mostraron una mayor conducta de exploración social hacia los juveniles en comparación con las hembras.
7. Las hembras presentaron mayores niveles de actividad motora basal durante el período de luz en comparación con los machos.
8. Las hembras presentaron mayores niveles de actividad motora como se muestra por el aumento de la distancia recorrida en el laberinto elevado en cruz y la tabla de agujeros y por la menor latencia observada en la resolución de los problemas del laberinto Hebb-Williams.
9. Las hembras mostraron una adquisición más rápida del aprendizaje en el laberinto Hebb-Williams en comparación con los machos.
10. Las hembras presentaron mayores niveles de ACTH y corticosterona basales y en respuesta a la exposición a la tabla de agujeros con respecto a los machos.
11. Las hembras mostraron una mayor conducta de autoadministración de cocaína que los machos en los programas de refuerzo de FR1, FR3 y FR5.
12. Un mayor porcentaje de hembras (aunque no significativo) adquirió la autoadministración de cocaína con respecto a los machos.

Efectos comunes del tratamiento de EA en machos y hembras

13. El EA disminuyó la emotividad de machos y hembras como se muestra por la mayor conducta en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, la mayor exploración durante los primeros minutos de la exposición a la tabla de agujeros y la menor reactividad del eje HPA ante esta última prueba respecto a los animales control.
14. El EA disminuyó el porcentaje de inhibición prepulso en machos y hembras respecto a los grupos control.
15. El EA mejoró el aprendizaje espacial en el laberinto Hebb-Williams en machos y hembras respecto a los animales control: disminuyó el número de errores, la distancia recorrida y la latencia de llegada a la meta.
16. El EA aumentó la autoadministración de cocaína en machos y hembras respecto a los animales control en FR1, FR3 y FR5.

Efectos diferenciales del tratamiento de EA en función del sexo

17. La disminución de peso por el EA se produjo de forma más marcada en los machos.
18. El EA aumentó la exploración y el reconocimiento social en los machos y los disminuyó en las hembras.
19. El EA aumentó de forma global la conducta de búsqueda de droga en las hembras, que fueron las que presentaron los niveles más elevados de respuestas totales en la palanca asociada a la cocaína.
20. El tratamiento de EA afectó diferencialmente a machos y hembras en la autoadministración de cocaína en el programa de refuerzo de razón progresiva, de modo que aumentó el número de infusiones recibidas en los machos y las disminuyó en las hembras.

REFERENCIAS

- Aguilar R, Gil L, Gray JA, Driscoll P, Flint J, Dawson GR, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A (2003) Fearfulness and sex in F2 Roman rats: males display more fear though both sexes share the same fearfulness traits. *Physiol Behav* 78:723-732
- Ahmed SH, Koob GF (1998) Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* 282:298-300
- Ahmed SH, Koob GF (1999) Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 146:303-312
- Almli LM, Burghardt GM (2006) Environmental enrichment alters the behavioral profile of ratsnakes (Elaphe). *J Appl Anim Welf Sci* 9:85-109
- Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W (2003) Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *Neuroimage* 18:880-894
- American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and statistical manual of mental disorders Washington, DC, 4th Edition
- Andersen SL, Teicher MH (2000) Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* 24:137-141
- Anthony JC, Warner LA, Kessler RC (1994) Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Facis findings from the National Comorbidity Survey. *Exp Clin Psychopharm* 2:244-268
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160:1-12
- Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H (2004) Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* 15:1751-1754
- Arnold LM (2003) Gender differences in bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am* 26:595-620
- Arnsten AF, Goldman-Rakic PS (1998) Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch Gen Psychiatry* 55:362-368
- Artola A, von Frijtag JC, Fermont PC, Gispen WH, Schrama LH, Kamal A, Spruijt BM (2006) Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 23:261-272
- Austin MP, Leader LR, Reilly N (2005) Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Hum Dev* 81:917-926
- Baenninger LP (1967) Comparison of behavioural development in socially isolated and grouped rats. *Anim Behav* 15:312-323
- Bakshi VP, Geyer MA (1999) Ontogeny of isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating in rats. *Physiol Behav* 67:385-392
- Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M (2006) Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res* 169:231-238
- Bardo MT, Bowling SL, Rowlett JK, Manderscheid P, Buxton ST, Dwoskin LP (1995) Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 51:397-405

- Bardo MT, Hammer RP, Jr. (1991) Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in rat nucleus accumbens: resistance to differential rearing conditions. *Neuroscience* 45:281-290
- Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C (2001) Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155:278-284
- Bardo MT, Robinet PM, Hammer RF, Jr. (1997) Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. *Neuropharmacology* 36:251-259
- Bardo MT, Valone JM, Bevins RA (1999) Locomotion and conditioned place preference produced by acute intravenous amphetamine: role of dopamine receptors and individual differences in amphetamine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 143:39-46
- Barnes LL, Wilson RS, Bienias JL, Schneider JA, Evans DA, Bennett DA (2005) Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Arch Gen Psychiatry* 62:685-691
- Barnett JH, Salmond CH, Jones PB, Sahakian BJ (2006) Cognitive reserve in neuropsychiatry. *Psychol Med* 36:1053-1064
- Baron-Cohen S, Knickmeyer RC, Belmonte MK (2005) Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science* 310:819-823
- Baron-Cohen S, O'Riordan M, Stone V, Jones R, Plaisted K (1999) Recognition of faux pas by normally developing children and children with Asperger syndrome or high-functioning autism. *J Autism Dev Disord* 29:407-418
- Bartoletti A, Medini P, Berardi N, Maffei L (2004) Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat Neurosci* 7:215-216
- Bazzett TJ, Becker JB (1994) Sex differences in the rapid and acute effects of estrogen on striatal D2 dopamine receptor binding. *Brain Res* 637:163-172
- Beatty WW (1979) Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: organizational and activational influences. *Horm Behav* 12:112-163
- Beaulieu C, Colonnier M (1989a) Effects of the richness of the environment on six different cortical areas of the cat cerebral cortex. *Brain Res* 495:382-386
- Beaulieu C, Colonnier M (1989b) Number and size of neurons and synapses in the motor cortex of cats raised in different environmental complexities. *J Comp Neurol* 289:178-181
- Becker A, Grecksch G (2000) Social memory is impaired in neonatally ibotenic acid lesioned rats. *Behav Brain Res* 109:137-140
- Becker JB (1999) Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 64:803-812
- Becker JB, Ramirez VD (1981) Experimental studies on the development of sex differences in the release of dopamine from striatal tissue fragments in vitro. *Neuroendocrinology* 32:168-173
- Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME (2003) Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 76:481-486
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20:1341-1347
- Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) Chemical and anatomical plasticity of brain. *Science* 146:610-619

- Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC (1970) Time courses of effects of differential experience on brain measures and behavior of rats. BYRNE, WL (ED.) *Molecular approaches to learning and memory*, New York, Academic Press, pp.55-89
- Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM (2006) Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem* 85:139-152
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-378
- Berger-Sweeney J, Arnold A, Gabeau D, Mills J (1995) Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. *Behav Neurosci* 109:859-873
- Berman RF, Hannigan JH, Sperry MA, Zajac CS (1996) Prenatal alcohol exposure and the effects of environmental enrichment on hippocampal dendritic spine density. *Alcohol* 13:209-216
- Bielsky IF, Young LJ (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25:1565-1574
- Biver F, Lotstra F, Monclus M, Wikler D, Damhaut P, Mendlewicz J, Goldman S (1996) Sex difference in 5HT₂ receptor in the living human brain. *Neurosci Lett* 204:25-28
- Bixo M, Backstrom T, Winblad B, Andersson A (1995) Estradiol and testosterone in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55:297-303
- Black JE, Sirevaag AM, Wallace CS, Savin MH, Greenough WT (1989) Effects of complex experience on somatic growth and organ development in rats. *Dev Psychobiol* 22:727-752
- Blanchard BA, Glick SD (1995) Sex differences in mesolimbic dopamine responses to ethanol and relationship to ethanol intake in rats. *Recent Dev Alcohol* 12:231-241
- Blumenthal TD, Gescheider GA (1987) Modification of the acoustic startle reflex by a tactile prepulse: the effects of stimulus onset asynchrony and prepulse intensity. *Psychophysiology* 24:320-327
- Bluthe RM, Dantzer R (1990) Social recognition does not involve vasopressinergic neurotransmission in female rats. *Brain Res* 535:301-304
- Boehm GW, Sherman GF, Hoplight BJ, 2nd, Hyde LA, Waters NS, Bradway DM, Galaburda AM, Denenberg VH (1996) Learning and memory in the autoimmune BXSB mouse: effects of neocortical ectopias and environmental enrichment. *Brain Res* 726:11-22
- Boivin MJ, Giordani B, Ndanga K, Maky MM, Manzeki KM, Ngunu N (1996) Economic advantage and the cognitive ability of rural children in Zaire. *J Psychol* 130:95-107
- Borrell J, Vela JM, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C (2002) Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 26:204-215
- Bowling SL, Bardo MT (1994) Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:459-464
- Bowling SL, Rowlett JK, Bardo MT (1993) The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology* 32:885-893
- Boyle AE, Gill K, Smith BR, Amit Z (1991) Differential effects of an early housing manipulation on cocaine-induced activity and self-administration in laboratory rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:269-274

- Brady KT, Randall CL (1999) Gender differences in substance use disorders. *Psychiatr Clin North Am* 22:241-252
- Braff DL, Swerdlow NR, Geyer MA (1999) Symptom correlates of prepulse inhibition deficits in male schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 156:596-602
- Bredy TW, Zhang TY, Grant RJ, Diorio J, Meaney MJ (2004) Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci* 20:1355-1362
- Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J (2006) Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res* 169:57-65
- Briones TL, Suh E, Jozsa L, Woods J (2006) Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning. *Exp Neurol* 198:530-538
- Brown KJ, Grunberg NE (1995) Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. *Physiol Behav* 58:1085-1089
- Brown RT (1968) Early experience and problem-solving ability. *J Comp Physiol Psychol* 65:433-440
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513-521
- Burman OH, Mendl M (2000) Short-term social memory in the laboratory rat: its susceptibility to disturbance. *Appl Anim Behav Sci* 67:241-254
- Cadenhead KS, Swerdlow NR, Shafer KM, Diaz M, Braff DL (2000) Modulation of the startle response and startle laterality in relatives of schizophrenic patients and in subjects with schizotypal personality disorder: evidence of inhibitory deficits. *Am J Psychiatry* 157:1660-1668
- Cahill L (2003) Sex- and hemisphere-related influences on the neurobiology of emotionally influenced memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1235-1241
- Cahill L (2006) Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 7:477-484
- Caine SB, Bowen CA, Yu G, Zuzga D, Negus SS, Mello NK (2004) Effect of gonadectomy and gonadal hormone replacement on cocaine self-administration in female and male rats. *Neuropsychopharmacology* 29:929-942
- Caine SB, Geyer MA, Swerdlow NR (1991) Carbachol infusion into the dentate gyrus disrupts sensorimotor gating of startle in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 105:347-354
- Campbell UC, Morgan AD, Carroll ME (2002) Sex differences in the effects of baclofen on the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Drug Alcohol Depend* 66:61-69
- Carroll ME, Batulis DK, Landry KL, Morgan AD (2005) Sex differences in the escalation of oral phencyclidine (PCP) self-administration under FR and PR schedules in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 180:414-426
- Carroll ME, Campbell UC, Heideman P (2001) Ketoconazole suppresses food restriction-induced increases in heroin self-administration in rats: sex differences. *Exp Clin Psychopharmacol* 9:307-316
- Carroll ME, Lynch WJ, Roth ME, Morgan AD, Cosgrove KP (2004) Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 25:273-279

- Carroll ME, Roth ME, Voeller RK, Nguyen PD (2000) Acquisition of oral phencyclidine self-administration in rhesus monkeys: effect of sex. *Psychopharmacology (Berl)* 149:401-408
- Carruth LL, Reisert I, Arnold AP (2002) Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. *Nat Neurosci* 5:933-934
- Carter RJ, Hunt MJ, Morton AJ (2000) Environmental stimulation increases survival in mice transgenic for exon 1 of the Huntington's disease gene. *Mov Disord* 15:925-937
- Castner SA, Xiao L, Becker JB (1993) Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies. *Brain Res* 610:127-134
- Caston J, Devulder B, Jouen F, Lalonde R, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1999) Role of an enriched environment on the restoration of behavioral deficits in Lurcher mutant mice. *Dev Psychobiol* 35:291-303
- Cicero TJ, Aylward SC, Meyer ER (2003) Gender differences in the intravenous self-administration of mu opiate agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 74:541-549
- Comery TA, Shah R, Greenough WT (1995) Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 63:217-219
- Cook EH, Jr., Leventhal BL, Freedman DX (1988) Serotonin and measured intelligence. *J Autism Dev Disord* 18:553-559
- Cosgrove KP, Carroll ME (2003) Effects of a non-drug reinforcer, saccharin, on oral self-administration of phencyclidine in male and female rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 170:9-16
- Cosgrove KP, Hunter RG, Carroll ME (2002) Wheel-running attenuates intravenous cocaine self-administration in rats: sex differences. *Pharmacol Biochem Behav* 73:663-671
- Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H (2006) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging*
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473
- Crutchfield FL, Dratman MB (1980) Growth and development of the neonatal rat: particular vulnerability of males to disadvantageous conditions during rearing. *Biol Neonate* 38:203-209
- Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsaki G (1999) Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci* 11:344-352
- Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J (2002) Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol* 41:373-387
- Chen X, Li Y, Kline AE, Dixon CE, Zafonte RD, Wagner AK (2005) Gender and environmental effects on regional brain-derived neurotrophic factor expression after experimental traumatic brain injury. *Neuroscience* 135:11-17
- Daenen EW, Wolterink G, Van Der Heyden JA, Kruse CG, Van Ree JM (2003) Neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus disrupt prepulse inhibition of the acoustic startle response; implications for an animal model of neurodevelopmental disorders like schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 13:187-197

- Dahlqvist P, Zhao L, Johansson IM, Mattsson B, Johansson BB, Seckl JR, Olsson T (1999) Environmental enrichment alters nerve growth factor-induced gene A and glucocorticoid receptor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience* 93:527-535
- Dal Forno G, Palermo MT, Donohue JE, Karagiozis H, Zonderman AB, Kawas CH (2005) Depressive symptoms, sex, and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 57:381-387
- Dalrymple-Alford J, Kelche C, Eclancher F, Will B (1988) Preoperative enrichment and behavioral recovery in rats with septal lesions. *Behav Neural Biol* 49:361-373
- Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z (2005) Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? *Neuroscience* 135:703-714
- Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF, Le Moal M (1987) Modulation of social memory in male rats by neurohypophysial peptides. *Psychopharmacology (Berl)* 91:363-368
- Das A, Chaudhuri SK (1995) Effects of sex steroids on the concentrations of some brain neurotransmitters in male and female rats: some new observations. *Indian J Physiol Pharmacol* 39:223-230
- Das G, Broadhurst PL (1959) The effect of inherited differences in emotional reactivity on a measure of intelligence in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 52:300-303
- Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, de Blas M, Garcia-Verdugo JM, Mora F (2007a) Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm* 114:43-48
- Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F (2007b) Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 176:267-273
- Denenberg VH, Woodcock JM, Rosenberg KM (1968) Long-term effects of preweaning and postweaning free-environment experience on rats' problem-solving behavior. *J Comp Physiol Psychol* 66:533-535
- Dewing P, Shi T, Horvath S, Vilain E (2003) Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 118:82-90
- Diamond MC (1988) *Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain*, Vol. New York: The Free Press
- Diamond MC (2001) Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc* 73:211-220
- Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of comparative neurology* 128:117-126
- Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL (1966) Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J Comp Neurol* 128:117-126
- Dinwiddie SH, Reich T, Cloninger CR (1992) Prediction of intravenous drug use. *Compr Psychiatry* 33:173-179
- Dirks A, Groenink L, Schipholt MI, van der Gugten J, Hijzen TH, Geyer MA, Olivier B (2002) Reduced startle reactivity and plasticity in transgenic mice overexpressing corticotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry* 51:583-590
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Landgraf R (1998a) The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides* 19:999-1005

- Dluzen DE, Muraoka S, Landgraf R (1998b) Olfactory bulb norepinephrine depletion abolishes vasopressin and oxytocin preservation of social recognition responses in rats. *Neurosci Lett* 254:161-164
- Domjan M, Schorr R, Best M (1977) Early environmental influences on conditioned and unconditioned ingestional and locomotor behavior. *Dev Psychobiol* 10:499-506
- Donny EC, Caggiula AR, Rowell PP, Gharib MA, Maldovan V, Booth S, Mielke MM, Hoffman A, McCallum S (2000) Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* 151:392-405
- Drevets WC (2003) Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci* 985:420-444
- Duff SJ, Hampson E (2001) A sex difference on a novel spatial working memory task in humans. *Brain Cogn* 47:470-493
- Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV (2001) Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 8:26-34
- Ellenbroek BA (2004) Pre-attentive processing and schizophrenia: animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* 174:65-74
- Ellenbroek BA, Cools AR (2002) Early maternal deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 73:177-184
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR (1998) The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 30:251-260
- Elliott BM, Grunberg NE (2005) Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 165:187-196
- Engelmann M, Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R (1998) Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. *Behav Brain Res* 90:89-94
- Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R (1995) Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58:315-321
- Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H (1988) Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* 1:983-996
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobena A, Driscoll P (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 67:19-26
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M (1995a) Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Learn Mem* 64:49-57
- Escorihuela RM, Tobena A, Fernandez-Teruel A (1994a) Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res* 61:169-173
- Escorihuela RM, Tobena A, Fernandez-Teruel A (1995b) Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learn Mem* 2:40-48

- Escorihuela RM, Tobena A, Fernández-Teruel A (1994b) L'estimulació infantil. Efectes de l'ambient primerenc i l'herència sobre l'emotivitat i l'aprenentatge. Servei de Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489
- Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138:153-156
- Faraday MM (2002) Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol Behav* 75:507-522
- Faraday MM, O'Donoghue VA, Grunberg NE (1999) Effects of nicotine and stress on startle amplitude and sensory gating depend on rat strain and sex. *Pharmacol Biochem Behav* 62:273-284
- Faverjon S, Silveira DC, Fu DD, Cha BH, Akman C, Hu Y, Holmes GL (2002) Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. *Neurology* 59:1356-1364
- Ferchmin PA, Eterovic VA, Caputto R (1970) Studies of the brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. *Brain Res* 20:49-57
- Ferguson JN, Young LJ, Insel TR (2002) The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol* 23:200-224
- Fernandez-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobena A, Escorihuela RM (2002a) Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 73:225-231
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobena A (1991) Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res* 24:273-282
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B, Tobena A (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 27:513-526
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Nunez JF, Goma M, Driscoll P, Tobena A (1992) Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 137:185-188
- Fernandez-Teruel A, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobena A (2002b) Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 73:233-245
- Fiala B, Snow FM, Greenough WT (1977) "Impoverished" rats weigh more than "enriched" rats because they eat more. *Dev Psychobiol* 10:537-541
- Finamore TL, Port RL (2000) Developmental stress disrupts habituation but spares prepulse inhibition in young rats. *Physiol Behav* 69:527-530
- Fleisher A, Grundman M, Jack CR, Jr., Petersen RC, Taylor C, Kim HT, Schiller DH, Bagwell V, Sencakova D, Weiner MF, DeCarli C, DeKosky ST, van Dyck CH, Thal LJ (2005) Sex, apolipoprotein E epsilon 4 status, and hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 62:953-957
- Floeter MK, Greenough WT (1979) Cerebellar plasticity: Modifications of Purkinje cell structure by differential rearing in monkeys. *Science* 206:227-229

- Forgays DG, Forgays JW (1952) The nature of the effect of free-environmental experience in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 45:322-328
- Forgays DG, Reid JM (1962) Crucial periods for free-environmental experience in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 55:816-818
- Forgie ML, Stewart J (1993) Sex differences in amphetamine-induced locomotor activity in adult rats: role of testosterone exposure in the neonatal period. *Pharmacol Biochem Behav* 46:637-645
- Fowler SC, Johnson JS, Kallman MJ, Liou JR, Wilson MC, Hikal AH (1993) In a drug discrimination procedure isolation-reared rats generalize to lower doses of cocaine and amphetamine than rats reared in an enriched environment. *Psychopharmacology (Berl)* 110:115-118
- Fox C, Merali Z, Harrison C (2006) Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175:1-8
- Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22:7840-7843
- Freeman BJ, Ray OS (1972) Strain, sex, and environment effects on appetitively and aversively motivated learning tasks. *Dev Psychobiol* 5:101-109
- Frick KM, Fernandez SM (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24:615-626
- Friske JE, Gammie SC (2005) Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav* 85:187-194
- Galani R, Jarrard LE, Will BE, Kelche C (1997) Effects of postoperative housing conditions on functional recovery in rats with lesions of the hippocampus, subiculum, or entorhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 67:43-56
- Galler JR, Manes M (1980) Gender differences in visual discrimination by rats in response to malnutrition of varying durations. *Dev Psychobiol* 13:409-416
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A (2000) Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72:114-125
- Gaulke LJ, Horner PJ, Fink AJ, McNamara CL, Hicks RR (2005) Environmental enrichment increases progenitor cell survival in the dentate gyrus following lateral fluid percussion injury. *Brain Res Mol Brain Res* 141:138-150
- Gehrke BJ, Cass WA, Bardo MT (2006) Monoamine-depleting doses of methamphetamine in enriched and isolated rats: consequences for subsequent methamphetamine-induced hyperactivity and reward. *Behav Pharmacol* 17:499-508
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156:117-154
- Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 34:361-372
- Giedd JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D, Vauss YC, Rapoport JL (1996) Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: ages 4-18 years. *J Comp Neurol* 366:223-230
- Gobbo OL, O'Mara SM (2004) Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res* 152:231-241

- Goldstein JM, Seidman LJ, Horton NJ, Makris N, Kennedy DN, Caviness VS, Jr., Faraone SV, Tsuang MT (2001) Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex* 11:490-497
- Gonzalez-Lima F, Ferchmin PA, Eterovic VA, Gonzalez-Lima EM (1994) Metabolic activation of the brain of young rats after exposure to environmental complexity. *Dev Psychobiol* 27:343-351
- Gray JA (1971) Sex differences in emotional behavior in mammals including man: endocrine bases. *Acta Psychol* 35:29-46
- Green EJ, Greenough WT (1986) Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. *J Neurophysiol* 55:739-750
- Green RE, Melo B, Christensen B, Ngo L, Skene C (2006) Evidence of transient enhancement to cognitive functioning in healthy young adults through environmental enrichment: implications for rehabilitation after brain injury. *Brain Cogn* 60:201-203
- Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT (2002) Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology (Berl)* 162:373-378
- Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM (1973) Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol* 41:371-378
- Guilarte TR, Toscano CD, McGlothlan JL, Weaver SA (2003) Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Ann Neurol* 53:50-56
- Hadaway PF, Alexander BK, Coombs RB, Beyerstein B (1979) The effect of housing and gender on preference for morphine-sucrose solutions in rats. *Psychopharmacology (Berl)*:87-91
- Haemisch A, Gartner K (1997) Effects of cage enrichment on territorial aggression and stress physiology in male laboratory mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:73-76
- Hannigan JH, O'Leary-Moore SK, Berman RF (2007) Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 31:202-211
- Heim C, Nemeroff CB (1999) The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry* 46:1509-1522
- Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49:1023-1039
- Hellems KG, Bengel LC, Olmstead MC (2004) Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res Dev Brain Res* 150:103-115
- Heppner CC, Kemble ED, Cox WM (1986) Effects of food deprivation on caffeine consumption in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1555-1559
- Hicks RR, Zhang L, Atkinson A, Stevenon M, Veneracion M, Seroogy KB (2002) Environmental enrichment attenuates cognitive deficits, but does not alter neurotrophin gene expression in the hippocampus following lateral fluid percussion brain injury. *Neuroscience* 112:631-637
- Hill SY, Powell BJ (1976) Cocaine and morphine self-administration: effects of differential rearing. *Pharmacol Biochem Behav* 5:701-704
- Hockly E, Cordery PM, Woodman B, Mahal A, van Dellen A, Blakemore C, Lewis CM, Hannan AJ, Bates GP (2002) Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol* 51:235-242

- Hoplight BJ, Sherman GF, Hyde LA, Denenberg VH (2001) Effects of neocortical ectopias and environmental enrichment on Hebb-Williams maze learning in BXSB mice. *Neurobiol Learn Mem* 76:33-45
- Horacek HJ, Ramey CT, Campbell FA, Hoffmann KP, Fletcher RH (1987) Predicting school failure and assessing early intervention with high-risk children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 26:758-763
- Hrdina P (2000) Sex-related differences: do they matter? *J Psychiatry Neurosci* 25:319-320
- Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 164:45-52
- Irwin KC (1989) The school achievement of children with Down's syndrome. *N Z Med J* 102:11-13
- Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT (1992) Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:110-119
- Jackson LR, Robinson TE, Becker JB (2006) Sex differences and hormonal influences on acquisition of cocaine self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31:129-138
- Jacobs B, Schall M, Scheibel AB (1993) A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. II. Gender, hemispheric, and environmental factors. *J Comp Neurol* 327:97-111
- Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV (2005) Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:5217-5224
- Johansson BB, Ohlsson AL (1996) Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol* 139:322-327
- Johnston AL, File SE (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav* 49:245-250
- Jones AP, Friedman MI (1982) Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy. *Science* 215:1518-1519
- Jones GH, Hernandez TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 43:17-35
- Jones GH, Marsden CA, Robbins TW (1990) Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms of the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 102:364-372
- Joseph R (1999) Environmental influences on neural plasticity, the limbic system, emotional development and attachment: a review. *Child Psychiatry Hum Dev* 29:189-208
- Juarez J, Guzman-Flores C, Ervin FR, Palmour RM (1993) Voluntary alcohol consumption in vervet monkeys: individual, sex, and age differences. *Pharmacol Biochem Behav* 46:985-988

- Juraska JM (1984) Sex differences in developmental plasticity in the visual cortex and hippocampal dentate gyrus. *Prog Brain Res* 61:205-214
- Juraska JM, Henderson C, Muller J (1984) Differential rearing experience, gender, and radial maze performance. *Dev Psychobiol* 17:209-215
- Juraska JM, Meyer M (1986) Behavioral interactions of postweaning male and female rats with a complex environment. *Dev Psychobiol* 19:493-500
- Kaler SR, Freeman BJ (1994) Analysis of environmental deprivation: cognitive and social development in Romanian orphans. *J Child Psychol Psychiatry* 35:769-781
- Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG (2002) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:131-140
- Kalivas PW (2005) How do we determine which drug-induced neuroplastic changes are important? *Nat Neurosci* 8:1440-1441
- Karreman M, Moghaddam B (1996) The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem* 66:589-598
- Kelche C, Roeser C, Jeltsch H, Cassel JC, Will B (1995) The effects of intrahippocampal grafts, training, and postoperative housing on behavioral recovery after septohippocampal damage in the rat. *Neurobiology of learning and memory* 63:155-156
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52:135-143
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10409-10414
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495
- Kendler KS, Bulik CM, Silberg J, Hettema JM, Myers J, Prescott CA (2000) Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cotwin control analysis. *Arch Gen Psychiatry* 57:953-959
- Kessel AL, Brent L (1998) Cage toys reduce abnormal behavior in individually housed pigtail macaques. *J Appl Anim Welf Sci* 1:227-234
- Kihlslinger RL, Nevitt GA (2006) Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *J Exp Biol* 209:504-509
- Kilpatrick LA, Zald DH, Pardo JV, Cahill LF (2006) Sex-related differences in amygdala functional connectivity during resting conditions. *Neuroimage* 30:452-461
- Klein LC, Corwin EJ (2002) Seeing the unexpected: how sex differences in stress responses may provide a new perspective on the manifestation of psychiatric disorders. *Curr Psychiatry Rep* 4:441-448
- Klein LC, Popke EJ, Grunberg NE (1997) Sex differences in effects of predictable and unpredictable footshock on fentanyl self-administration in rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 5:99-106
- Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE (1994) Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav* 56:291-297
- Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (2002) Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J Neurosci Res* 70:340-346
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107-128

- Koeltzow TE, Vezina P (2005) Locomotor activity and cocaine-seeking behavior during acquisition and reinstatement of operant self-administration behavior in rats. *Behav Brain Res* 160:250-259
- Kofler M, Muller J, Reggiani L, Valls-Sole J (2001) Influence of gender on auditory startle responses. *Brain Res* 921:206-210
- Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S (1998) Age, experience and the changing brain. *Neurosci Biobehav Rev* 22:143-159
- Kolb B, Gibb R, Gorny G (2003) Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiol Learn Mem* 79:1-10
- Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS (2005a) Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 36:1278-1282
- Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB (2006) Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol* 199:113-121
- Koob G (2000) Drug addiction. *Neurobiol Dis* 7:543-545
- Koob GF, Heinrichs SC, Pich EM, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, Britton KT (1993) The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp* 172:277-289; discussion 290-275
- Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* 278:52-58
- Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, Gelenberg AJ, Davis SM, Harrison WM, Keller MB (2000) Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry* 157:1445-1452
- Krebs-Thomson K, Giracello D, Solis A, Geyer MA (2001) Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats. *Behav Brain Res* 120:221-224
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL (1962) Relations between brain chemistry and problem-solving among rats raised in enriched and impoverished environments. *Journal of comparative and Physiological Psychology* 55:801-807
- Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* 8:1450-1457
- Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM (2005) Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 83:206-216
- Lancaster FE, Spiegel KS (1992) Sex differences in pattern of drinking. *Alcohol* 9:415-420
- Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN (1990) Emotion, attention, and the startle reflex. *Psychol Rev* 97:377-395
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH (2002) Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:193-207
- Lawson J, Baron-Cohen S, Wheelwright S (2004) Empathising and systemising in adults with and without Asperger Syndrome. *J Autism Dev Disord* 34:301-310
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701-713

- Lazic SE, Grote HE, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A, Phillips W, Barker RA (2006) Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 23:1829-1838
- Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J (1999a) The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64:705-715
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (1999b) Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res* 104:113-117
- Lehmann J, Pryce CR, Feldon J (2000) Lack of effect of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 41:365-371
- Levine S (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126:405
- Lex BW (1991) Some gender differences in alcohol and polysubstance users. *Health Psychol* 10:121-132
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94:301-310
- Lovic V, Fleming AS (2004) Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task--reversal of effects with maternal-like licking stimulation. *Behav Brain Res* 148:209-219
- Lowry CA, Moore FL (2006) Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. *Gen Comp Endocrinol* 146:19-27
- Ludewig K, Ludewig S, Seitz A, Obrist M, Geyer MA, Vollenweider FX (2003) The acoustic startle reflex and its modulation: effects of age and gender in humans. *Biol Psychol* 63:311-323
- Lynch WJ, Carroll ME (1999) Sex differences in the acquisition of intravenously self-administered cocaine and heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 144:77-82
- Lynch WJ, Carroll ME (2000) Reinstatement of cocaine self-administration in rats: sex differences. *Psychopharmacology (Berl)* 148:196-200
- Lynch WJ, Roth ME, Carroll ME (2002) Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 164:121-137
- Lynch WJ, Roth ME, Mickelberg JL, Carroll ME (2001) Role of estrogen in the acquisition of intravenously self-administered cocaine in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 68:641-646
- Lynch WJ, Taylor JR (2004) Sex differences in the behavioral effects of 24-h/day access to cocaine under a discrete trial procedure. *Neuropsychopharmacology* 29:943-951
- Madeira MD, Lieberman AR (1995) Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 45:275-333
- Maegele M, Lippert-Gruener M, Ester-Bode T, Garbe J, Bouillon B, Neugebauer E, Klug N, Lefering R, Neiss WF, Angelov DN (2005) Multimodal early onset stimulation combined with enriched environment is associated with reduced CNS lesion volume and enhanced reversal of neuromotor dysfunction after traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurosci* 21:2406-2418
- Marquez C, Nadal R, Armario A (2005) Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30:179-187
- Martin M, Iyadurai SJ, Gassman A, Gindhart JG, Jr., Hays TS, Saxton WM (1999) Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 10:3717-3728

- Martinez-Cue C (2001) Estudio de los patrones cognitivo y conductual de los modelos murinos de síndrome de Down Ts65Dn, Dyrk1A+/- y TgDSCR1. Efectos del Enriquecimiento Ambiental. Universidad de Cantabria
- Martinez-Cue C, Baamonde C, Lumbreras M, Paz J, Davisson MT, Schmidt C, Dierssen M, Florez J (2002) Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 134:185-200
- McClure EB (2000) A meta-analytic review of sex differences in facial expression processing and their development in infants, children, and adolescents. *Psychol Bull* 126:424-453
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (1995) Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 84:55-61
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172-189
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1-28
- McGuire J, Earls F (1991) Prevention of psychiatric disorders in early childhood. *J Child Psychol Psychiatry* 32:129-153
- Melendez RI, Gregory ML, Bardo MT, Kalivas PW (2004) Impoverished rearing environment alters metabotropic glutamate receptor expression and function in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29:1980-1987
- Mennes M, Stiers P, Lagae L, Van den Bergh BRH (2006) Long-term cognitive sequelae of antenatal maternal anxiety: involvement of the orbitofrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30:1078-1086
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9:729-731
- Milgram NW, Head E, Zicker SC, Ikeda-Douglas CJ, Murphey H, Muggenburg B, Siwak C, Tapp D, Cotman CW (2005) Learning ability in aged beagle dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: a two-year longitudinal study. *Neurobiol Aging* 26:77-90
- Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR (1993) Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* 57:183-191
- Mohammed AK, Winblad B, Ebendal T, Larkfors L (1990) Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res* 528:62-72
- Mollgaard K, Diamond MC, Bennett EL, Rosenzweig MR, Lindner B (1971) Quantitative synaptic changes with differential experience in rat brain. *Int J Neurosci* 2:113-127
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D (2004) Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423-431
- Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G (2003) Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 18:3367-3374
- Myhrer T, Utsikt L, Fjelland J, Iversen EG, Fonnum F (1992) Differential rearing conditions in rats: effects on neurochemistry in neocortical areas and cognitive behaviors. *Brain Res Bull* 28:427-434

- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23:569-582
- Naka F, Narita N, Okado N, Narita M (2005) Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* 27:275-278
- Naliboff BD, Berman S, Chang L, Derbyshire SW, Suyenobu B, Vogt BA, Mandelkern M, Mayer EA (2003) Sex-related differences in IBS patients: central processing of visceral stimuli. *Gastroenterology* 124:1738-1747
- Nemeroff CB, Bremner JD, Foa EB, Mayberg HS, North CS, Stein MB (2006) Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. *J Psychiatr Res* 40:1-21
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697-709
- Nunes Mamede Rosa ML, Nobre MJ, Ribeiro Oliveira A, Brandao ML (2005) Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. *Neuropsychobiology* 51:248-255
- Oakley-Browne MA, Joyce PR, Wells JE, Bushnell JA, Hornblow AR (1995) Adverse parenting and other childhood experience as risk factors for depression in women aged 18-44 years. *J Affect Disord* 34:13-23
- OEDT (2006) Informe anual 2006: el problema de la drogodependencia en Europa, Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT), Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas
- Ogilvie KM, Rivier C (1997) Gender difference in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to alcohol in the rat: activational role of gonadal steroids. *Brain Res* 766:19-28
- Olazaran J, Muniz R, Reisberg B, Pena-Casanova J, del Ser T, Cruz-Jentoft AJ, Serrano P, Navarro E, Garcia de la Rocha ML, Frank A, Galiano M, Fernandez-Bullido Y, Serra JA, Gonzalez-Salvador MT, Sevilla C (2004) Benefits of cognitive-motor intervention in MCI and mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 63:2348-2353
- Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR (1994) Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 23:349-353
- Onslow M, Costa L, Rue S (1990) Direct early intervention with stuttering: some preliminary data. *J Speech Hear Disord* 55:405-416
- Ornitz EM, Guthrie D, Sadeghpour M, Sugiyama T (1991) Maturation of prestimulation-induced startle modulation in girls. *Psychophysiology* 28:11-20
- Paban V, Jaffard M, Chambon C, Malafosse M, Alescio-Lautier B (2005) Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention. *Neuroscience* 132:13-32
- Pacteau C, Einon D, Sinden J (1989) Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav Brain Res* 34:79-96
- Pakarinen ED, Williams KL, Woods JH (1999) Food restriction and sex differences on concurrent, oral ethanol and water reinforcers in juvenile rhesus monkeys. *Alcohol* 17:35-40
- Palmer FB, Shapiro BK, Allen MC, Mosher BS, Bilker SA, Harryman SE, Meinert CL, Capute AJ (1990) Infant stimulation curriculum for infants with cerebral palsy: effects on infant temperament, parent-infant interaction, and home environment. *Pediatrics* 85:411-415

- Park GA, Pappas BA, Murtha SM, Ally A (1992) Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neurosci Lett* 143:259-262
- Pascual R, Figueroa H (1996) Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. *Biol Neonate* 69:399-404
- Passineau MJ, Green EJ, Dietrich WD (2001) Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 168:373-384
- Pellow S, File S (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 24:525-529
- Penka LL, Bond TL, Heinrichs SC (2004) Non-specific effect of fear conditioning and specific effect of social defeat on social recognition memory performance in female rats. *Stress* 7:63-72
- Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87:101-108
- Perrot-Sinal TS, Kostenuik MA, Ossenkopp KP, Kavaliers M (1996) Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. *Behav Neurosci* 110:1309-1320
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH (1999) Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94:279-286
- Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH (2002) Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:167-175
- Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Robbins TW, Everitt BJ (1994) Isolation rearing impairs the reinforcing efficacy of intravenous cocaine or intra-accumbens d-amphetamine: impaired response to intra-accumbens D1 and D2/D3 dopamine receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 115:419-429
- Pietro Paolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E (2004) Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. *Physiol Behav* 81:443-453
- Powell SB, Newman HA, McDonald TA, Bugenhagen P, Lewis MH (2000) Development of spontaneous stereotyped behavior in deer mice: effects of early and late exposure to a more complex environment. *Dev Psychobiol* 37:100-108
- Powell SB, Swerdlow NR, Pitcher LK, Geyer MA (2002) Isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition and locomotor habituation are not potentiated by water deprivation. *Physiol Behav* 77:55-64
- Prediger RD, Takahashi RN (2003) Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 462:115-123
- Puurunen K, Sirvio J, Koistinaho J, Miettinen R, Haapalinna A, Riekkinen P, Sr., Sivenius J (1997) Studies on the influence of enriched-environment housing combined with systemic administration of an alpha2-adrenergic antagonist on spatial learning and hyperactivity after global ischemia in rats. *Stroke* 28:623-631
- Rabinovitch MS, Rosvold HE (1951) A closed-field intelligence test for rats. *Can J Psychol* 5:122-128

- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38:17-23
- Raine A, Mellingen K, Liu J, Venables P, Mednick SA (2003) Effects of environmental enrichment at ages 3-5 years on schizotypal personality and antisocial behavior at ages 17 and 23 years. *Am J Psychiatry* 160:1627-1635
- Raine A, Venables PH, Dalais C, Mellingen K, Reynolds C, Mednick SA (2001) Early educational and health enrichment at age 3-5 years is associated with increased autonomic and central nervous system arousal and orienting at age 11 years: evidence from the Mauritius Child Health Project. *Psychophysiology* 38:254-266
- Ramey CT, Ramey SL (1998) Prevention of intellectual disabilities: early interventions to improve cognitive development. *Prev Med* 27:224-232
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y (2000a) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12880-12884
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000b) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238-244
- Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 53:285-290
- Reeb BC, Tang AC (2005) Sex difference in temporal patterns of social interaction and its dependence upon neonatal novelty exposure. *Behav Brain Res* 158:359-365
- Reijmers LG, Baars AM, Burbach JP, Spruijt BM, van Ree JM (2001a) Delayed effect of the vasopressin metabolite VP4-8 on the social memory of sexually naive male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 154:408-414
- Reijmers LG, Hoekstra K, Burbach JP, van Ree JM, Spruijt BM (2001b) Long-term impairment of social memory in the rat after social defeat is not restored by desglycinamide-vasopressin. *Neurosci Lett* 305:145-148
- Renner MJ, Rosenzweig MR (1986a) Object interaction in juvenile rats (*Rattus norvegicus*): effects of different experiential histories. *Journal of comparative and Physiological Psychology* 100:229-236
- Renner MJ, Rosenzweig MR (1986b) Social interactions among rats housed in grouped and enriched conditions. *Dev Psychobiol* 19:303-313
- Renner MJ, Rosenzweig MR (1987) Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior, Vol. New York: Springer-Verlag
- Rhodes ME, Balestreire EM, Kenneth Czambel R, Rubin RT (2002) Estrous cycle influences on sexual diergism of HPA axis responses to cholinergic stimulation in rats. *Brain Res Bull* 59:217-225
- Rhodes ME, Rubin RT (1999) Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review. *Brain Res Brain Res Rev* 30:135-152
- Riege WH, Morimoto H (1970) Effects of chronic stress and differential environments upon brain weights and biogenic amine levels in rats. *J Comp Physiol Psychol* 71:396-404
- Rinck C (1968) The effect of enriched environment and handling on the learning of a visual discrimination task. *Psychon Sci* 12:317-318

- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117
- Rockman GE, Borowski TB, Glavin GB (1986) The effects of environmental enrichment on voluntary ethanol consumption and stress ulcer formation in rats. *Alcohol* 3:299-302
- Rockman GE, Hall AM, Markert LE, Glavin GB (1988) Influence of rearing conditions on voluntary ethanol intake and response to stress in rats. *Behav Neural Biol* 49:184-191
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801-810
- Rodríguez M, Sánchez JL (2004) Reserva cognitiva y demencia. *Anales de Psicología* 20:175-186
- Ronnback A, Dahlqvist P, Svensson PA, Jernas M, Carlsson B, Carlsson LM, Olsson T (2005) Gene expression profiling of the rat hippocampus one month after focal cerebral ischemia followed by enriched environment. *Neurosci Lett* 385:173-178
- Rose FD, Dell PA, Love S (1985) Behavioral consequences of different types of environmental enrichment in the rat. *IRCS Med Sci* 19:143-145
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC (1972) Brain changes in response to experience. *Scientific American* 226:22-29
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J Comp Physiol Psychol* 55:429-437
- Roth ME, Carroll ME (2004) Sex differences in the escalation of intravenous cocaine intake following long- or short-access to cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 78:199-207
- Roth ME, Cosgrove KP, Carroll ME (2004) Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 28:533-546
- Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P (2001) Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* 74:313-320
- Saavedra MA, Abarca N, Arancibia P, Salinas V (1990) Sex differences in aversive and appetitive conditioning in two strains of rats. *Physiol Behav* 47:107-112
- Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res* 39:57-62
- Sandman CA, Wadhwa P, Glynn L, Chicz-Demet A, Porto M, Garite TJ (1999) Corticotrophin-releasing hormone and fetal responses in human pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 897:66-75
- Schenk S, Hunt T, Malovechko R, Robertson A, Klukowski G, Amit Z (1986) Differential effects of isolation housing on the conditioned place preference produced by cocaine and amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1793-1796
- Schenk S, Lacelle G, Gorman K, Amit Z (1987) Cocaine self-administration in rats influenced by environmental conditions: implications for the etiology of drug abuse. *Neurosci Lett* 81:227-231
- Schenk S, Robinson B, Amit Z (1988) Housing conditions fail to affect the intravenous self-administration of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 31:59-62
- Schneider T, Turczak J, Przewlocki R (2006) Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology* 31:36-46

- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Wurbel H (2002) Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209-224
- Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1998) D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J Neurosci* 18:1613-1621
- Segovia G, Yague AG, Garcia-Verdugo JM, Mora F (2006) Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull* 70:8-14
- Servatius RJ, Beck KD, Moldow RL, Salameh G, Tumminello TP, Short KR (2005) A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity. *Biol Psychiatry* 57:865-872
- Seymour P, Dou H, Juraska JM (1996) Sex differences in radial maze performance: influence of rearing environment and room cues. *Psychobiology* 24:33-37
- Shansky RM, Glavis-Bloom C, Lerman D, McRae P, Benson C, Miller K, Cosand L, Horvath TL, Arnsten AF (2004) Estrogen mediates sex differences in stress-induced prefrontal cortex dysfunction. *Mol Psychiatry* 9:531-538
- Shaywitz BA, Shaywitz SE, Pugh KR, Constable RT, Skudlarski P, Fulbright RK, Bronen RA, Fletcher JM, Shankweiler DP, Katz L, et al. (1995) Sex differences in the functional organization of the brain for language. *Nature* 373:607-609
- Shepard RN, Metzler J (1971) Mental rotation of three-dimensional objects. *Science* 171:701-703
- Shors TJ, Chua C, Falduto J (2001) Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *J Neurosci* 21:6292-6297
- Shinoda M, Miyazaki A, Toide K (1999) Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons in rats with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 99:17-25
- Sipes TE, Geyer MA (1997) DOI disrupts prepulse inhibition of startle in rats via 5-HT_{2A} receptors in the ventral pallidum. *Brain Res* 761:97-104
- Sipos ML, Bauman RA, Widholm JJ, Kant GJ (2000) Behavioral effects Of 8-OH-DPAT in chronically stressed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66:403-411
- Sirevaag AM, Greenough WT (1991) Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Res* 540:273-278
- Siwak-Tapp CT, Head E, Muggenburg BA, Milgram NW, Cotman CW (2006) Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. *Neurobiol Aging*
- Skuse DH, Morris JS, Dolan RJ (2005) Functional dissociation of amygdala-modulated arousal and cognitive appraisal, in Turner syndrome. *Brain* 128:2084-2096
- Smith JK, Neill JC, Costall B (1997) Post-weaning housing conditions influence the behavioural effects of cocaine and d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 131:23-33
- Smith MA, Bryant PA, McClean JM (2003) Social and environmental enrichment enhances sensitivity to the effects of kappa opioids: studies on antinociception, diuresis and conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 76:93-101

- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR (2000) Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* 20:6587-6593
- Soffie M, Hahn K, Terao E, Eclancher F (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* 101:37-49
- Spires TL, Hannan AJ (2005) Nature, nurture and neurology: gene-environment interactions in neurodegenerative disease. FEBS Anniversary Prize Lecture delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *Febs J* 272:2347-2361
- Staff RT, Murray AD, Deary IJ, Whalley LJ (2004) What provides cerebral reserve? *Brain* 127:1191-1199
- Stairs DJ, Klein ED, Bardo MT (2006) Effects of environmental enrichment on extinction and reinstatement of amphetamine self-administration and sucrose-maintained responding. *Behav Pharmacol* 17:597-604
- Stanford L, Brown RE (2003) MHC-congenic mice (C57BL/6J and B6-H-2K) show differences in speed but not accuracy in learning the Hebb-Williams Maze. *Behav Brain Res* 144:187-197
- Steenbergen HL, Farabollini F, Heinsbroek RP, Van de Poll NE (1991) Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav Brain Res* 43:159-165
- Steenbergen HL, Heinsbroek RP, Van Hest A, Van de Poll NE (1990) Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav* 48:571-576
- Stern Y, Albert S, Tang MX, Tsai WY (1999) Rate of memory decline in AD is related to education and occupation: cognitive reserve? *Neurology* 53:1942-1947
- Stern Y, Habeck C, Moeller J, Scarmeas N, Anderson KE, Hilton HJ, Flynn J, Sackeim H, van Heertum R (2005) Brain networks associated with cognitive reserve in healthy young and old adults. *Cereb Cortex* 15:394-402
- Stewart J, Woodside B, Shaham Y (1996) Ovarian hormones do not affect the initiation and maintenance of intravenous self-administration of heroin in the female rat. *Psychobiology*: 154-159
- Sullivan EV, Pfefferbaum A, Swan GE, Carmelli D (2001a) Heritability of hippocampal size in elderly twin men: equivalent influence from genes and environment. *Hippocampus* 11:754-762
- Sullivan FR, Bird ED, Alpay M, Cha JH (2001b) Remotivation therapy and Huntington's disease. *J Neurosci Nurs* 33:136-142
- Susser ER, Wallace RB (1982) The effects of environmental complexity on the hippocampal formation of the adult rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 42:203-207
- Swerdlow NR, Auerbach P, Monroe SM, Hartston H, Geyer MA, Braff DL (1993) Men are more inhibited than women by weak prepulses. *Biol Psychiatry* 34:253-260
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (2000) Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11:185-204
- Swerdlow NR, Braff DL, Taaid N, Geyer MA (1994) Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51:139-154
- Swerdlow NR, Geyer MA (1993) Prepulse inhibition of acoustic startle in rats after lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. *Behav Neurosci* 107:104-117

- Swerdlow NR, Geyer MA (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24:285-301
- Swerdlow NR, Sutherland AN (2005) Using animal models to develop therapeutics for Tourette Syndrome. *Pharmacol Ther* 108:281-293
- Tang AC (2001) Neonatal exposure to novel environment enhances hippocampal-dependent memory function during infancy and adulthood. *Learn Mem* 8:257-264
- Tang AC, Reeb BC, Romeo RD, McEwen BS (2003) Modification of social memory, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and brain asymmetry by neonatal novelty exposure. *J Neurosci* 23:8254-8260
- Tees RC (1999) The influences of sex, rearing environment, and neonatal choline dietary supplementation on spatial and nonspatial learning and memory in adult rats. *Dev Psychobiol* 35:328-342
- Thor DH, Holloway WR (1982) Social memory of the male laboratory rat. *Journal of comparative Psychology* 96:1000-1006
- Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 93:83-90
- Tsuang MT, Lyons MJ, Harley RM, Xian H, Eisen S, Goldberg J, True WR, Faraone SV (1999) Genetic and environmental influences on transitions in drug use. *Behav Genet* 29:473-479
- Ueda S, Sakakibara S, Yoshimoto K (2005) Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neuroscience* 135:395-402
- Van't Hooft I, Andersson K, Sejersen T, Bartfai A, von Wendt L (2003) Attention and memory training in children with acquired brain injuries. *Acta Paediatr* 92:935-940
- Van den Bergh BRH, Mennes M, Oosterlaan J, Stevens V, Stiers P, Marcoen A, Lagae L (2005) High antenatal maternal anxiety is related to impulsivity during performance on cognitive tasks in 14- and 15-year-olds. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:259-269
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198
- Van Rijzingen IM, Gispen WH, Spruijt BM (1997) Postoperative environmental enrichment attenuates fimbria-fornix lesion-induced impairments in Morris maze performance. *Neurobiol Learn Mem* 67:21-28
- Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA (2000) Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry* 47:864-873
- Vivian JA, Liang YJ, Higley JD, Linnoila M, Woods JH (1999) Oral self-administration of ethanol, phencyclidine, methadone, pentobarbital and quinine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 147:113-124
- Volkmar FR, Greenough WT (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176:1447-1449
- Wagner AK, Chen X, Kline AE, Li Y, Zafonte RD, Dixon CE (2005) Gender and environmental enrichment impact dopamine transporter expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 195:475-483

- Wagner AK, Kline AE, Sokoloski J, Zafonte RD, Capulong E, Dixon CE (2002) Intervention with environmental enrichment after experimental brain trauma enhances cognitive recovery in male but not female rats. *Neurosci Lett* 334:165-168
- Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Penny JE, Cummins RA (1969) The effects of environmental complexity on the histology of the hippocampus. *Journal of comparative neurology* 137:361-366
- Wall PM, Messier C (2001) Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 25:275-286
- Wallace CS, Kilman VL, Withers GS, Greenough WT (1992) Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days in differential housing in weanling rats. *Behavioral and Neural Biology* 58:64-68
- Wasik BH, Ramey CT, Bryant DM, Sparling JJ (1990) A longitudinal study of two early intervention strategies: Project CARE. *Child Dev* 61:1682-1696
- Weiss IC, Feldon J, Domeney AM (1999) Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. *Behav Pharmacol* 10:139-149
- Welberg L, Thiruvikraman KV, Plotsky PM (2006) Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 31:553-564
- Wesa JM, Chang FL, Greenough WT, West RW (1982) Synaptic contact curvature: effects of differential rearing on rat occipital cortex. *Brain Res* 256:253-257
- Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, Marder K, Penchaszadeh G, Roberts SA, Gayan J, Brocklebank D, Cherny SS, Cardon LR, Gray J, Dlouhy SR, Wiktorski S, Hodes ME, Conneally PM, Penney JB, Gusella J, Cha JH, Irizarry M, Rosas D, Hersch S, Hollingsworth Z, MacDonald M, Young AB, Andresen JM, Housman DE, De Young MM, Bonilla E, Stillings T, Negrette A, Snodgrass SR, Martinez-Jaurrieta MD, Ramos-Arroyo MA, Bickham J, Ramos JS, Marshall F, Shoulson I, Rey GJ, Feigin A, Arnheim N, Acevedo-Cruz A, Acosta L, Alvir J, Fischbeck K, Thompson LM, Young A, Dure L, O'Brien CJ, Paulsen J, Brickman A, Krch D, Peery S, Hogarth P, Higgins DS, Jr., Landwehrmeyer B (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3498-3503
- Whalley LJ, Deary IJ, Appleton CL, Starr JM (2004) Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing Res Rev* 3:369-382
- Whishaw IQ, Mittleman G (1986) Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J Comp Psychol* 100:422-431
- Whishaw IQ, Zaborowski JA, Kolb B (1984) Postsurgical enrichment aids adult hemidecorticate rats on a spatial navigation task. *Behav Neural Biol* 42:183-190
- Widman DR, Rosellini RA (1990) Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol Behav* 47:57-62
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302
- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR (2004) Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol* 72:167-182
- Winocur G (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Neurobiol Aging* 19:589-597

- Winslow JT, Camacho F (1995) Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology (Berl)* 121:164-172
- Wirth M, Horn H, Koenig T, Stein M, Federspiel A, Meier B, Michel CM, Strik W (2006) Sex Differences in Semantic Processing: Event-Related Brain Potentials Distinguish between Lower and Higher Order Semantic Analysis during Word Reading. *Cereb Cortex*
- Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36:229-240
- Witelson SF, Glezer, II, Kigar DL (1995) Women have greater density of neurons in posterior temporal cortex. *J Neurosci* 15:3418-3428
- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006) Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60:1314-1323
- Wood DA, Buse JE, Wellman CL, Rebec GV (2005) Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell. *Brain Res* 1042:176-183
- Wright IK, Upton N, Marsden CA (1991) Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol Behav* 50:1129-1132
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5:448-453
- Zhang TY, Chretien P, Meaney MJ, Gratton A (2005) Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J Neurosci* 25:1493-1502
- Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP (2005) Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem* 93:1434-1443
- Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwoskin LP (2004) Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 148:107-117
- Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH (2006) Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res* 169:10-20
- Zimmerberg B, Brett MB (1992) Effects of early environmental experience on self-administration of amphetamine and barbital. *Psychopharmacology (Berl)* 106:474-478
- Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Wurbel H (2001) Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 121:11-20