



**Departamento de Psicobiología**  
**Doctorado en Neurociencias (30001)**  
**RD 1393/2007**

**EFFECTOS DEL ESTRÉS SOCIAL SOBRE LA MEMORIA Y SU  
MODULACIÓN FARMACOLÓGICA EN RATONES**

**EFFECTS OF SOCIAL STRESS ON MEMORY AND ITS  
PHARMACOLOGICAL MODULATION IN MICE**

**Tesis doctoral / PhD thesis**

**Presentada por / Presented by:**

Aránzazu Duque Moreno

**Dirigida por / Directed by:**

Dr. Santiago Monleón Verdú

Dra. Concepción Vinader Caerols

Valencia, Julio 2017



**A mis padres, por su apoyo incondicional.**

**A Basi, por sus sonrisas.**



## **ABREVIATURAS**

5-HT: Serotonina

A: Adrenalina

AINEs: Anti-inflamatorios no-esteroides

BLA: Núcleo basolateral de la amígdala

Cas: Catecolaminas

COX: Ciclooxygenasa

CPF: Corteza Prefrontal

CPFm: Corteza prefrontal medial

CRF: Hormona liberadora de corticotropina

CSDS: Estrés crónico de derrota social

DA: Dopamina

EPM: Laberinto en cruz elevado

GCs: Glucocorticoides

GRS: Receptores de glucocorticoides

HHA: Eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal

IA: Evitación inhibitoria

MWM: Laberinto acuático de Morris

NA: Noradrenalina

NOR: Reconocimiento de objetos

NPV: Núcleo paraventricular

PGs: Prostaglandinas

SI: Interacción social

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central



# CONTENIDOS

<b>PREFACIO .....</b>	<b>13</b>
<b>THESIS OUTLINE .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>21</b>
1.1. ¿QUÉ ES EL ESTRÉS? .....	23
1.2. ESTUDIANDO EL ESTRÉS SOCIAL EN ANIMALES: EL PARADIGMA INTRUSO-RESIDENTE .....	34
1.3. ¿QUÉ ES LA MEMORIA? .....	46
1.4. ESTUDIANDO LA MEMORIA EN ANIMALES .....	57
1.5. ¿CÓMO AFECTA EL ESTRÉS A LA MEMORIA? .....	66
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO III. EXPERIMENTOS 1, 2 Y 3. INHIBITORY AVOIDANCE LEARNING IN CD1 MICE: EFFECTS OF CHRONIC SOCIAL DEFEAT STRESS .....</b>	<b>93</b>
3.1. ABSTRACT .....	95
3.2. INTRODUCTION .....	97
3.3. MATERIAL AND METHODS .....	100
3.4. RESULTS .....	103
3.5. DISCUSSION .....	110
3.6. REFERENCES .....	114

**CAPÍTULO IV. EXPERIMENTOS 4 Y 5. EFFECTS OF SEVERAL DEGREES OF CHRONIC SOCIAL DEFEAT STRESS ON EMOTIONAL AND SPATIAL MEMORY IN CD1 MICE ..... 119**

4.1. ABSTRACT ..... 121

4.2. INTRODUCTION ..... 123

4.3. MATERIAL AND METHODS ..... 126

4.4. RESULTS ..... 133

4.5. DISCUSSION ..... 140

4.6. CONCLUSIONS ..... 145

4.7. REFERENCES ..... 146

**CAPÍTULO V. EXPERIMENTO 6. EFFECTS OF SOCIAL STRESS AND CLOMIPRAMINE ON EMOTIONAL MEMORY IN MICE ..... 151**

5.1. ABSTRACT ..... 153

5.2. INTRODUCTION ..... 155

5.3. MATERIAL AND METHODS ..... 158

5.4. RESULTS ..... 164

5.5. DISCUSSION ..... 169

5.6. CONCLUSIONS ..... 175

5.7. REFERENCES ..... 176



<b>CAPÍTULO VI. EXPERIMENTO 7. INDOMETHACIN COUNTERACTS THE EFFECTS OF CHRONIC SOCIAL DEFEAT STRESS ON EMOTIONAL BUT NOT RECOGNITION MEMORY IN MICE .....</b>	<b>181</b>
6.1. ABSTRACT .....	183
6.2. INTRODUCTION .....	185
6.3. MATERIAL AND METHODS .....	188
6.4. RESULTS .....	200
6.5. DISCUSSION .....	209
6.6. CONCLUSIONS .....	222
6.7. REFERENCES .....	222
<b>CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>233</b>
7.1. PRINCIPALES HALLAZGOS .....	235
7.2. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	247
<b>CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONS .....</b>	<b>253</b>
<b>CAPÍTULO IX. RESUMEN GENERAL .....</b>	<b>259</b>
9.1. INTRODUCCIÓN .....	261
9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	264
9.3. METODOLOGÍA .....	267
9.4. ESTUDIOS REALIZADOS .....	269

9.5. PRINCIPALES HALLAZGOS .....	273
9.6. CONCLUSIONES .....	277
<b>CAPÍTULO X. REFERENCIAS .....</b>	<b>281</b>
<b>FUENTES DE FINANCIACIÓN .....</b>	<b>311</b>
<b>ANEXO I. Artículo I. Monleón S, Duque A, &amp; Vinader-Caerols C. (2015). Effects of chronic social defeat stress on memory in post-pubertal and adult CD1 mice.....</b>	<b>313</b>
<b>ANEXO II. Artículo II. Monleón S, Duque A, &amp; Vinader-Caerols C. (2016). Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice .....</b>	<b>321</b>
<b>ANEXO III. Artículo III. Duque A, Vinader-Caerols C, &amp; Monleón S. (2016). Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice .....</b>	<b>333</b>
<b>ANEXO IV. Artículo IV. Duque A, Vinader-Caerols C, &amp; Monleón S. (2017). Indomethacin counteracts the effects of chronic social defeat stress on emotional but not recognition memory in mice .....</b>	<b>345</b>

## **PREFACIO**

Todos hemos experimentado estrés alguna vez en nuestra vida, pero ¿qué es el estrés? Es una pregunta difícil de responder debido a que hay tantas definiciones del término como personas existen. De hecho, Hans Selye, uno de los fundadores del concepto moderno de estrés, afirmaba que “todo el mundo sabe qué es estrés y, al mismo tiempo, nadie sabe qué es estrés” (Selye, 1973). Más recientemente, McEwen y Wingfield (McEwen y Wingfield, 2003) planteaban que “el problema con el término estrés es que posee demasiados significados”.

En el caso de los seres humanos, en tanto que especie social, el entorno y las relaciones interpersonales pueden llegar a establecerse como una fuente inagotable de estrés. Precisamente, este tipo de estrés social o psicosocial aumenta el riesgo de padecer un importante número de trastornos mentales y físicos, siendo, de especial relevancia el estudio en profundidad de sus consecuencias.

Así, el interés de la presente Tesis Doctoral radica en analizar el impacto del estrés crónico de derrota social, un tipo de estrés psicosocial en roedores sobre la cognición en ratones. Se hará especial énfasis en sus efectos sobre la memoria, fundamentalmente emocional, pero también espacial y de reconocimiento, así como la modulación farmacológica de dichos efectos.

El primer capítulo contiene una introducción general, empezando su primera sección con la definición de estrés, tanto biológica como social. La segunda sección explica qué modelos animales existen para

el estudio del estrés social, con especial énfasis en el modelo intruso-residente en roedores. La tercera sección define qué es la memoria, distinguiendo entre los principales tipos de memoria. La cuarta sección describe los diferentes tipos de tareas que existen para el estudio de la memoria en animales, con especial énfasis en la memoria emocional, espacial y de reconocimiento. Por último, la quinta y última sección aborda la cuestión de cómo afecta el estrés a la memoria, recogiendo un breve resumen de los principales hallazgos científicos al respecto.

El segundo capítulo está dedicado a la presentación de los principales objetivos e hipótesis de la Tesis Doctoral.

El tercer capítulo presenta los tres primeros experimentos, en los que se compara los efectos del estrés crónico de derrota social sobre la memoria emocional en ratones postpuberales y adultos.

El cuarto capítulo presenta los experimentos 4 y 5, en los que se estudian los efectos de diferentes grados estrés crónico de derrota social sobre la memoria emocional y espacial en ratones postpuberales.

El quinto capítulo presenta el experimento 6 centrado en el estudio del estrés crónico de derrota social sobre la memoria emocional en ratones postpuberales y su modulación a través del antidepresivo tricíclico clomipramina.

El sexto capítulo presenta el experimento 7 centrado en el estudio del estrés crónico de derrota social sobre la memoria

emocional y de reconocimiento en ratones postpuberales y su modulación a través del anti-inflamatorio indometacina.

El séptimo capítulo contiene una discusión general comentando los principales hallazgos, así como las limitaciones y las correspondientes perspectivas de futuro de la línea de investigación.

El octavo capítulo recoge las principales conclusiones de los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral.

El noveno capítulo incluye un resumen general de la Tesis Doctoral en el que se presentan los objetivos e hipótesis, la metodología y los estudios realizados, los principales hallazgos, así como las conclusiones extraídas.

El décimo capítulo contiene las referencias bibliográficas. Por último, se presentan los artículos originales a través de una sección final de anexos.



## **THESIS OUTLINE**

We have all experienced stress sometime in our lives, but what exactly is stress? This is a difficult question to answer because there are as many definitions of the term as people exist. Actually, Hans Selye, one of the founders of the modern concept of stress, stated that "everyone knows what stress is and at the same time no one knows what stress is" (Selye, 1973). More recently, McEwen and Wingfield (McEwen and Wingfield, 2003) stated that "the problem with the term stress is that it has too many meanings."

The World Health Organization defines stress as "the set of physiological reactions that prepares the body for action" (WHO, 1994). These reactions are therefore necessary for adaptation to new situations that compromise survival of the organism by threatening its homeostasis. Thus, at first, stress would be adaptive since it helps the individual to behave adequately within its environment. However, when the stressful situation continues long time, we talk about chronic stress, emerging its maladaptative side. In fact, the great changes taking place in today's society, particularly in relation to new technologies, have turned stress into a public health problem of growing interest.

In the case of humans, as a social species, the environment and the interpersonal relationships can be set as an inexhaustible source of stress. It is this type of social (or psychosocial) stress that increases the risk of a significant number of mental and physical

disorders, becoming of particular relevance to carefully study its consequences.

Thus, the main interest of this doctoral thesis is to evaluate the impact of chronic social defeat stress, a type of psychosocial stress in rodents, on cognition in mice, with emphasis on emotional memory, but also on spatial and recognition memory as well as the pharmacological modulation of these effects.

The first chapter of this thesis contains a general introduction, beginning its first section with the biological and social definition of the term stress. The second section explains which animal models exist in social stress research, focusing on the intruder-resident model in rodents. Then, the third part defines what memory is, distinguishing between the main types of memory. The fourth section describes the different types of tasks for studying memory in animals, with special emphasis on emotional, spatial and recognition memory. Finally, the fifth and last section addresses the question of how stress affects memory, by briefly summarizing the main scientific findings in this regard.

The second chapter is dedicated to the presentation of the main objectives and hypotheses of this doctoral thesis.

The third chapter presents the first three studies, comparing the effects of chronic social defeat stress on emotional memory in postpubertal and adult mice.



The fourth chapter presents studies 4 and 5, where the effects of different degrees of chronic stress of social defeat on emotional and spatial memory in postpubertal mice are studied.

The fifth chapter presents study 6 focused on researching the effects of chronic social defeat stress on emotional memory in postpubertal mice and its modulation by the tricyclic antidepressant clomipramine.

In the last study, the sixth chapter analyses the effects of chronic social defeat stress on emotional and recognition memory in postpubertal mice and its modulation by the anti-inflammatory indomethacin.

The seventh chapter contains a general discussion where the main findings of the aforementioned studies, as well as the limitations and the future perspectives on this research topic are discussed.

The eighth chapter collects the main conclusions of the studies included in this doctoral thesis.

The ninth chapter includes a general summary of the Thesis presenting the objectives and hypotheses, the methodology and the studies carried out, the main findings, as well as the conclusions.

The tenth chapter contains the references. Finally, the original articles are presented in a final section of annexes.



# **CAPÍTULO I.**

## **INTRODUCCIÓN**

---

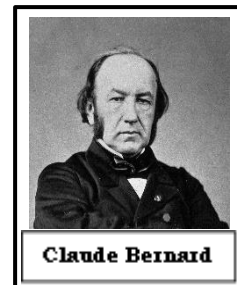


## 1.1. ¿QUÉ ES EL ESTRÉS?

### 1.1.1. Evolución del concepto estrés

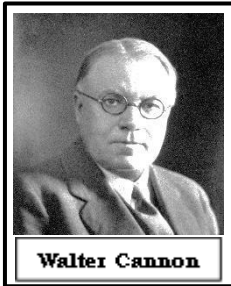
El origen del concepto de estrés se remonta al siglo XIV, época en la que el término fue tomado del latín (*stringere*: tensar o estirar) y utilizado en inglés (*strain*: tensión) para describir opresión, adversidad y dificultad (Moscoso, 1998). En el siglo XV, desde el campo de la química y la física, el término empieza a ser utilizado para hacer referencia a la fuerza o presión externa que se ejerce sobre estructuras mecánicas elásticas, en las que puede provocar un estado de tensión hasta llegar a deformarlas. A lo largo del siglo XVI, el concepto se generaliza al campo de la ingeniería y la arquitectura para denotar dificultad o adversidad (Molina-Jiménez y cols., 2008). Así, el concepto estrés hace referencia a las diferentes tensiones físicas ejercidas sobre un punto determinado de un material y a la deformación que sufre dicho material ante tales presiones (Beitia, 2007).

A partir del siglo XIX, destacan tres autores clásicos relevantes en el estudio fisiológico del estrés. El fisiólogo francés **Claude Bernard** estableció un modelo sobre la constancia del medio interior, postulando que la cualidad definitoria de los seres vivos era su capacidad



adaptativa para mantener estables las condiciones físico-químicas del medio interno ante los agentes agresores. Así, todo organismo posee un mecanismo básico para su supervivencia, la autorregulación que

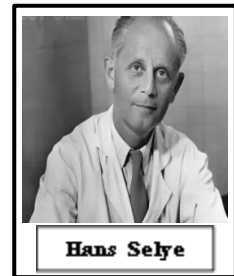
mantiene estable su medio interno ante las presiones del medio ambiente externo (Johnson y cols., 1992). Posteriormente, **Walter**



**Cannon** introdujo en la literatura científica el término "homeostasis" como la tendencia de los seres vivos a mantener, mediante mecanismos compensatorios, un equilibrio fisiológico ante circunstancias adversas (Johnson y cols., 1992).

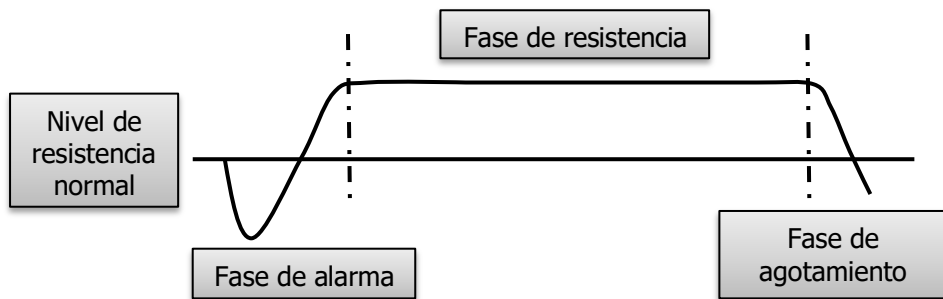
Asimismo, conceptualizó el estrés como una respuesta de lucha-huida (Molina-Jiménez y cols., 2008), como una reacción de emergencia que ayuda al organismo a movilizar energía para preparar una respuesta de lucha o de huida ante una situación de peligro (Cannon, 1929; 1932).

Sin embargo, sería el científico **Hans Selye** uno de los autores más influyentes del siglo XX, al popularizar la teoría del estrés como una idea científico-médica (Selye, 1936; 1950; 1974). Así, Selye definió el estrés como una respuesta biológica no específica que generan todos los



organismos frente a las demandas y presiones del medio ambiente (Selye, 1936). Sin lugar a dudas, una de las grandes contribuciones de Selye al campo de estrés fue la descripción del Síndrome General de Adaptación (Selye, 1950), como una respuesta fisiológica compleja y amplia destinada a mantener la homeostasis y caracterizada por tres fases sucesivas: (a) en la fase de alarma, se produce una reacción fisiológica inicial, rápida y enérgica, basada en la activación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y la liberación de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) a la circulación sanguínea (Beitia, 2007;

Molina-Jiménez y cols., 2008); (b) en la fase de resistencia, si se mantiene la situación estresante, el organismo pone en marcha una distribución paulatina de los recursos disponibles, evitando el agotamiento de los mismos, a través de la activación del eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HHA) y la liberación de glucocorticoides (GCs) al flujo sanguíneo; finalmente (c) la fase de agotamiento ocurre si la situación estresante tiene cierta magnitud y se prolonga en el tiempo, produciéndose un cese de la respuesta adaptativa y conduciendo a la aparición de enfermedad e, incluso, a la muerte (Beitia, 2007). La figura 1 muestra las diferentes fases del Síndrome General de Adaptación.



**Fig. 1.** Fases del estrés según Hans Selye.

### 1.1.2. Bases biológicas de la respuesta de estrés

De modo general, cuando se produce una sobre-exigencia del medio externo que es percibida como potencialmente amenazante, ocurre una reacción en cadena de cambios fisiológicos y psicológicos que tiene como objetivo preparar al individuo para enfrentarse a la situación en las mejores condiciones posibles sin salir perjudicado. Así, dichos cambios tienen un claro significado adaptativo debido a

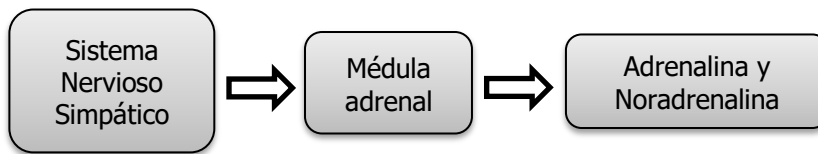
que ayudan al organismo a realizar el esfuerzo físico necesario; eliminan las conductas no adaptativas y facilitan la evaluación de la situación y la toma y ejecución de soluciones (Sandi y cols., 2001).

El hipotálamo es crucial, ya que después de que la información sensorial de la situación llega al cerebro y es evaluada como potencialmente amenazante por la amígdala, es la estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) que integra y modula la información neuroquímica, fisiológica y conductual referente a dicha situación estresante. Así, esta región cerebral, vía núcleo paraventricular (NPV), es capaz de regular y coordinar dicha información tan variada y compleja mediante la activación de dos sistemas clave: el SNA y el eje HHA.

- El **SNA**, a través de sus tres ramas (Sistema Nervioso Simpático, Sistema Nervioso Parasimpático y Sistema Nervioso Entérico), controla de forma inconsciente una amplia gama de funciones viscerales del organismo (Sandi y cols., 2001). Cannon ya destacó el papel central de la adrenalina liberada por el sistema simpático-adrenal en la respuesta de lucha-huida ante la exposición a estímulos amenazantes (Cannon, 1934). En efecto, se sabe que, frente a un estresor, automáticamente se activa el Sistema Nervioso Simpático, el cual incrementa la liberación de las hormonas catecolaminas (CAs), A y NA, por la médula adrenal a la circulación sanguínea. Las CAs, al unirse a sus receptores adrenérgicos, generan cambios fisiológicos, a través de la estimulación del corazón y del aumento del flujo sanguíneo en el SNC y en los músculos en cuestión de segundos, permitiendo al organismo responder directamente al estresor



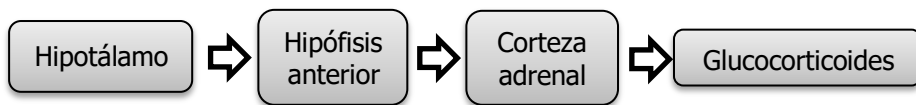
(Gómez-Lázaro, 2011). Así, uno de los primeros pasos del complejo mecanismo de defensa del cuerpo contra el estrés es un repentino y marcado aumento de la actividad simpática, lo que produce un conjunto de respuestas adaptativas a corto y medio plazo, que permiten al cuerpo enfrentar de la manera más eficaz la amenaza percibida.



**Fig. 2.** Sistema Nervioso Simpático.

- Selye ya resaltó, junto a la actividad del Sistema Nervioso Simpático, la actividad del **eje HHA** y la liberación de glucocorticoides (GCs) ante la exposición a un estresor (Selye, 1950). En efecto, cuando un estímulo estresante sobrepasa un determinado umbral en intensidad y/o duración, se activa un segundo sistema efector, el eje HHA que contribuye a continuar enfrentando la situación estresante. Este eje está formado por tres estaciones: el hipotálamo y su NPV que libera la hormona liberadora de corticotropina (CRF, del inglés *Corticotropin Releasing Factor*); la hipófisis y su núcleo adenohipófisis que libera la hormona adrenocorticotropa o corticotropina y finalmente la glándula adrenal que segrega las hormonas GCs, cortisol en el caso de los seres humanos y corticosterona en el de otras especies (Sapolsky, 1992). La acción fundamental de los GCs es elevar los niveles de glucosa en sangre, además de otros efectos (Sapolsky, 1992), orientados a proporcionar energía al sistema nervioso y a la musculatura cardíaca

y esquelética (Del Abril y cols., 2016). Como en todos los ejes endocrinos, el eje HHA está sometido a una retroalimentación negativa producida por los propios GCs hacia la hipófisis y el hipotálamo, impidiendo de este modo, una excesiva activación del eje. Así, los GCs ajustan su propia secreción a las necesidades del organismo; es decir, que dicho ajuste es proporcional al nivel de GCs circulantes. Este fenómeno es esencial en el caso del eje HHA debido a la extensión con la que los receptores de GCs (GRs) están distribuidos por el organismo, no sólo en las zonas cerebrales, si no en otras estructuras no cerebrales como por ejemplo el hígado.



**Fig. 3.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.

### **1.1.3. Interacciones sociales como estresores prototípicos**

El estrés es un concepto multidimensional que puede ser categorizado en base a diferentes parámetros como el tipo de estresor, su intensidad, duración o frecuencia. En base a la dimensión origen o tipo de estresor, emerge la categoría social, también denominada emocional o psicosocial, que es conceptualizada como las contingencias sociales, incluyendo desde los sucesos vitales o hasta las relaciones con los congéneres y pudiendo ser negativas (e.g. separaciones, pérdidas...) o positivas (e.g. éxitos en las fases iniciales del matrimonio, nacimiento de un hijo) (Sandi y cols., 2001). Estas experiencias interpersonales dan lugar a cambios afectivos que

pueden desencadenar diversas patologías en función de la predisposición genética, la experiencia y el ambiente cultural del individuo (Molina-Jiménez y cols., 2008).

En la actualidad, debido a la naturaleza de nuestro estilo de vida, los estresores sociales son considerados como las experiencias estresantes más potentes en los seres humanos, contribuyendo al desarrollo y expresión de trastornos muy variados, tanto mentales como físicos. Así, más allá de su intensidad, duración o frecuencia, hay que tener en cuenta la naturaleza de una experiencia estresante a la hora de evaluar sus consecuencias, considerándose que los individuos son más susceptibles a padecer sus efectos más negativos cuando además de crónica e impredecible, es de naturaleza social (Björkqvist, 2001; Blanchard y cols., 2002; De Kloet y cols., 1998; Koolhaas y cols., 1997).

A diferencia de lo que ocurre con los estresores físicos frente a los cuales el organismo puede reaccionar rápidamente mediante la típica respuesta de lucha-huida, frente a los estresores sociales resulta inapropiado basar la salida de la situación exclusivamente en esta reacción. Esta incapacidad para responder de forma exteriorizada deja al cuerpo fisiológicamente preparado para una acción que nunca se completa, un estado de preparación que, al mantenerse en el tiempo, puede dañar seriamente al organismo. Diversos estudios han demostrado que la incapacidad del organismo humano para controlar los estresores sociales y psicológicos puede llevar al desarrollo de alteraciones cardiovasculares, hipertensión, úlceras peptídicas, dolores musculares, asma, jaquecas, pérdida de la

calidad de vida, depresión y otros problemas de salud, así como también al incremento de las conductas de enfermedad (Cockerham, 2001; Mechanic, 1976; Ortiz, 2001).

#### **1.1.4. Diferencias individuales como factor de riesgo o de protección**

La manera en que el sujeto perciba, afronte y module cada estresor social particular determinará el grado de estrés que experimente y sus consecuencias sobre los diferentes sistemas del organismo, haciéndole más o menos sensible al desarrollo de determinadas patologías (Rivest, 2002; Sandín, 2003). Desde esta perspectiva, existiría una susceptibilidad diferencial a la enfermedad de base que explicaría la diferente respuesta al estrés (Nadal y Armario, 2010). De hecho, la mayoría de los investigadores coinciden en que los eventos vitales estresantes pueden precipitar la aparición de trastornos, en presencia de factores genéticos (Caspi y cols., 2003) y psicológicos (Anisman y Matheson, 2005) de vulnerabilidad, creándose un continuum de resistencia-vulnerabilidad al estrés.

El modelo de diátesis-estrés plantea que la vulnerabilidad o predisposición psicobiológica (diátesis) interactúa con el ambiente social (estrés) para desencadenar trastornos psicológicos. Por un lado, la vulnerabilidad o diátesis, como factor innato, haría más o menos probable la aparición y desarrollo de una psicopatología con un cierto estrés. Por otro lado, el estrés, como factor adquirido, se daría al alterarse el equilibrio en la vida de la persona. Cuanto mayor sea la vulnerabilidad subyacente, menos estrés se necesita para desencadenar el trastorno y cuanto menor sea la contribución

genética, más estrés se requiere para producir un resultado particular. Es decir que, ni todos los individuos que refieren estrés desarrollan un trastorno psicológico, ni todos los individuos con una predisposición a la vulnerabilidad derivan en un trastorno (Lemos-Giráldez, 2003). Por tanto, ante las mismas situaciones negativas, tendrían menor o mayor probabilidad de deprimirse aquellas personas conocidas como "resilientes" o "susceptibles" de forma respectiva en función de su menor o mayor cantidad e intensidad de factores de vulnerabilidad (Anisman y Matheson, 2005; Vázquez y cols., 2010).

#### **1.1.5. El fenómeno del acoso**

Muchos de los sucesos sociales estresantes se relacionan con los roles sociales, consistentes principalmente en dificultades interpersonales que alteran considerablemente la calidad de vida del individuo (Cockerham, 2001; Kop, 1997; McEwen, 2005; Steptoe y Marmot, 2002). El fenómeno del acoso representa adecuadamente lo que se entiende como relación interpersonal negativa, perfilándose como un caso representativo de estrés social, ya que implica que una persona/grupo hostiga, persigue o molesta a otra/o en un contexto social determinado. En el acoso existe una acción constante, recurrente y, en ocasiones, concertada por parte de uno o varios individuos en contra de otro o varios individuos además de producirse un abuso de poder que va anulando progresivamente y que generalmente es aceptado por la víctima (Smith, 2000). Esto quiere decir que se trata de un estresor social altamente traumático, que afecta de forma negativa la salud física y psicológica de las personas

objeto de la agresión, ya que, como otro tipo de estresores, activa respuestas fisiológicas y emocionales. Así, siendo considerado el acoso como una de las formas más severas de relación humana estresante, es indudable que las víctimas van a experimentar un conjunto de efectos muy negativos.

Dos ejemplos paradigmáticos serían el acoso escolar (o "bullying") y el acoso laboral (o "mobbing"). Aunque estos dos tipos de acoso se dan en diferentes contextos y en una etapa evolutiva distinta, ambos afectan gravemente a la calidad de vida del acosado (Cockerham, 2001) como resultado de una pretensión consciente y premeditada por parte del acosador de infringir daño, mediante agresión y/o manipulación (Sullivan, 2000). De hecho, la ansiedad (Fernández y Martín, 2005; Hawker y Boulton, 2000; Olweus, 1978), la depresión (Björkqvist y cols., 1982; Fernández y Martín, 2005; Hawker y Boulton, 2000), la baja autoestima (Björkqvist y cols., 1982; Fernández y Martín, 2005; Lagerspetz y cols., 1982), la auto-percepción negativa (Björkqvist y cols., 1982; Lagerspetz y cols., 1982) así como la soledad y el aislamiento social (Fernández y Martín, 2005; Hawker y Boulton, 2000) representan los síntomas comunes que se pueden recoger en las víctimas de acoso escolar. En el caso del acoso laboral, además de la ansiedad, la auto-percepción negativa y la frustración (Martínez y cols., 2012), se han encontrado evidencias de que sus víctimas muestran frecuentemente síntomas del trastorno por estrés postraumático (Molina-Jiménez y cols., 2008) así como fobia social (Björkqvist, 2001).

Por tanto, los acontecimientos sociales que presentan una alta carga emocional, como las relaciones interpersonales conflictivas, constituyen un estímulo estresor muy potente en seres humanos. Este hecho ha generado un aumento del interés por investigar efectos del estrés social; sin embargo, las limitaciones intrínsecas a la investigación humana como, por ejemplo, la dificultad para diferenciar entre los efectos directos de las situaciones estresantes y los antecedentes previos presentes en los sujetos evaluados. Así, un problema básico que presenta la investigación con seres humanos es que son estudios *post hoc*, es decir que se realizan normalmente a posteriori de darse la situación estudiada, siendo muy difícil obtener una línea base previa de las dimensiones evaluadas (Björkqvist, 2001). Esta situación imposible de eliminar, ya que no sería ético provocar estrés social en seres humanos, ha promovido la emergencia y desarrollo de la experimentación animal. Es cierto que la derrota social y la agresión en animales no es totalmente equivalente a la sumisión y acoso en humanos; sin embargo, los efectos del estrés asociados a encuentros agonísticos en animales pueden representar una fuente de conocimiento relevante sobre los trastornos fisiológicos provocados por estresores psicosociales en humanos (Miczek y de Wit, 2008).

Como se verá a continuación, los modelos animales constituyen un campo de investigación que incluye el estudio de los efectos negativos provocados por el estrés social, así como de los tratamientos farmacológicos específicos para revertir las alteraciones asociadas. El uso de modelos animales que permitan generar una respuesta análoga a la que se encontraría en la especie humana es

muy importante, ya que posibilita, no sólo corroborar el estado patológico suscitado por el estrés social y validar la eficacia de los fármacos empleados, sino que aporta datos sobre los mecanismos implicados en las alteraciones producidas por el estrés social.

## **1.2. ESTUDIANDO EL ESTRÉS SOCIAL: EL PARADIGMA INTRUSO-RESIDENTE**

### **1.2.1. Modelos animales de estrés social**

En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en profundizar en el análisis pormenorizado de las consecuencias del estrés social a través de modelos animales (Buwalda y cols., 2005). Como ya se ha comentado, esto se debe a que, por una parte, los estresores de naturaleza social tienen un gran efecto sobre las diferentes áreas de la vida del individuo y a que, por otra parte, es difícil determinar en el caso de los seres humanos qué características se producen como consecuencia del estrés social y cuáles están presentes antes de producirse el episodio estresante. De hecho, en la mayoría de las especies sociales, los individuos se exponen constantemente a relaciones de dominancia y sumisión que generan situaciones de conflicto social que adquieren un gran significado biológico, ya que producen marcadas diferencias en el acceso a recursos, generando situaciones de estrés que se han considerado similares a las que se dan en los seres humanos (Henry y cols., 1993; Rohde, 2001). Además, los modelos animales son una herramienta



de gran valor que permite examinar cada uno de los aspectos que rodean a una determinada conducta en un contexto específico.

En un principio, los modelos animales de estrés se centraban fundamentalmente en el estudio de los efectos generados por estresores físicos como la administración de choques eléctricos, por estresores biológicos como la privación de alimento o bebida o por estresores psicológicos como el estrés por novedad. Aunque estos paradigmas convencionales han dado lugar a resultados reveladores, su artificialidad y lejanía respecto a la realidad de las personas ha dado impulso a otros tipos de modelos más representativos (Björkqvist, 2001). De hecho, Henry y cols. (1993) fueron de los primeros investigadores en reconocer la importancia del ambiente social como generador de estrés más que otras condiciones estresantes como el frío extremo, la restricción de movimientos o los choques eléctricos, siendo los modelos animales que incluyen un contexto social más adecuados al adquirir un significado biológico que se asemeja bastante a la etiología del estrés en humanos (Henry y cols., 1993). A través del uso de especies muy variadas, desde roedores hasta primates no humanos, estos modelos animales han supuesto un importante avance en la investigación sobre los procesos adaptativos utilizados frente a los desafíos del ambiente social. Además, más allá de la investigación básica, estos paradigmas hacen posible el estudio de muchos de los síntomas de las enfermedades humanas asociadas al estrés, como la ansiedad o la depresión, llegando a determinar, de este modo, cuáles son los mecanismos subyacentes y descubrir los tratamientos farmacológicos adecuados

(Bohus y cols., 1990; Koolhaas y cols., 1995; Kudryavtseva y cols., 1991).

De forma general, en los modelos animales de estrés social, las situaciones agonísticas son el mecanismo principal a través del cual la experiencia social es considerada como productora de estrés (Blanchard y cols., 2001), siendo la derrota social uno de los estímulos sociales estresantes más potentes (Koolhaas y cols., 1997). La mayoría de los estudios sobre los efectos del estrés social hace uso de roedores de laboratorio, sobre todo ratones o ratas y, en ocasiones, hámsteres, aunque otros estudios realizados también utilizan primates en condiciones semi-naturales o, incluso, en su medio natural (Blanchard y cols., 2001). En roedores, destacan desde los modelos que utilizan colonias intentando reproducir la vida social normalizada de la especie, hasta los que se centran en interacciones diádicas, como el paradigma intruso-residente, generando una situación de conflicto entre dos individuos conspecíficos. Así, estos modelos engloban una metodología y una validez etológica adecuada, lo que les permite examinar cómo el estrés social crónico afecta al organismo tanto a nivel fisiológico como conductual, así como el estudio de psicopatologías asociadas (Bartolomucci y cols., 2005; Koolhaas y cols., 1990; Kudryavtseva y cols., 1991).

### **1.2.2. El paradigma intruso-residente**

El paradigma de estrés crónico de derrota social (CSDS, del inglés *Chronic Social Defeat Stress*) parte de la aparición de un conflicto social inminente e imparable entre dos machos, en el que el residente defiende su territorio frente al intruso, otro macho

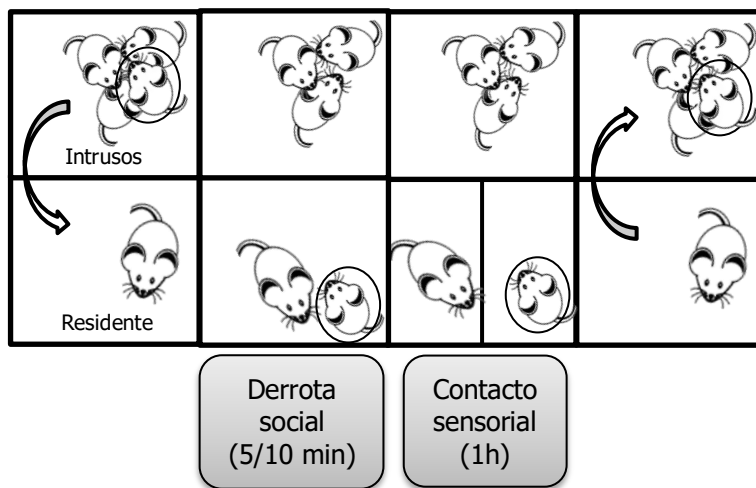
conspécífico no familiar, que es introducido en la jaula dónde reside el primero. El intruso es sometido a continuas derrotas por parte del residente debido a la necesidad de este último de controlar su territorio. El residente es el vencedor del encuentro agonístico o sujeto dominante y el intruso, el derrotado o sujeto subordinado. Se considera que el animal derrotado experimenta el fenómeno del estrés social (Björkqvist, 2001). Así, este modelo es óptimo debido a que aborda las consecuencias de los conflictos sociales entre individuos de una misma especie y posibilita el estudio de las estrategias que se desarrollan para permitir la supervivencia (Gutiérrez-García y Contreras, 2000; Rygula y cols., 2005).

Aunque los modelos de CSDS difieren en algunos aspectos, comparten características comunes, como el género, empleándose principalmente machos (Martinez y cols., 1998) debido a que, en la mayoría de especies de mamíferos, las jerarquías de dominancia que se observan entre los machos son mucho más visibles que las que establecen las hembras (Blanchard y cols., 2001). Otro aspecto que comparten muchos de los modelos es la exposición de un animal a los ataques físicos incontrolables producidos por otro animal de la misma especie (Martinez y cols., 1998). Por otro lado, debido a que las interacciones durante los encuentros agonísticos se ven influidas por factores como la especie, la edad o la historia previa del individuo (Blanchard y cols., 2001), conviene establecer una serie de precauciones para asegurar que el residente agrede al intruso (Golden y cols., 2011; Martinez y cols., 1998): (1) que el residente pertenezca a una cepa más agresiva que el intruso o que haya pasado por un cribado previo que confirme un nivel de agresividad

óptimo, (2) que el residente tenga un peso superior al intruso o que tenga tres meses o más de edad, (3) que el residente sea alojado con una hembra en el caso de las ratas o individualmente en el caso de los ratones, (4) que el intruso sea alojado individualmente en el caso de las ratas o grupalmente en el caso de los ratones, (5) que el residente haya tenido una experiencia previa de victoria, y (6) que el intruso no tenga experiencia previa derrota social.

Existen varias versiones del modelo, siendo lo más común la modificación de la duración y del tipo de experiencia social estresante (Martinez y cols., 1998). La **duración de la experiencia social** estresante se refiere al tiempo total de cada encuentro, desde segundos a minutos, pero también a la frecuencia de los encuentros, desde modelos de estrés agudo si los animales luchan en una única ocasión hasta modelos de estrés crónico si los animales luchan en varias ocasiones durante días o semanas (Björkqvist, 2001). Dentro del modelo de estrés crónico, se distingue entre la exposición repetida o intermitente, la cual se puede llevar a cabo durante un mismo día o en diferentes días, y la exposición continua (Martinez y cols., 1998). El **tipo de experiencia social** estresante distingue los modelos en los que el intruso es expuesto únicamente a ataques físicos, teniendo sólo un contacto directo con el residente, de aquellos modelos en los que el intruso es expuesto tanto a ataques físicos como a amenazas de ataque, siendo alojado en un área adyacente tras haber sido derrotado o entre sesiones de derrota y manteniendo un contacto visual, auditivo y olfatorio pero no físico con el residente (Blanchard y cols., 2001). Existen los modelos de contacto sensorial constante, en los que los animales son alojados de

manera permanente en la misma caja separados por una barrera hasta el momento de las sesiones de derrota (Kudryavtseva, 2000). Es importante que no haya contacto físico directo cuando el residente manifiesta una amenaza de ataque para así diferenciar entre el estrés físico del ataque en sí y los efectos emocionales de la amenaza de ataque. Como muestra la figura 4, en el caso de la presente Tesis Doctoral, las sesiones de derrota social van seguidas por una hora de contacto sensorial, tras el cual el intruso es devuelto a su jaula junto con el resto de compañeros hasta el siguiente episodio de derrota 24 horas después.



**Fig. 4.** Protocolo de una sesión de CSDS aplicado en la presente Tesis Doctoral.

Por tanto, el paradigma intruso-residente conlleva un conflicto social entre miembros de la misma especie, utilizando como estrategia para generar estrés estímulos naturales y cotidianos en la vida social (Koolhaas y cols., 1997).

### 1.2.3. Cambios asociados al estrés social

Se ha observado que la experiencia de derrota social puede desencadenar diversos efectos negativos en varias especies, induciendo una sola experiencia de derrota social signos evidentes de estrés en ratas machos (Björkqvist, 2001). Se sabe que las consecuencias producidas por la exposición al estrés social, como a cualquier tipo de estrés, dependen de las características de la situación estresante, como su intensidad, su duración o su predictibilidad, y de las diferencias individuales como la susceptibilidad-resiliencia de los sujetos (Blanchard y cols., 2001). Por otro lado, también son conocidos los cambios fisiológicos y conductuales que el estrés social produce. A continuación, se presentan algunos de los más representativos.

Los **cambios conductuales** pueden ser observados en una gran variedad de situaciones sociales y no sociales. En general, los sujetos sumisos muestran una disminución de la actividad locomotora y exploratoria, un aumento de la conducta de inmovilidad y de la tendencia a evitar el área protegida por el sujeto dominante y una reducción e, incluso, desaparición de la conducta agresiva (para una revisión ver Beitia, 2007).

- En una amplia variedad de pruebas que evalúan la **conducta social**, un resultado que se observa de forma consistente es que los animales derrotados manifiestan una disminución de la interacción con otros sujetos conspecíficos desconocidos (Beitia, 2007), pasando significativamente menos tiempo en áreas próximas a éstos y manifestando una conducta de evitación social, comparados con los

animales no derrotados (Berton y cols., 2006; Dadomo y cols., 2011; Hammels y cols., 2015; Hollis y cols., 2010). De hecho, se ha visto que el ECDS en ratones altera la conducta exhibida hacia el sujeto dominante, observándose una disminución progresiva de la defensa activa y de la retirada y un aumento de la defensa pasiva y de la inmovilidad (Beitia, 2007). Se genera una disminución del contacto social y de la conducta afiliativa (para revisión ver Blanchard y cols., 2001). Asimismo, en varias especies se ha observado que los machos subordinados muestran menores niveles de agresión (para revisión ver Blanchard y cols., 2001 y Martínez y cols., 1998). En las pruebas que evalúan interacción social se observa un incremento de la evitación de la zona frecuentada por el macho dominante, una reducción de la actividad y la locomoción, así como la presencia de inmovilidad (Blanchard y cols., 2001). Se ha observado que los sujetos sumisos sometidos a derrota social crónica seguida de contacto sensorial posterior valoran los riesgos más exhaustivamente (Kudryavtseva y Avgustinovich, 1998). Esto se traduce, por ejemplo, en que los animales subordinados están más pendientes del sujeto dominante y de sus conductas (Blanchard y cols., 2001). En relación a lo anterior, el animal sumiso realiza ataques "amistosos" no peligrosos cuando se encuentra cerca del dominante (Drea y Wallen, 1999; Pells y cols., 1993; Schaub, 1995).

- La **conducta sexual** también forma parte de la conducta social, estando estrechamente vinculada a la dominancia de los machos. En muchas especies, los animales subordinados muestran menor conducta sexual que los dominantes (para revisión ver Blanchard y cols., 2001), aunque pueden encontrarse diferencias (D'Amato y

Pavone, 1992). De hecho, en ratones, los animales que han sido víctimas de ataques ven disminuida su conducta copulatoria (Yoshimura y Kimura, 1991) así como la eyaculación espontánea (Huber y Bronson, 1980). Por el contrario, en ratas, la latencia y frecuencia de la conducta de montas e intromisiones, así como la frecuencia de eyaculación no resultaron afectadas por la exposición a derrota social (Kinn y cols., 2008).

- Respecto a la ***conducta no social***, en general, los animales derrotados muestran un incremento de síntomas ansiosos y depresivos. La reducción de la *actividad exploratoria* se encuentra entre los cambios observados en animales subordinados, en ratas (e.g. Watt y cols., 2009), en tupayas (e.g. Van Kampen y cols., 2000) y en ratones (e.g., Iñiguez y cols., 2014). Sin embargo, también se ha observado que ratas socialmente derrotadas no muestran cambios en la actividad motora en comparación con las ratas controles (Kinn y cols., 2008). La *ansiedad* manifestada por los animales tras haber sido sometidos a estrés de derrota social ha sido objeto de estudio en muchas ocasiones (Blanchard y cols., 2001). De hecho, en general, los estudios muestran un incremento de la emocionalidad en los animales derrotados, medida a través del laberinto elevado en cruz, el laberinto en cero o el campo abierto (e.g. Blanchard y cols., 2001; Hammels y cols., 2015; Martinez y cols., 1998). La *anhedonia*, definida como la incapacidad para experimentar placer por actividades con las que el sujeto disfrutaba anteriormente, representa un síntoma central de la depresión en seres humanos (Hammels y cols., 2015). Se ha propuesto la disminución del consumo de agua con sacarosa como un indicador de anhedonia en roedores (Moreau,



1997; Muscat y Willner, 1992). La preferencia por la sacarosa disminuye en ratas (Rygula y cols., 2005) y ratones (Covington y cols., 2009; Yu y cols., 2011) sometidos a ECDS. Sin embargo, los animales expuestos a un estrés social más agudo (entre 1 y 5 días) no experimentan dicha alteración en la preferencia por la sacarosa, lo cual se ha observado tanto en ratas (Meerlo y cols., 1996) como en ratones (Croft y cols., 2005; Razzoli y cols., 2011; Von Frijtag y cols., 2002).

Debido a que el eje HHA representa el principal eje neuroendocrino activado por el estrés, tanto psicológico como fisiológico, muchos de los estudios se han centrado en evaluar los **cambios neuroendocrinos** producidos por el estrés de derrota social sobre las hormonas del estrés. En general, se observa una activación del eje en los animales derrotados (ver Martínez y cols., 1998). Por ejemplo, se han visto niveles circulantes aumentados de adrenocorticotropina en respuesta al estrés en animales sometidos a estrés de derrota social (Bhatnagar y cols., 2006; Keeney y cols., 2006). La liberación de las catecolaminas A y NA también se ha visto incrementada en animales derrotados (Hucklebridge y cols., 1981; Sgoifo y cols., 1996). Del mismo modo, aunque algún estudio no ha encontrado cambios en los niveles de hormonas del estrés en animales derrotados (Foster y cols., 2006), muchos otros han encontrado un incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona inmediatamente o durante un periodo prolongado de tiempo después de la última sesión de derrota social (Hammels y cols., 2015; Patki y cols., 2013).

La mayoría de los estudios sobre los **cambios fisiológicos** inducidos por el estrés social, se han centrado principalmente en el sistema cardiovascular y en la temperatura. Se ha encontrado un aumento de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca aunque también se ha observado un descenso en la presión arterial tras un solo o varios episodios de derrota (Martinez y cols., 1998). Por otro lado, Sgoifo y cols. (2005) demostraron mediante radiotelemedría que un solo episodio de derrota social en ratas inducía alteraciones cardiovasculares, consistentes en una reducción en la amplitud de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, hasta dos semanas después del último episodio de derrota social. Además, las ratas expuestas a derrota social intermitente no mostraban una adecuada activación cardíaca autonómica en respuesta a otros estresores puntuales (Sgoifo y cols., 2002).

En cuanto a los **cambios neuroquímicos**, se puede destacar la importancia de la **dopamina (DA)** al jugar un papel central en el sistema de recompensa cerebral, lo cual ha sido relacionado con la anhedonia generada por el estrés de derrota social. De hecho, del mismo modo que ocurre en respuesta al refuerzo, existe un aumento de la liberación de DA en el núcleo accumbens y en la Corteza Prefrontal (CPF) en roedores tras haber sido sometidos a derrota social crónica o subcrónica (Berton y cols., 2006; Tidey y Miczek, 1996). Los incrementos en la liberación de DA producen a su vez alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión, como el gabérgico o el glutamatérgico (Kemppainen y cols., 2010). Aunque puede parecer contradictorio, dicho incremento ha sido interpretado como un paso crucial para el aprendizaje asociativo gracias al cual el

organismo se prepara para dar una respuesta apropiada frente a un estímulo biológico significativo, ya sea reforzante o aversivo (Beeler y cols., 2010). Por otro lado, se ha visto que la derrota social se caracteriza por aumentos en la actividad cerebral de los neurotransmisores **serotonina (5-HT)** y **A**, siendo importantes en la regulación del estado de ánimo, de la conducta y de numerosas funciones fisiológicas. De hecho, los fármacos antidepresivos cuya acción se centra en modular la actividad 5-HT y NA, atenúan los síntomas depresivos producidos por el estrés social en animales susceptibles al estrés (Hammels y cols., 2015).

Por último, los **cambios inmunológicos** han sido igualmente objeto de estudio en el campo del estrés y décadas de investigación han demostrado que el estrés induce inmunosupresión y una mayor propensión a la enfermedad (Hammels y cols., 2015; Martinez y cols., 1998). Sin embargo, en los últimos años se ha visto que, en función de la naturaleza, intensidad y duración del estresor, así como del tipo de células inmunológicas estudiadas, los efectos del estrés sobre el sistema inmune son variados (Reader y cols., 2015). Así, se ha visto que episodios repetidos de estrés de derrota social favorecen la función inmune a través de la inducción de insensibilidad a los GCs, impidiendo de este modo la función inmunosupresora de estos últimos (Barnes y Adcock, 2009; Silverman y Sternberg, 2012). De hecho, se ha subrayado la faceta adaptativa de dicha reacción de potenciación inmunológica frente a situaciones en las que el organismo puede resultar herido (Avitsur y cols., 2006). Sin embargo, también es cierto que, conforme pasa el tiempo, dicha reacción puede causar daños en los tejidos, llegando a asociar dicho estado

inflamatorio prolongado con la aparición de enfermedades mentales, como la depresión o la ansiedad (Barnes y Adcock, 2009).

Por tanto, la investigación experimental a través del uso de modelos animales ha permitido abordar los diferentes cambios que acontecen en el organismo sometido a estrés social, abarcando los diferentes sistemas del mismo, lo cual demuestra el efecto psicobiológico tan potente que produce este tipo de experiencia.

### **1.3. ¿QUÉ ES LA MEMORIA?**

#### **1.3.1. Concepto de memoria**

Los seres humanos somos organismos vivos que dependemos de nuestras experiencias personales previas. De hecho, como la mayoría de los animales, tenemos la capacidad de regular nuestro funcionamiento y nuestra relación con el mundo exterior. Gracias a nuestro complejo sistema cerebral, somos capaces de organizar dichas experiencias previas con el fin de conseguir una mejor adaptación a las circunstancias futuras. Esta integración de lo vivido es posible gracias a las capacidades de aprendizaje y memoria (Fig. 5).

Aunque aparentemente la memoria se podría considerar una función aislada e independiente, en realidad está íntimamente unida al aprendizaje, de tal forma que al hablar de memoria debemos referirnos necesariamente al proceso de aprendizaje (Tarpy, 1986), ya que aprendizaje y memoria son las dos vías a través de las que el

ambiente incide en el desarrollo de las funciones cerebrales para que haya una adaptación de las respuestas futuras (Baddeley, 1994). Se puede visualizar la relación entre ambos términos teniendo en cuenta que, por un lado, el aprendizaje se define básicamente como el proceso por el cual se adquiere nueva información y, por otro lado, la memoria se entiende como la persistencia del aprendizaje en un estado al que se puede acceder posteriormente (Squire, 1987). Es decir que el aprendizaje sería la adquisición de conocimiento, mientras que la memoria sería el almacenamiento de la representación interna del tal conocimiento. Así, el aprendizaje haría referencia a los cambios relativamente permanentes debidos a la experiencia pasada y la memoria sería una parte esencial del proceso de aprendizaje, ya que permite recuperar la experiencia pasada en nuestro cerebro (Baddeley, 1994). Es decir que, sin la memoria, las experiencias se perderían y no podríamos beneficiarnos de la experiencia previa. Anderson (2000) plantea dicha relación de manera clara al definir el aprendizaje como el proceso por el cual ocurren cambios duraderos en el potencial conductual como resultado de la experiencia y la memoria como el registro de la experiencia que subyace al aprendizaje.



**Fig. 5.** *La persistencia de la memoria*, 1931 (izquierda) y *La desintegración de la memoria*, 1952-4 (derecha) de Salvador Dalí.

La comprensión del funcionamiento y las bases de la memoria tiene una larga tradición, siendo todavía en la actualidad un desafío fundamental de la investigación en Neurociencia. Desde que Ribot (1882) formulase la ley de regresión, según la cual las memorias más antiguas son más estables y están menos sujetas a interferencia que las adquiridas más recientemente, se ha desarrollado un cuerpo de investigación que ha sentado las bases para el estudio científico del aprendizaje y la memoria (Ferrer, 2008). A partir de ese momento destacan dos autores que, aunque mantuvieron una posición antagónica en cuanto a la concepción y forma de estudio de la memoria, constituyen un pilar fundamental en los inicios de su estudio científico. **Hermann Ebbinghaus** (1879), defensor de una visión asociacionista de la memoria, fue pionero en la investigación científica de la memoria y aplicó el método científico-experimental al evaluarla consistente en el uso de sílabas sin sentidos como material y la cuantificación del aprendizaje por el número de repeticiones o el tiempo invertido en el estudio. Descubrió la curva del olvido, planteando que mientras que la tasa de aprendizaje es lineal, la del olvido no, ya que se olvida a mayor velocidad en las primeras horas posteriores al aprendizaje que en los días siguientes (Santamaría, 2001). Sin embargo, fue criticado debido a la artificialidad y a la falta de validez ecológica de sus estudios. Precisamente, por este motivo, **Frederic C. Bartlett** (1930) criticó el trabajo de Ebbinghaus y se decantó por una visión construccionista de la memoria, estudiándola en ambientes naturales y utilizando el método de la reconstrucción serial. Asimismo, Bartlett interpretó la memoria como un proceso esquemático y constructivo, desarrollando el concepto de esquema

como una organización activa de las experiencias pasadas del sujeto (Santamaría, 2001). No obstante, llevó su teoría hasta un extremo tan complejo que fue criticado por la dificultad de replicabilidad de sus experimentos. Ambas perspectivas muestran un intento por ser rigurosas: mientras que Ebbinghaus defiende la simplicidad en el laboratorio con el fin de cumplir con la validez causal o interna, Bartlett aboga por la complejidad en el medio natural con el objetivo de cumplir con la validez ecológica o interna.

### **1.3.2. Fases de la memoria: clasificación en base al curso temporal**

En función del tiempo durante el que la información adquirida es accesible al recuerdo, se han distinguido varias fases de la memoria, clasificación desarrollada a partir de los conocidos modelos "multi-almacén" debido a que proponen la existencia de distintos almacenes de memoria en función de la capacidad y la duración del almacenamiento. Los conceptos que se presentan a continuación concentran un alto grado de consenso en el área de la neurociencia conductual por haberse formulado a partir de numerosos datos empíricos obtenidos a través de la aplicación de diferentes técnicas en distintas especies animales (DeZazzo y Tully, 1995). A partir de estos datos, se ha creado una clasificación que parte de la idea antigua de que la formación de la memoria sigue una progresión temporal tras producirse el aprendizaje, desde una forma inicial, breve e inestable, hasta otra forma final, duradera y estable.

En primer lugar, la **memoria sensorial o inmediata** se forma directamente a través de la información registrada por los sentidos,

en forma de copias exactas de los estímulos externos. Tiene capacidad para registrar una alta cantidad de información multi-sensorial de forma simultánea durante un lapso de tiempo relativamente corto, entre los 200 y los 500 milisegundos. Gracias a este breve registro sensorial, se puede percibir y organizar la información que entra desde el exterior, dotando de sentido a lo que ocurre en el mundo y, en función de lo que la atención seleccione, como si de un filtro se tratase, se da paso al siguiente sistema (Varela-Ruiz y cols., 2005). Por otro lado, los principales sentidos que trabajan en la memoria sensorial son la visión y el oído, por lo que las memorias sensoriales más estudiadas han sido la memoria sensorial icónica que almacena copias visuales o iconos y ecoica que almacena copias auditivas o ecos (Neisser, 1967).

En segundo lugar, la **memoria a corto plazo** retiene temporalmente la información recientemente adquirida, siendo un sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo (de 15 a 30 segundos). La información es interpretada y organizada para acceder a la memoria a largo plazo o decaer paulatinamente. Así, es una memoria frágil y transitoria que se desvanece rápidamente y que resulta muy vulnerable ante cualquier interferencia (Morgado, 2005; Sandi y cols., 2001). Un tipo especial de memoria a corto plazo es la **memoria de trabajo**, del inglés *working memory*, concepto que surge como consecuencia de la insuficiencia de los constructos de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo para explicar determinados hallazgos científicos como, por ejemplo, el mecanismo por el cual el material almacenado en la memoria a corto plazo pasa a formar parte de la memoria a largo



plazo (Passig, 1994). Aunque existen desacuerdos respecto al lugar en el cual encuadrar este tipo de memoria, hay un consenso respecto al hecho de que es un sistema que permite tener presentes en la mente y utilizar un determinado número de representaciones mientras se desarrolla una tarea (Etchepareborda y Abad-Mas, 2005). Debido a dicha naturaleza activa es también conocida como memoria operativa o funcional.

En último lugar, la **memoria a largo plazo** retiene una gran cantidad de información sobre las experiencias de la vida y los conocimientos acerca del mundo durante periodos prolongados de tiempo, pudiendo variar su extensión y llegar a mantenerse desde varios meses, hasta años e incluso toda la vida. Así pues, su característica esencial es su persistencia en el tiempo, siendo estable y duradera (Sandi y cols., 2001). Sin embargo, presenta limitaciones con respecto al acceso a la información (Ruiz-Sánchez y cols., 2006), pudiendo verse impedida su recuperación por causas como la interferencia o la ausencia del estímulo específico.

### **1.3.3. Tipos de memoria: clasificación en base al contenido**

Existen diversos tipos de clasificación en base al contenido de la información almacenada. Un caso paradigmático que ha guiado el entendimiento de la memoria humana y que, por ello, ha permitido dotar de información relevante para el establecimiento de clasificaciones ha sido el famoso caso del paciente HM (Carlson, 2014; Kandel y cols., 1997; Laroche, 1999; Morgado, 2005).

Este paciente sufría una grave amnesia anterógrada tras practicarle una lobectomía temporal medial como tratamiento para

las convulsiones y crisis epilépticas que sufría desde que fue atropellado por un ciclista a los 9 años de edad. Aunque el paciente HM superó la epilepsia, las secuelas de la operación le convirtieron en una especie de prisionero de su presente, ya que era incapaz de generar nuevos recuerdos (amnesia anterógrada), sin que se viese tan alterada su capacidad para recordar acontecimientos que habían ocurrido anteriormente a la lesión (amnesia retrógrada). Este paciente ha sido tomado como modelo experimental de memoria humana y se ha descubierto que, a pesar de que no era capaz de recordar nuevos hechos, podía aprender nuevas habilidades sensorio-motoras, aunque no fuese consciente de ello. Por ejemplo, en la tarea de dibujar a través de un espejo (aprendizaje motor), se observó que su rendimiento mejoraba cada día, a pesar de que el paciente no recordaba haber realizado dicha prueba. La selectividad de la amnesia del paciente HM sugirió la distinción, ya realizada por Squire (1987), entre una memoria declarativa, encargada de almacenar datos y sucesos, y una memoria no declarativa, relacionada con el desarrollo de habilidades y de otros procesos.

La **memoria declarativa** es una memoria explícita, intencional o relacional que requiere siempre un registro consciente y un acto deliberado de evocación. Codifica información sobre acontecimientos biográficos y sobre el conocimiento de hechos. Puede adquirirse mediante una sola experiencia e inducirse su recuerdo intencionadamente o mediante el contacto con algún estímulo evocador. Implica la asociación entre estímulos simultáneos en relación a una situación ocurrida en un tiempo y lugar determinados, proporcionando familiaridad (consciencia) a los sucesos ya

acontecidos (Thompson y Kim, 1996). Anatómicamente, depende de estructuras y proyecciones ubicadas en el lóbulo temporal medial, siendo el hipocampo la zona cerebral más implicada en este tipo de memoria (Carlson, 2014). Se subdivide en memoria episódica y semántica.

- La **memoria episódica** almacena los acontecimientos experimentados a lo largo de la vida del sujeto, los cuales se organizan de acuerdo a su temporalidad. Representa una memoria autobiográfica para los eventos que tuvieron lugar en un determinado contexto espacial y temporal (Duka y cols., 1996; Klein, 1994; Squire y cols., 1993), permitiendo recordar sucesos específicos, orientarse espacio-temporalmente e incrementar la información contenida en la memoria semántica. Se basa en la actividad del circuito neural que uniría los lóbulos temporales al hipocampo y a los lóbulos frontales (Baddeley, 1994).

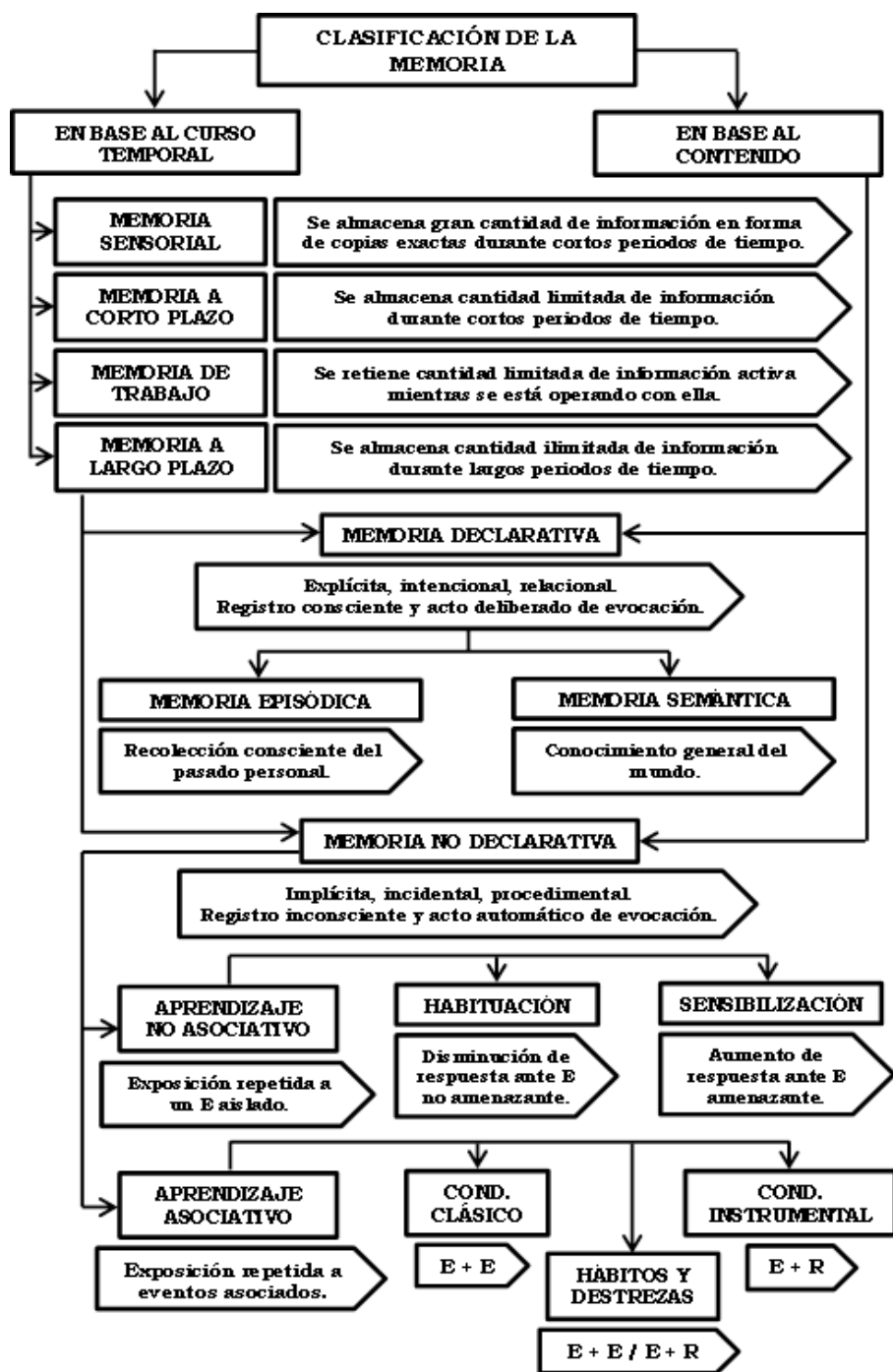
- La **memoria semántica** recopila información sobre el conocimiento general del mundo (Nyberg y Tulving, 1996), siendo el sujeto consciente de que es conocedor de dicha información. Es más genérica que la memoria episódica, no siendo necesario guiarse por "marcas temporales" para su evocación, lo que significa que el conocimiento se tiene independientemente del momento de adquisición. En tareas de recuperación de información semántica, se ha observado la activación de la corteza prefrontal lateral izquierda y temporal anterior cuando un objeto es reconocido, nombrado, imaginado y cuando se leen y contestan preguntas acerca de él (Martin y Chao, 2001).

La **memoria no declarativa** es una memoria implícita, incidental o procedimental caracterizada por su automatismo; es decir que ni su adquisición ni su recuerdo requieren de la realización de un acto intencional, estando relacionada con formas básicas de aprendizaje. Su establecimiento no es inmediato, sino progresivo y lento, mediante ensayos reiterados, los cuales permiten la acumulación de destreza y automatización de forma proceso gradual (Eichenbaum, 1997; Kandel y Hawkins, 1992; Squire y Zola, 1996). No obstante, no permite el acceso explícito a los contenidos del conocimiento base, no habiendo consciencia del aprendizaje logrado. La forma de comprobar que se ha producido es a través de la actuación y, normalmente, se traduce en un aumento en el rendimiento. En contraste con la memoria declarativa, parece no depender del hipocampo y sí del neocórtex, como los circuitos del cerebelo y de la amígdala (Squire, 1992). Se distingue entre aprendizaje asociativo y no asociativo (Squire y cols., 1993).

- El **aprendizaje no asociativo** se produce cuando se expone a un sujeto, una o repetidas veces, a un solo tipo de estímulo, adquiriendo experiencia y no teniendo necesariamente una relación temporal. Así, tiene lugar una modificación conductual relativamente permanente motivada por una exposición repetida a un determinado estímulo aislado. Incluye los fenómenos de habituación y sensibilización. La **habituación** consiste en la reducción de la magnitud de una respuesta inducida por un estímulo, ante la repetición de éste (Sandi y cols., 2001); es decir que una respuesta refleja disminuye ante la presentación repetida de un estímulo inocuo. La **sensibilización** es la potenciación de una respuesta ante diversos estímulos, como

consecuencia de la aplicación de una estimulación aversiva o nociva (Sandi y cols., 2001); es decir que una respuesta refleja se intensifica ante estímulos moderados que sean precedidos de otros intensos o nocivos.

- El **aprendizaje asociativo** se produce a través del establecimiento de asociaciones entre eventos, bien entre un estímulo y una respuesta, entre una respuesta y sus consecuencias o bien entre dos o más estímulos. Transmite los conocimientos básicos para el desempeño en una tarea determinada. Por un lado, se ha estudiado dos paradigmas experimentales de referencia: el **condicionamiento clásico** basado en el aprendizaje de una relación entre dos estímulos y el **condicionamiento operante** o instrumental centrado en el aprendizaje de una relación entre un estímulo y la respuesta de un organismo (Kandel y cols., 1997; Klein, 1994). Ambos paradigmas permiten, a través de ensayos sucesivos, el aprendizaje de un tipo de conducta ante la presentación de un determinado estímulo. Por otro lado, se han considerado los **hábitos** y las **destrezas** como procesos pertenecientes a la memoria no declarativa (Squire y Zola, 1996; Thompson y Kim, 1996). Mientras que los hábitos se constituyen como disposiciones y tendencias que guían la conducta y se desarrollan a partir de una determinada situación; las destrezas representan procedimientos motores, perceptivos y cognitivos, que sirven para actuar en el mundo (Squire y cols., 1993).



**Fig. 6.** Clasificación de la memoria en base al curso temporal y al contenido (adaptado de Squire y Zola, 1996).

Aunque hábitos y destrezas se pueden adquirir de manera consciente y voluntaria en un primer momento, con la práctica, estas conductas acaban siendo automáticas, inconscientes y precisas (Morgado, 2005).

Por tanto, la memoria es la capacidad que tiene todo organismo vivo de modificar su conducta a partir del aprendizaje, a través de la retención en el tiempo de la información aprendida. Dicha retención puede basarse en procesos asociativos inconscientes, sensaciones o impresiones, ideas o conceptos así como en aquellos procesos más conscientes. Más allá del tipo de procesos en los que se sustente la memoria, el resultado siempre será el mismo: que aquello que se ha aprendido tenga un valor para la supervivencia del organismo.

## **1.4. ESTUDIANDO LA MEMORIA EN ANIMALES**

### **1.4.1. Memoria emocional**

Por memoria emocional se entiende el sistema que permite fijar recuerdos inconscientes a partir de las emociones, siendo una forma de memoria no declarativa más dependiente de amígdala al ser fruto de la asociación entre un evento y la emoción que genera. De forma complementaria, por memoria de una emoción se entiende el sistema que posibilita fijar recuerdos conscientes de una situación emocional, siendo una forma de memoria declarativa más dependiente de hipocampo al ser el resultado de acontecimientos experimentados en nuestra vida que se pueden explicitar. Así, memoria emocional y memoria de una emoción funcionan de forma complementaria, ya

que la primera hace que los recuerdos emocionales eliciten reacciones fisiológicas inconscientes e implícitas, mientras que la segunda permite que estén disponibles y accesibles de forma consciente.

En animales, la memoria emocional se estudia a través de modelos de condicionamiento de miedo en los cuales los animales aprenden a predecir la ocurrencia de eventos aversivos y a actuar de forma apropiada frente a las amenazas (Izquierdo y cols., 2016). Este tipo de aprendizaje se ha estudiado principalmente a través de modelos de miedo condicionado basados en el condicionamiento clásico y a través de modelos de evitación activa o pasiva basados en el condicionamiento instrumental (Domjam, 2007). En todos los casos, se hace uso de una descarga eléctrica como estímulo aversivo. En los procedimientos de evitación, el animal debe evitar un evento negativo a través de su conducta: en el caso de la evitación activa, el animal debe actuar y, en el caso de la evitación pasiva o inhibitoria (IA, *Inhibitory Avoidance*), debe dejar de actuar, para impedir que el suceso aversivo se presente. Esta última ha sido la principal prueba de memoria utilizada en la presente Tesis Doctoral.

La prueba de IA es un paradigma clásico en el estudio de las bases biológicas de los procesos de aprendizaje y memoria en animales. De forma más específica, es uno de los modelos más utilizados como método instrumental de miedo condicionado (Gold, 1986; Izquierdo y cols., 2006) y, por ello, como método para evaluar memoria emocional en animales. Es una prueba unidireccional que permite evaluar el aprendizaje adquirido y la memoria, condicionando



al animal con un estímulo aversivo y realizando la valoración posterior del recuerdo de dicha experiencia (Navarrete y cols., 2008). De este modo, consiste generalmente en un ensayo en el que el animal recibe un estímulo aversivo en forma de choque eléctrico cuando realiza una conducta. Tras un periodo de tiempo establecido previamente, se comprueba si el animal ha aprendido a eliminar dicha conducta (Bammer, 1982; Bures y cols., 1983). Así, la expresión "evitación inhibitoria" es empleada para describir una tarea en la que el animal aprende a evitar un acontecimiento nocivo, inhibiendo una conducta concreta que suele ser una actividad innata o de un hábito adquirido.

Clásicamente se han utilizado dos tipos de tareas de IA: la "latencia de bajada" (step-down) y el "pasar al otro lado" o "cruzar a través de" (step-through) (recogido en Bures y cols., 1983). A continuación, se detalla la segunda variante, ya que es la que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral. Esta técnica fue desarrollada por Jarvick y Kopp y, posteriormente, modificada por King y Glasser (recogido en Bures y cols., 1983), basándose en el hecho de que, de forma innata, los roedores evitan la luz intensa y prefieren la luz tenue, por lo que, cuando tienen la posibilidad de elegir entre un espacio iluminado y blanco frente a otro oscuro y negro, eligen permanecer en el segundo tipo de espacio. En este procedimiento, se utiliza una caja compuesta por dos compartimentos de las mismas dimensiones comunicados mediante una puerta corredera que se abre automáticamente. Mientras que uno de los compartimentos es blanco y está iluminado con una bombilla, el otro compartimento es negro y permanece a oscuras. Este modelo permite una medición exacta desde que se deja al animal en el lado iluminado hasta que

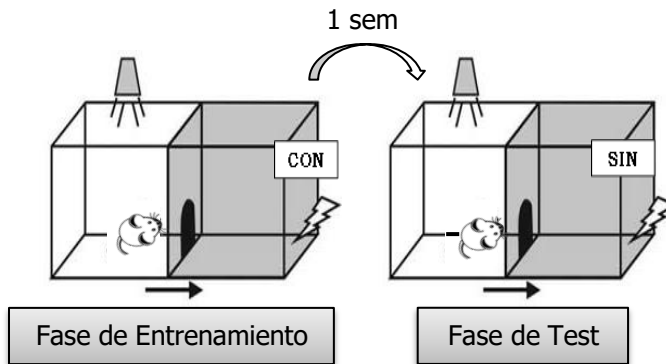
penetra en el lado oscuro y recibe el shock. La consolidación y recuerdo se miden situando de nuevo al animal en el compartimento iluminado y midiendo el tiempo que tarda en cruzar al lado oscuro.

El procedimiento se desarrolla en dos fases: entrenamiento y test.

- En la **fase de entrenamiento**, se produce el aprendizaje o adquisición de la tarea. Se coloca al animal en el compartimento iluminado o de salida con la puerta corredera cerrada, permitiéndole explorar y adaptarse al aparato durante un periodo previamente establecido de 90 segundos (variable según autores). Tras este tiempo de adaptación, se abre la puerta que comunica los dos espacios y, debido a su preferencia natural por los espacios oscuros, el animal cruza rápidamente al otro compartimento. Cuando el animal tiene sus cuatro patas en el compartimento oscuro, la puerta se cierra y se le administra una descarga eléctrica. La latencia de cruce (en segundos) es medida mediante un contador acoplado al aparato y registrada, tras lo cual el animal es devuelto a su jaula.

- En la **fase de test**, se evalúa la retención o consolidación de la tarea. Tras un periodo de tiempo de una semana (variable según autores), se introduce de nuevo al animal en el aparato, volviendo a aplicar el mismo procedimiento que en la fase de entrenamiento, pero sin choque eléctrico. La fase de test termina cuando el animal cruza al compartimento oscuro o cuando transcurre el periodo de tiempo máximo establecido previamente de 300 segundos, aunque el animal no haya cruzado. Se mide y registra la latencia de cruce y se devuelve al animal a su jaula. El resultado esperado es que los

ratones tarden más tiempo en cruzar (llegando a agotar el tiempo máximo) al compartimento oscuro en la fase de test respecto a la fase de entrenamiento. La figura 7 muestra el protocolo de la tarea de IA empleado en la presente Tesis Doctoral.



**Fig. 7.** Protocolo de IA aplicado en la presente Tesis Doctoral.

### 1.4.2. Memoria espacial

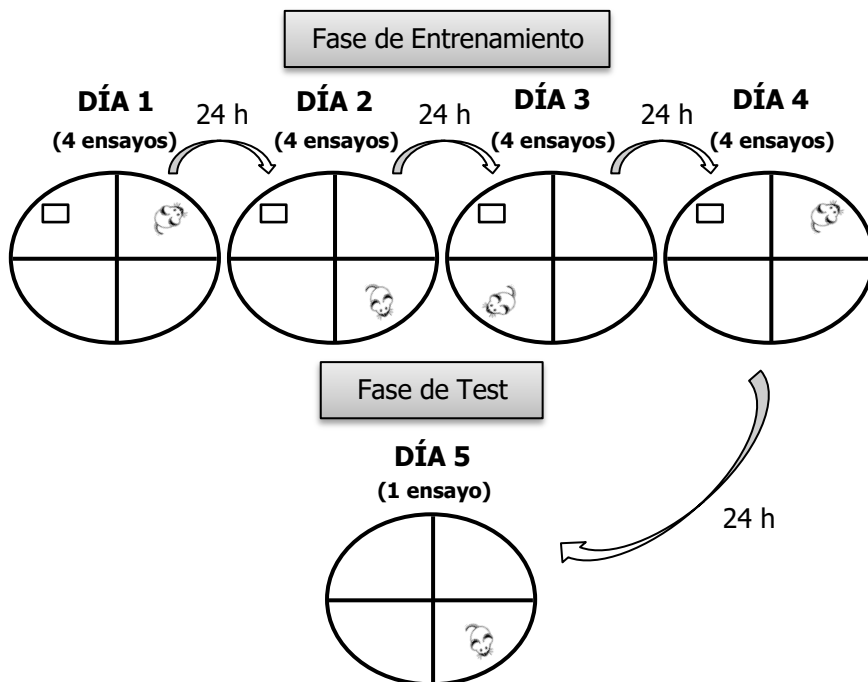
La memoria espacial hace referencia a aquella parte de la memoria dedicada a almacenar los datos sobre una determinada localización, así como sus asociaciones con otras localizaciones, lo cual posibilita la orientación del organismo en el espacio. La navegación espacial es importante para muchos de los repertorios conductuales de los animales: búsqueda de comida, conducta parental y reproductiva, regreso al nido o huida a un lugar seguro (Vicens y cols., 2003). Básicamente, la memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels y cols., 2001). Esta memoria puede

ser evaluada mediante modelos animales en los que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible.

Una de las pruebas más comúnmente utilizadas por los investigadores para el estudio de la memoria espacial en roedores es el laberinto de agua (MWM, del inglés *Morris Water Maze*) diseñado por R.G. Morris (Morris, 1984). La versión tradicional del MWM consiste en que los animales nadan desde diferentes puntos de salida en el perímetro de una piscina circular hasta encontrar una plataforma móvil oculta en el agua. El procedimiento se desarrolla en dos fases: entrenamiento y test.

- En la **fase de entrenamiento**, se produce el aprendizaje o adquisición de la tarea y consiste en una sesión diaria compuesta por 4 ensayos (variable según autores) a lo largo de varios días (variable según autores). Cada ensayo consiste en introducir al animal con el hocico apuntando hacia las paredes de la piscina para que busque la plataforma durante 60 seg (variables según autores). En caso de que no la encuentre se le coloca entre 20 ó 30 seg (variable según autores) en la plataforma. Se considera que un animal ha encontrado la plataforma cuando permanece en ella 5 ó 10 seg. Después se retira al animal de la plataforma y se le deja descansar brevemente antes de iniciar el siguiente ensayo. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma depende de la utilización de las claves que rodean a la piscina, siendo necesarias al menos dos señales extra-laberinto para localizar la meta invisible (Prados y Trobalon, 1998).

• Transcurridas 24 horas después de la fase de adquisición, se realiza la **fase de test**, una prueba final de retención o «ensayo de prueba» sin plataforma durante 60 s (variable según autores). Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que si el animal ha aprendido nadará más tiempo en el cuadrante meta, donde previamente estaba situada la plataforma. La figura 8 muestra el protocolo de la tarea de MWM empleado en la presente Tesis Doctoral.



**Fig. 8.** Protocolo de la tarea de MWM aplicado en la presente Tesis Doctoral.

Las medidas conductuales más utilizadas son la latencia de escape en los ensayos de adquisición (tiempo que transcurre hasta que alcanza la plataforma) y el porcentaje de tiempo en el cuadrante meta durante la prueba final. El resultado esperado es, en el caso de

la adquisición, que se observe una curva de aprendizaje a lo largo de las sesiones de adquisición, de tal forma que las latencias de escape sean menores conforme pasen los días y, en el caso de la retención, que los ratones permanezcan un mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante meta.

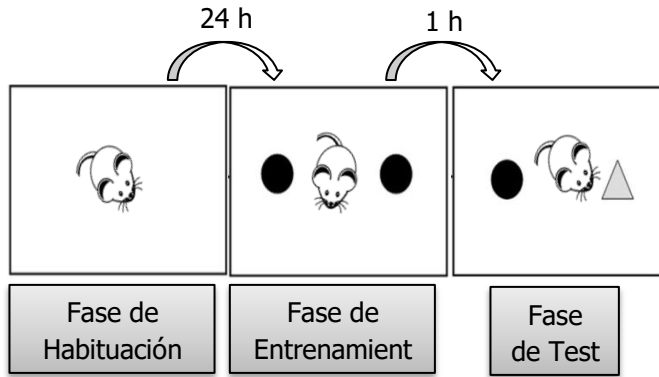
### **1.4.3. Memoria de reconocimiento**

Se conoce por memoria de reconocimiento la habilidad para juzgar si un ítem recientemente encontrado, sea un objeto o un episodio, ya había sido previamente experimentado (Squire y cols., 2007). Este tipo de memoria se ha definido como la capacidad para discriminar la familiaridad de las cosas previamente encontradas en el ambiente (Cassaday y Rawlins, 1997; Mumby, 2001) y ha sido reconocida por diversos autores como un tipo de memoria episódica, en la medida en que los organismos (incluyendo animales no humanos) son capaces de identificar relaciones temporales (cuándo), estimulares (qué) y espaciales (dónde), que les permiten formar un sistema de memoria integrado relacionado con un evento específico (Aggleton y Brown, 1999; Dere y cols., 2006).

La tarea de reconocimiento de objetos (NOR, del inglés *Nobel Object Recognition*) basada en el paradigma etológico de preferencia por la novedad ha sido ampliamente utilizada como modelo para evaluar este tipo de memoria de reconocimiento en roedores (Ennaceur, 2010). Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los roedores a explorar nuevos objetos y ambientes y compararlos con otros que les son familiares. Así, al exponer al ratón a una serie de objetos se espera a que éste los explore y se mide el tiempo de

exploración de los mismos (Navarrete y cols., 2008). La prueba se realiza en un campo abierto que situamos en una habitación homogéneamente iluminada y con objetos que deben ser de similar textura, color y tamaño, pero de distinta forma. Se lleva a cabo en tres fases: habituación, entrenamiento y test.

- En la primera **fase de habituación**, se coloca el animal en el campo abierto sin ningún objeto y se deja transcurrir un tiempo de 30 minutos (variable según autores) para que se familiarice con el entorno.
- A las 24 horas se realiza la **fase de entrenamiento**, para lo cual se colocan dos objetos idénticos (objetos familiares) en distinta posición (posición 1 y posición 2) y se deja el animal en el interior de la caja durante 10 minutos (variables según autores).
- Finalmente, tras 1 hora, en la **fase de test** o retención se deja uno de los objetos familiares, se cambia el otro por uno nuevo y se deja el animal en el interior de la caja durante 5 minutos. La figura 9 muestra el protocolo de la tarea de NOR empleado en la presente Tesis Doctoral.



**Fig. 9.** Protocolo de la prueba de NOR aplicado en la presente Tesis Doctoral.

Se puede medir memoria a corto plazo cuando la fase de retención se realiza entre 15 y 60 minutos después del entrenamiento y/o memoria a largo plazo cuando se realiza entre 2 y 24 horas después. Para ello, se tiene en cuenta el tiempo de exploración de los objetos familiar y nuevo, entendiendo el tiempo de exploración como el período durante el cual el animal olisquea o toca el objeto con las patas delanteras a una distancia menor o igual a 1 cm. El resultado esperado es que los ratones exploren durante más tiempo el objeto nuevo respecto al familiar.

## **1.5. ¿CÓMO AFECTA EL ESTRÉS A LA MEMORIA?**

Históricamente, cognición y emoción han sido considerados procesos independientes y en cierta medida contrapuestos. Sin embargo, gracias a las influyentes aportaciones de científicos y neurólogos como Joseph LeDoux y Antonio Damasio, en la



actualidad, se considera que las emociones están íntimamente vinculadas a la cognición y precisamente uno de los elementos básicos que conforma la cognición es la memoria (Belmonte, 2007). De hecho, existen centros, corticales y subcorticales que se comunican a través de determinadas sustancias que, en última instancia, van a determinar una valoración subjetiva consciente e inconsciente de la experiencia, lo cual finalmente repercutirá en la forma en que esta última quedará registrada en nuestro cerebro.

### **1.5.1. Neuroanatomía de la memoria y el estrés**

Teniendo en cuenta el contexto en el cual se encuadra la presente Tesis Doctoral, hay tres estructuras, el hipocampo y la amígdala a nivel subcortical y la corteza prefrontal (CPF) a nivel cortical, que tienen un papel relevante en la memoria y todas ellas son áreas que se ven significativamente afectadas por los sucesos estresantes y que participan activamente en los procesos de valoración y almacenamiento de dichos sucesos estresantes. De hecho, cada una de estas tres regiones cerebrales contribuye en mayor o menor medida en el desarrollo de las disfunciones cognitivas y afectivas propias de los trastornos psiquiátricos producidos por el estrés (Chattarji y cols., 2015).

El **hipocampo** es una estructura cerebral esencial en el conocido sistema límbico que ha sido asociada a diversos tipos de memoria, fundamentalmente declarativa o explícita, espacial y asociativa. En general, las lesiones del hipocampo, tanto en animales como en humanos, han sido relacionadas con amnesia para las memorias que necesitan claves contextuales (Rosenbaum y cols., 2001). La

importancia de la integridad del hipocampo para la memoria explícita se ha visto avalada por la investigación con seres humanos (Kalat, 2014) a través de casos tan paradigmáticos como el del paciente HM, quien, tras la lesión del hipocampo experimentó una pérdida de la habilidad para recordar o almacenar a largo plazo nueva información de tipo declarativo, mientras que conservó otras funciones cognitivas (Muñoz, 2007) y también por los estudios realizados con primates mediante pruebas como la tarea de correspondencia o de no-correspondencia demorada con la muestra (Kalat, 2014) las cuales pueden verse fuertemente afectadas por lesiones en el hipocampo (Zola y cols., 2000).

Debido a su alta concentración de GRs, el hipocampo ha sido implicado en los procesos de estrés y, por ello, en la regulación de la memoria emocional. Así, el hipocampo es considerado como una pieza clave para integrar los componentes cognitivo, hormonal y neuroquímico de la respuesta de estrés, siendo uno de los elementos decisivos en la finalización de la misma a través de su feedback negativo que inhibe al eje HHA, lo cual es totalmente adaptativo a corto plazo (McEwen y Sapolsky, 1995). Sin embargo, niveles elevados de GCs durante periodos prolongados de estrés tienen un efecto negativo sobre el hipocampo que se traduce en una disminución de las divisiones dendríticas, una alteración de la estructura sináptica terminal y una inhibición de la regeneración neuronal (Yehuda y cols., 1990). De hecho, esta atrofia hipocampal ha sido asociada con la depresión y explicaría los problemas de memoria propios de estos trastornos conductuales (Sheline y cols., 1999) y podría ser el resultado del incremento de la muerte neuronal

por niveles anómalos de GCs en determinadas células del hipocampo (Sapolsky, 2000). En el mismo sentido, se ha visto que el estrés crónico en animales suprime la producción de nuevas neuronas en el hipocampo, lo cual se traduce en una reducida arborización, una disminución de la densidad dendrítica, así como del crecimiento y de la forma de las espinas sinápticas en neuronas de varias regiones hipocampales (ver Alkadhi, 2013; Qiao y cols., 2016). En relación a la tarea de IA, en tanto que modelo animal de memoria emocional, se sabe que la integridad del hipocampo es esencial para que se produzca aprendizaje, ya que su inactivación mediante la administración de tetrodotoxina o lidocaína (un anestésico local, bloqueador del canal de sodio), impide su consolidación (Ambrogio Lorenzini y cols., 1999). De forma más concreta, parece ser que la región hipocampal CA1 es crucial para que se produzca este tipo de aprendizaje emocional (ver Izquierdo y cols., 2016). Precisamente, está ampliamente aceptado que el procesamiento de la información procedente de la tarea de IA se produce a nivel de esa misma área CA1 del hipocampo, siendo los cambios comparables a nivel electrofisiológico y bioquímico a los que se producen tras la potenciación a largo plazo (Izquierdo y cols., 2016).

El hipocampo ha sido fuertemente asociado a la memoria espacial y, especialmente, a la orientación espacial. En esta línea, el déficit que presentaba el paciente HM después de su operación quirúrgica al no poder realizar nuevos aprendizajes como el recuerdo del nuevo domicilio de su familia tras trasladarse a otro lugar de residencia, ha sido corroborado por estudios con roedores a través de dos tipos de laberintos, el laberinto radial y el MWM. En ambos casos,

los animales deben establecer relaciones adecuadas entre distintos elementos visuales basados en claves espaciales para llevar a cabo una ejecución adecuada y conseguir la recompensa. Sin embargo, los animales con daños hipocampales actúan de forma azarosa, olvidando la información espacial clave (Kalat, 2014).

El papel del hipocampo en las tareas de memoria de reconocimiento en roedores ha sido objeto de debate (Ainge y cols., 2006; Broadvent y cols., 2004; Iordanova y cols., 2009; Mumby, 2001). De hecho, se ha llegado a plantear como una de las estructuras que controlan los dos tipos básicos de procesos que incluye la memoria de reconocimiento: el de recolección por un lado, que nos permite recordar detalles específicos del episodio de aprendizaje y el de familiaridad por el otro, que se refiere a la capacidad para recordar un elemento presente en el contexto de aprendizaje sin ser capaces de identificar otro tipo de información del episodio (Smith y cols., 2011). Sin embargo, aunque el hipocampo es una región que está relacionada con el reconocimiento de objetos, se han encontrado otras zonas temporales como la corteza perirrinal que pueden ser incluso más importantes (Gómez-Chacón, 2014). De hecho, la lesión en las cortezas perirrinal, parahipocámpica y entorrinal sin afectar al hipocampo subyacente produce una mayor deficiencia en el almacenamiento de memoria y el reconocimiento de objetos, que las que provocan las lesiones selectivas del hipocampo que no afectan a la corteza que lo recubre (Luria, 1977; Warrington y McCarthy, 1994).

Por tanto, el hipocampo funciona como (Sandi y cols., 2001): 1) un almacén transitorio de la información adquirida de tipo episódico hasta ser transferida a la corteza cerebral; 2) un facilitador de los procesos de almacenamiento de la información procesada en determinadas áreas corticales, construyendo una huella de memoria y permitiendo su consolidación; y 3) un integrador de estímulos elementales y de elementos discontinuos no superpuestos en el espacio, en el tiempo o en ninguna de estas dos modalidades.

La **amígdala** es una estructura perteneciente al sistema límbico subcortical que incluye un conjunto de núcleos considerados como componentes esenciales de la red cerebral emocional (LeDoux, 1995). De hecho, se ha establecido una potente conexión entre la lesión de la amígdala y la modulación emocional de la memoria (McEwen, 2007), habiendo numerosos experimentos que han demostrado un bloqueo del recuerdo emocional tras la lesión de esta estructura (McGaugh, 2000; McGaugh y cols., 1996; Roozendaal, 2000). Así, la amígdala es clave en la expresión y experiencia emocionales y, por ello, es vital para la consolidación de la memoria emocional (para una revisión, ver Izquierdo y cols, 2016).

En relación al estrés, se ha comprobado que la lesión de la amígdala en animales produce un bloqueo de la respuesta de miedo ante estímulos amenazantes, no sólo a nivel conductual, sino también hormonal. De manera inversa, la estimulación electrofisiológica de la amígdala produce respuestas de miedo y agitación (Sandi y cols., 2001). En general, se apoya la hipótesis según la cual el mejor recuerdo a largo plazo de eventos estresantes, en comparación con

eventos neutros, refleja la actividad moduladora de la amígdala sobre los procesos de consolidación llevados a cabo en el hipocampo a través de la activación de las hormonas del estrés (McGaugh, 2004). Este efecto positivo sobre los eventos con carga emocional vendría explicado por el efecto que tiene la CRF y los GCs sobre la amígdala, ya que se produce un incremento en el estado de alerta que favorece el aprendizaje. Sin embargo, un exceso de estrés puede llegar a impedir el recuerdo (Joseph–Bravo y De Gortari, 2007).

Cuando se habla de amígdala y de procesos cognitivos, necesariamente se está haciendo referencia a memoria inconsciente o implícita. Así, la amígdala desempeña un papel fundamental en la expresión y experiencia de las emociones, no sólo por la influencia que ejerce sobre el hipocampo sino también dada la relativa independencia de los hemisferios cerebrales y de la posibilidad de funcionar como un sistema unilateral (Palmero, 1996). De hecho, se sabe que la amígdala tiene un papel clave sobre la regulación de la memoria emocional que, precisamente, depende de sus proyecciones neurales, directas e indirectas, hacia otras regiones cerebrales, así como de su influencia directa sobre la liberación de neurotransmisores, como la NA, y de las hormonas del estrés, los GCs principalmente, por medio del eje HHA (Joëls y Baram, 2009), teniendo dichas sustancias un efecto sobre estructuras asociadas a la consolidación y almacenamiento de la información, como el hipocampo o la CPF (Hermans y cols., 2014). De forma más específica, existe bibliografía que muestra que el núcleo basolateral (BLA) de la amígdala es considerado como el más importante para la modulación emocional de la memoria (McGaugh, 2000), regulando el

proceso de consolidación de la memoria a largo plazo de los eventos emocionalmente alertadores (para una revisión, ver Solís-Vivanco, 2012).

La prueba de IA, en tanto que un tipo de memoria emocional, ha sido utilizada para medir la implicación de la amígdala. De forma general, se ha visto que dicha estructura, aunque juega un papel fundamental en este y otros tipos de condicionamiento (Holahan y White, 2002; Riekkinen y cols., 1993; Wilensky y cols., 2000), no está directamente implicada en el aprendizaje en sí mismo, si no en la expresión de este tipo de memoria (Torras y cols., 2001), fundamentalmente a través de su núcleo BLA (Izquierdo y cols., 2006; Izquierdo y Medina, 1997; McGaugh, 2000; 2004). Así, la amígdala modularía la consolidación de la memoria que ocurre en otras estructuras extraamigdalares (McGaugh, 2000), comunicándose a través de su núcleo central (Roosendaal y cols., 1991; Sah y cols., 2003).

De esta forma, las relaciones funcionales entre la amígdala y otras regiones cerebrales, como el hipocampo y la CPF, para la consolidación de los eventos emocionales tienen implicaciones decisivas para comprender mejor el efecto que el estrés agudo y crónico puede tener sobre los procesos cognitivos en general y mnésicos en particular.

La **CPF** es un conjunto de áreas neocorticales ubicadas en la parte más anterior de los lóbulos frontales que envían y reciben proyecciones a nivel cortical y subcortical, habiéndosele asignado, además de las clásicas funciones ejecutivas, las del aprendizaje

asociativo, de búsqueda de información en la memoria a largo plazo y de su mantenimiento en la memoria de trabajo, entre otras (Grafman y cols., 1995). Así, por ejemplo, los pacientes con lesiones en la CPF tienen dificultades para recordar la secuencia temporal de los acontecimientos (Wood y cols., 2000). Sus conexiones con las áreas corticales motoras, además de las sensoriales, permiten la planificación y adaptación de la conducta a las informaciones que se reciben en ese momento (memoria de trabajo) (Arnsten, 1998; Eichenbaum y cols., 1996). De este modo, más que almacenar representaciones de eventos pasados o futuros, la CPF podría funcionar como una fuente extranemónica de control de ida y vuelta sobre las regiones corticales posteriores, que sí que almacenan representaciones diversas (Curtis y D'Esposito, 2003) con el fin de guiar en última instancia nuestro comportamiento hacia una meta (Wood y Grafman, 2003).

Respecto a su relación con el estrés, se ha visto que la CPF está implicada en la integración de la información sobre los estímulos estresantes. Al igual que el hipocampo, la CPF posee una alta cantidad de GRs, hecho que la convierte en una estructura clave en la regulación del eje HHA (Ulrich-Lai y Herman, 2009), sobre el cual se sabe que ejerce un efecto inhibitorio a modo de retroalimentación negativa. En este sentido, debido a sus conexiones con el hipocampo y la amígdala (Silvers y cols., 2016) y a que se ha visto que la valencia emocional o el arousal son estímulos capaces de activar de forma significativa la CPF (ver Berkers y cols., 2016) se ha llegado a afirmar que esta estructura juega un papel clave en el



condicionamiento de miedo y en la regulación de la memoria emocional (Sotres-Bayon y Quirk, 2010).

Precisamente, en cuanto a la memoria emocional, está ampliamente aceptado que varias regiones de la CPF están implicadas en la detección de amenazas y en los circuitos que median aprendizajes de miedo condicionado (Burghardt y Bauer, 2013; Milad y Quirk, 2012; Quirk y Mueller, 2008). Así, se sugiere que su parte más medial (CPFm) tendría un rol esencial en la regulación de la memoria de tipo aversivo (Frankland y cols., 2004, Quirk y cols., 2006, Santini y cols., 2004, Zhang y cols., 2011; Zhao y cols., 2005). Por ejemplo, Corcoran y Quirk (2007) demostraron que la inactivación de la CPFm deteriora la recuperación de las memorias de miedo aprendidas el día anterior. Asimismo, se ha visto que es fundamental la expresión de un determinado tipo de gen en esta estructura para la formación de la memoria de IA (Zhang y cols., 2011) y que la interferencia en la CPFm inmediatamente después del entrenamiento de IA conduce a déficits de retención (Holloway y McIntyre, 2011; Zhang y cols., 2011).

En relación a la memoria espacial, a pesar de que la mayoría de los trabajos proponen al hipocampo como mediador en distintos sistemas de memoria implicados en la conducta (Méndez-López, 2015), otros estudios enfatizan el papel de otras estructuras cerebrales como la CPF. Así, esta región modularía la percepción de la posición de un objeto en el espacio, pero también aquellas tareas de memoria espacial, tanto a corto como a largo plazo y memoria de trabajo o, incluso, tareas de memoria de referencia espacial evaluada

en el MWM (Méndez-López, 2015). En concreto, se ha planteado el papel de la CPFm en la organización de la conducta de orientación espacial, tanto en seres humanos como en primates no humanos (Méndez-López, 2015). A pesar de la polémica acerca de la existencia de CPF en mamíferos no primates, se ha confirmado que las ratas poseen CPFm que es comparable a la CPF en humanos (Méndez-López, 2015). Funcionalmente, esta área ha sido implicada en procesos atencionales, el control de respuestas autonómicas y la emoción, así como en el procesamiento de la información espacial y la flexibilidad conductual.

Por último, sabiendo que la memoria de reconocimiento es concebida como una especie memoria de trabajo, no es de extrañar que, por su participación en las funciones ejecutivas, la CPF esté implicada también en ella. En concreto, se ha visto que la CPFm participa en este tipo de memoria, lo cual se ha comprobado al emplear diferentes modalidades de memoria de reconocimiento de objetos en animales (Jacotte-Simancas, 2013). En general, se ha demostrado a través de manipulaciones farmacológicas un rol clave de la CPFm en los casos en los que se hace necesaria una integración de la información del objeto en sí mismo (el "qué") y de su localización espacial ("el dónde") (Morici y cols., 2015).

### **1.5.2. Neuroquímica de la memoria emocional y el estrés**

Las diferentes áreas cerebrales reciben múltiples aferencias de diferente naturaleza, estando implicadas una gran variedad de sustancias que influirán de forma decisiva en el papel que tenga cada estructura cerebral sobre la conducta de organismo. Aunque son

muchas las sustancias que median la acción del estrés sobre la memoria emocional, a continuación, se explicará de forma detallada los conocimientos en relación a los neurotransmisores 5-HT y NA así como las sustancias pro-inflamatorias prostaglandinas (PGs) debido a que los fármacos utilizados en la presente Tesis Doctoral han sido clomipramina e indometacina.

En general, el estrés parece producir una activación de los diferentes sistemas **neurotransmisores monoaminérgicos** (Avgustinovich y cols., 1999; Berton y cols., 1998; Blanchard y cols., 1991; Deutch y Roth, 1990; Devoino y cols., 2003; Thierry y cols., 1998; Tidey y Miczek, 1996; Watanabe y cols., 1995). Sin embargo, la exposición repetida a la situación de estrés puede finalmente dar lugar a una disminución de la actividad de dichos neurotransmisores (Flugge, 1996; 2000; Imperato y cols., 1993; Van Praag, 2004). Es precisamente el sistema monoaminérgico uno de los más afectados en los pacientes depresivos, habiéndose planteado la teoría monoaminérgica de la depresión, según la cual dicho trastorno mental se generaría como consecuencia de una deficiencia funcional de monoaminas en las regiones cerebrales encargadas de la regulación de los estados emocionales.

De manera específica se le dio prioridad a la neurotransmisión 5-HT debido a que este neurotransmisor está presente en una amplia variedad de regiones del SNC. En relación a la memoria y el aprendizaje, el estudio de tejidos cerebrales post-mortem de pacientes diagnosticados de Alzheimer muestra que las vías 5-HT juegan un importante papel en estos procesos cognitivos (Meneses y

Liy-Salmeron, 2012). De hecho, una queja bastante frecuente en los pacientes deprimidos es la relacionada con problemas de memoria (Schmitt y cols., 2006). Aunque es cierto que los estudios de laboratorio muestran resultados contradictorios respecto a la relación del sistema 5-HT con la memoria, hay que tener en cuenta las diferencias metodológicas entre estudios (Thompson, 1991). En relación a los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de 5-HT (ISRS), se sabe que éstos ejercen su acción antidepressiva a través de la desensibilización de los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> y de la consiguiente estimulación de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>2</sub> (Retamal, 2001). En este sentido, Zhang y cols. (2013) encontraron que la activación post-entrenamiento de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> potenció la consolidación y facilitó la extinción de la memoria emocional. Por otro lado, también se ha visto que cuando los receptores postsinápticos 5-HT<sub>1A</sub> son estimulados se produce un deterioro de la memoria emocional, mientras que cuando se estimula la variante presináptica de éstos se obtienen efectos pro-cognitivos en la tarea de IA (Stiedl y cols., 2015). Asimismo, se ha visto que el ISRS escitalopram restaura el aprendizaje de IA en ratas genéticamente deprimidas (Eriksson y cols., 2012).

La NA es otro neurotransmisor que permite establecer una clara relación entre memoria emocional y estrés. Las neuronas NA están localizadas en el locus ceruleus y en el área tegmental lateral y desde allí proyectan sus conexiones al tálamo, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral. El locus ceruleus además juega un papel fundamental en las respuestas de adaptación y vigilancia preparando al individuo para la lucha o la huida, coordinando así las

respuestas de estrés y miedo (Tellez Vargas, 2000). Así, se ha visto que los ratones *knockout* para el transportador de NA, los cuales tienen unos niveles elevados de este neurotransmisor, muestran un fenotipo resistente al estrés, lo cual indicaría la importancia del sistema NA en la regulación del estado de ánimo y el comportamiento (Haenisch y Bönisch, 2011). De forma interesante, se sabe que la región BLA de la amígdala es precisamente el sitio de interacción entre el sistema NA y los GCs, mediando los efectos del estrés en la potenciación a largo plazo en el hipocampo y la consolidación de la memoria (Joseph-Bravo y Gortari, 2007). De esta forma, tal y como sugirió Selye (1950) en su teoría sobre el Síndrome General de Adaptación, los niveles de NA se ven aumentados como consecuencia del estrés agudo, lo cual se ha relacionado con un efecto positivo sobre los procesos de memoria y aprendizaje (Vogel y Schwabe, 2016). Sin embargo, de forma crónica, el estrés puede llegar a producir una disminución de los niveles de NA (Du y cols., 2016), siendo conocido el descenso de los niveles de NA (y también de 5-HT) en diferentes áreas cerebrales tanto en animales como en pacientes estresados y deprimidos (Ding y cols., 2015). En otros casos, el problema no radica en el neurotransmisor propiamente dicho, si no en los receptores, habiendo evidencias acerca de la disminución de receptores beta-adrenérgicos (Leonard, 1997) o del incremento de densidad y afinidad de los adrenoreceptores alfa 2 (García-Sevilla y cols., 1999; Leonard, 1997; Ordway y cols., 2003), lo cual podría dar lugar a una inhibición incrementada de la liberación de NA.

Por otro lado, la hipótesis NA de la depresión postula que la reducida neurotransmisión NA estaría asociada con descenso de la alerta, baja energía, problemas de concentración y falta de habilidad cognitiva (Moret y Briley, 2011). De forma más concreta, se sabe que la presencia de NA es fundamental para la facilitación de la memoria emocional en roedores (Joëls y cols., 2011). Por ejemplo, los niveles de NA en la amígdala tras el entrenamiento en la tarea de IA correlacionan de forma positiva con las latencias de retención en la fase de test 24 horas después (McIntyre y cols., 2002). Además, la administración post-entrenamiento de NA o de agonistas beta-adrenérgicos en el núcleo BLA produce una potenciación dependiente de dosis de la consolidación de la memoria de IA (Ferry y cols., 1999; Hatfield y McGaugh, 1999; Roozendaal y cols., 2009). Sin embargo, el bloqueo de los efectos de la NA con un antagonista beta-adrenérgico como el propranolol deteriora la ejecución (Hatfield y McGaugh, 1999).

Numerosas investigaciones en el área de la psiconeuroinmunología han demostrado la existencia de una comunicación entre el sistema nervioso y el **sistema inmune** a través de neurotransmisores, hormonas, neuropéptidos y citoquinas (Beitia, 2007). De hecho, se han observado efectos del estrés sobre la actividad inmunitaria, tanto en animales como en humanos, que hacen al sujeto más vulnerable al desarrollo de enfermedades (Biondi y Zannino, 1997; Cohen y Herbert, 1996; Kiecolt-Glaser y Glaser, 1999; Thomas y cols., 2002; Turner-Cobb y cols., 2001). Los datos muestran que diversas situaciones de estrés psicológico crónico en humanos alteran la respuesta inmunitaria (Camacho y Dimsdale,

2000; Dimitroglou y cols., 2003; Frimerman y cols., 1997; Kaur y cols., 2004; Sakami y cols., 2002; Wadee y cols., 2001). De hecho, se sabe que tanto el estrés como la depresión y la inflamación son capaces de activar el sistema de citoquinas (Trucco, 2002). Éstas pueden tener un efecto depresivo, ya sea directamente, por medio de la activación del sistema CRF, o indirectamente, provocando resistencia de los GRs, lo que causa hiperactividad del eje HHA, debido a inhibición del mecanismo de retroalimentación normal (Trucco, 2002).

Las PGs, al igual que las citoquinas, son mediadores inflamatorios que regulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, promoviendo el paso de células inflamatorias periféricas (Perry, 1998). Así, se ha visto que los fármacos anti-inflamatorios no-esteroides (AINEs), los cuales inhiben la actividad de la ciclooxigenasa (COX), la enzima clave en la síntesis de las PGs, tienen efectos terapéuticos en pacientes con depresión mayor (Akhondzadeh y cols., 2009; Mendlewicz y cols., 2006; Müller y cols., 2006).

Por otro lado, se ha visto que las PGs están implicadas en la regulación del eje HHA, viéndose sus niveles afectados en respuesta al estrés (Gądek-Michalska y cols., 2013). En relación al CSDS, Tanaka y cols. (2012) encontraron que las PGs tipo E2 eran relevantes para los animales susceptibles, viéndose sus niveles incrementados. De forma interesante, se ha planteado que la actividad prolongada de la COX podría contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer

(Hoozemans y O'Banion, 2005; Kiaei y cols., 2005), la cual tiene como síntomas principales marcados problemas de memoria y, aunque estudios clínicos con AINEs no han mostrado una eficacia total a la hora de mejorar los síntomas (Aisen y cols., 2003, Cudkowicz y cols., 2006), hay estudios epidemiológicos que sugieren que la inhibición a largo plazo de las enzimas COX mediante AINEs puede proteger contra la enfermedad de Alzheimer (McGeer y McGeer, 2007; Vlad y cols., 2008). De hecho, Matousek y cols., (2011) demostraron que niveles elevados de PGE2 contribuían significativamente a los déficits observados en una prueba de miedo condicionado.

Por tanto, los estudios demuestran que existen áreas y sustancias cerebrales implicadas de forma conjunta en el funcionamiento de la memoria, así como en la respuesta al estrés, que permiten explicar las relaciones tan complejas que rigen entre estos dos fenómenos.

Tras la revisión realizada a lo largo de este capítulo I, han surgido diversas hipótesis respecto a la relación entre estrés social, memoria y sustancias antidepresivas y antiinflamatorias, las cuales - junto a los objetivos generales y específicos- dan sentido a la presente Tesis Doctoral y serán presentados en el próximo capítulo.



# **CAPÍTULO II.**

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

---



Teniendo en cuenta los hallazgos presentados en el capítulo I, la presente Tesis Doctoral plantea dos objetivos generales con sus correspondientes objetivos específicos a responder e hipótesis a contrastar que serán explicados a lo largo de este capítulo.

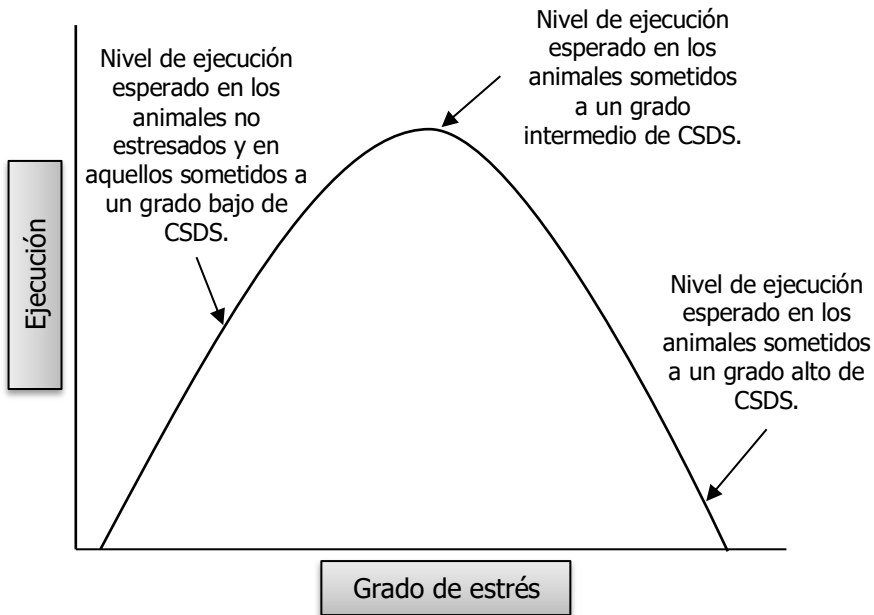
**Objetivo general 1:** estudiar los efectos producidos por la experiencia crónica de derrota social sobre la memoria en ratones.

- ✓ **Objetivo específico 1.1:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria emocional de los ratones estresados.

La amígdala es una región que se activa ante experiencias con carga afectiva potencialmente amenazantes, conduciendo a una consolidación de la memoria emocional, incluidos los recuerdos del miedo (McGaugh, 2004; Richter-Levin y Akirav, 2003). Por otro lado, es conocida la Ley de Yerkes-Dodson (Yerkes y Dodson, 1908) según la cual existiría una relación en forma de U invertida entre los niveles de activación y la eficacia al realizar una tarea cognitiva en el sentido de que un nivel bajo de estrés no afecta, un nivel intermedio de estrés mejora y un nivel muy alto de estrés, superado el punto óptimo, empeora el rendimiento.

- **Hipótesis 1.1:** esperamos encontrar, frente a los animales no estresados, una potenciación de la memoria emocional en nuestros ratones sometidos a un grado intermedio de CSDS, una ausencia de efectos (ni de mejora ni de deterioro) en los ratones sometidos a un grado bajo de CSDS y un deterioro en los ratones

sometidos a un grado muy alto de CSDS. La figura 10 representa de forma gráfica la hipótesis 1.1.



**Fig. 10.** Representación gráfica de la hipótesis 1.1.

Intentaremos alcanzar el objetivo específico 1.1. y poner a prueba la hipótesis 1.1. en los experimentos 1 a 7 a través de la tarea de IA.

- ✓ **Objetivo específico 1.2:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria espacial de los ratones estresados.

Está demostrado que la exposición crónica a niveles altos de glucocorticoides produce atrofia y muerte neuronal en el hipocampo, lo que se manifiesta en forma de reducción del aprendizaje espacial (Lupien y cols., 1998). Asimismo, los episodios repetitivos de estrés

psicológico producen atrofia de las neuronas piramidales del hipocampo en ratas (Escobar y Gómez González, 2006).

- **Hipótesis 1.2:** esperamos encontrar un deterioro de la memoria espacial en nuestros ratones sometidos a CSDS.

Intentaremos conseguir el objetivo específico 1.2. y poner a prueba la hipótesis 1.2. en el estudio 5 a través de la tarea del MWM.

- ✓ **Objetivo específico 1.3:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria de reconocimiento de los ratones estresados.

Aunque hay pocos estudios que hayan estudiado los efectos del estrés social sobre la memoria de reconocimiento, los resultados son contradictorios. Así, mientras que algunos estudios han encontrado que el estrés de derrota social administrado de forma aguda no afecta a la memoria de reconocimiento (García-Pardo y cols., 2016), otros estudios sugieren que, aplicado de forma crónica, sí que tiene un efecto deteriorante sobre este tipo de memoria (Huang y cols., 2013; Zhao y cols., 2013).

- **Hipótesis 1.3:** aunque es difícil plantear una hipótesis respecto a la memoria de reconocimiento, esperamos encontrar un deterioro de la memoria de reconocimiento en nuestros ratones sometidos a CSDS.

Intentaremos lograr el objetivo específico 1.3. y poner a prueba la hipótesis 1.3. en el estudio 7 a través de la tarea NOR.

- ✓ **Objetivo específico 1.4:** estudiar los efectos del CSDS sobre posibles variables contaminantes en la interpretación de

los resultados obtenidos en la memoria de los ratones estresados.

Aunque las variables contaminantes se han tomado como medidas complementarias de control, se han planteado hipótesis respecto a las mismas.

En cuanto a la respuesta de *ansiedad*, se sabe que el desarrollo de trastornos de ansiedad va asociado con la exposición a estrés crónico psicosocial. Así, se ha visto que la derrota social repetida activa regiones cerebrales asociadas a la respuesta de ansiedad (Reader y cols., 2015). De hecho, se ha observado que la derrota social conlleva una respuesta ansiogénica en ratas y ratones (Gutiérrez-García y cols, 2006; Kinsey y cols., 2007; Krishnan y cols., 2007).

- **Hipótesis 1.4.1:** esperamos encontrar un aumento de la respuesta de ansiedad en nuestros ratones sometidos a CSDS.

Respecto a la *actividad locomotora*, hay resultados contradictorios. Mientras que algunos autores han encontrado una disminución de la actividad locomotora (Huang y cols., 2013; Zhao y cols., 2013; Jin y cols., 2015), otros no han encontrado efectos del estrés de derrota social sobre este tipo de medida (Liebsch y cols., 1999; Krishnan y cols., 2007; Wagner y cols., 2013).

- **Hipótesis 1.4.2:** Teniendo en cuenta que algunos de los estudios que utilizan el laberinto en cruz elevado (EPM, del inglés *Elevated Plus Maze*), no encuentran efectos del

estrés social sobre la actividad exploratoria espontánea, esperamos no encontrar efectos en esta medida en nuestros ratones sometidos a CSDS.

Por último, en relación a la respuesta de *analgesia*, se sabe que el estrés derrota social tiene un impacto sobre la sensibilidad al dolor, habiéndose observado que este tipo de estrés social puede inhibir (Miczek y cols., 1982; Rodgers y Randall, 1986) o potenciar la percepción de dolor (Imbe y cols., 2006). Sin embargo, hay estudios que han evaluado el efecto del estrés de derrota social sobre la respuesta condicionada de miedo, basada en la administración de una descarga eléctrica, encontrando afectación de esta respuesta en los animales estresados sin presentar una diferente sensibilidad al dolor comparados con los animales controles (Yu y cols., 2011; Novick y cols., 2016).

- **Hipótesis 1.4.3:** esperamos no encontrar efectos en la respuesta de analgesia en nuestros ratones sometidos a CSDS.

Intentaremos alcanzar el objetivo específico 1.4. y poner a prueba las hipótesis 1.4.1., 1.4.2. y 1.4.3. en los estudios 1 a 7 a través de la tarea del EPM para la respuesta de ansiedad y la actividad locomotora, y de la prueba *hot-plate* (HP) para la respuesta de analgesia.

- ✓ **Objetivo específico 1.5:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria en función del fenotipo resiliente *vs* susceptible de los ratones estresados.

Como se ha planteado anteriormente, las patologías asociadas al estrés son el resultado de la interacción entre la exposición a estímulos estresantes y la existencia de características individuales: mientras que una gran cantidad de sujetos son resilientes, otros individuos manifiestan una vulnerabilidad y una propensión a desarrollar determinados tipos de trastornos. Asimismo, existen evidencias de que la derrota social puede contribuir al deterioro cognitivo (Adamcio y cols., 2009), además de haberse visto que, a diferencia de los sujetos susceptibles, los animales resilientes son capaces de mantener normalizadas sus capacidades psicológicas y cognitivas (Jianhua y cols., 2017).

- **Hipótesis 1.5:** esperamos encontrar efectos diferenciales del CSDS sobre la memoria de los sujetos derrotados en función del fenotipo de vulnerabilidad al estrés, mostrando afectación de sus capacidades cognitivas aquellos animales caracterizados por su susceptibilidad y no manifestando déficits aquellos caracterizados por su resiliencia al estrés social.

Intentaremos conseguir el objetivo específico 1.5. y poner a prueba la hipótesis 1.5. en el estudio 7 a través de la prueba de interacción social (SI, del inglés *Social Interaction*).

**Objetivo general 2:** estudiar la modulación farmacológica de las alteraciones cognitivas observadas en los ratones sometidos a una experiencia crónica de derrota social.

- ✓ **Objetivo específico 2.1:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico



clomipramina sobre las alteraciones de memoria en los ratones estresados.

La depresión es una patología frecuentemente asociada al estrés (e.g. Barden, 2004; Campeau y cols., 2011) y el déficit de memoria es algo común en pacientes con depresión mayor, el cual mejora significativamente tras el tratamiento crónico con antidepresivos (Burt y cols., 1995). El antidepresivo tricíclico clomipramina, ampliamente utilizado en la práctica clínica (Lieberman y cols., 2005), es un fármaco de referencia para el tratamiento de trastornos emocionales como el trastorno obsesivo-compulsivo o el trastorno de pánico y de otros trastornos psiquiátricos (Calegari y cols., 2007).

- **Hipótesis 2.1:** esperamos encontrar que el tratamiento crónico con el antidepresivo clomipramina revierta las alteraciones cognitivas producidas por el CSDS.

Intentaremos lograr el objetivo específico 2.1. y poner a prueba la hipótesis 2.1. en el estudio 6.

- ✓ **Objetivo específico 2.2:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antiinflamatorio indometacina sobre las alteraciones cognitivas en los ratones estresados.

Está demostrado que el estrés social induce neuroinflamación en animales (Finnell y Wood, 2016). De forma más específica, se ha visto que mientras que los animales susceptibles exhiben altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, en el caso de los animales resilientes, no sólo no experimentan este aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, sino que muestran un incremento en la expresión

de sustancias anti-inflamatorias (Finnell y Wood, 2016). Por otro lado, se sabe que la COX mantiene complejas interacciones con los procesos de memoria y aprendizaje, como se evidencia en los estudios con fármacos inhibidores de la COX, celecoxib e indometacina (Warner y cols., 1999). Asimismo, se ha visto que los fármacos inhibidores de la COX podrían mejorar los síntomas de pacientes depresivos (Gold, 2015; Hashimoto, 2015; Na y cols., 2014), incluidos los relacionados con los procesos de memoria y aprendizaje, lo cual teniendo en cuenta la relación entre estrés, depresión e inflamación (Finnell y Wood, 2016) sugiere que los efectos negativos del estrés social sobre la memoria son en parte debidos a procesos inflamatorios que, por ello, podrían ser revertidos por fármacos antiinflamatorios.

- **Hipótesis 2.2:** esperamos encontrar que el tratamiento crónico con el antiinflamatorio indometacina revierta las alteraciones cognitivas producidas por el CSDS.

Intentaremos alcanzar el objetivo específico 2.2. y poner a prueba la hipótesis 2.2. en el estudio 7.

# **CAPÍTULO III.**

## **EXPERIMENTOS 1, 2 Y 3**

---

### **Inhibitory avoidance learning in CD1 mice: effects of chronic social defeat stress**

---

Publicado en (véase ANEXO I):

Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C (2015). Inhibitory avoidance learning in CD1 mice: effects of chronic social defeat stress. *Behavioural Processes*. 115: 64–69.



### **3.1. ABSTRACT**

Chronic social defeat stress (CSDS) is an animal model widely used to determine the neurobiological mechanisms of stress and its associated pathologies. In this study, the effects of CSDS on inhibitory avoidance (IA) were evaluated in post-pubertal and adult male CD1 mice, instead of the C57BL/6J strain used in the CSDS standard protocol. CSDS consisted of daily 5-min (experiments 1 and 2) or 10-min (experiment 3) agonistic encounters on 21 consecutive days. 24 h after the last session of CSDS, all the mice were tested for IA. They were also evaluated in an elevated plus maze, obtaining complementary measures of locomotor activity and emotionality. In experiments 1 and 2, IA learning was confirmed in both non-stressed and stressed groups, showing stressed post-pubertal mice higher test latencies than controls. In experiment 3, IA was confirmed in the non-stressed but not in the stressed group. In conclusion, a moderate degree of CSDS (5-min encounters) enhances memory in post-pubertal but not in adult mice, while a high degree (10-min encounters) prevents the memory formation of IA in mice. These effects of CSDS on memory are not secondary to motor or emotional effects of stress. Furthermore, CD1 has been shown to be a valid strain for the stressed mice in the CSDS model.



### **3.2. INTRODUCTION**

Social stressors are the main source of stress in humans and contribute to the development and expression of diverse pathologies. Given that research on the behavioural, neurotransmitter and hormonal changes associated with long-term stress can involve highly invasive procedures, animal models are generally used (Blanchard et al., 1998). Conventional animal models of stress - including models of physical stress such as immobility and inescapable electric footshock - are quite removed from real-life situations, while those that involve a social context would seem to be more appropriate (Martinez et al., 1998). Thus, research on social stress in animals has traditionally employed specific models, of which the resident-intruder paradigm is one of the most popular (Björkqvist, 2001). These studies suggest that social defeat results in a large variety of symptoms, including behavioural, neuroendocrinological, physiological, neurochemical, neurological and immunological changes (Blanchard et al., 1998, 2001; Niebylski et al., 2012; Stefanski, 2001). Nowadays, chronic social defeat stress (CSDS) is an animal model widely used to emulate human diseases related to stress, such as anxiety (e.g. Toth and Neumann, 2013; Venzala et al., 2013; Vidal et al., 2011; Watt et al., 2009) and depression (e.g. Iñiguez et al., 2004; Venzala et al., 2012), in order to determine the underlying mechanisms and identify pharmacological treatments.

Inhibitory avoidance (also called passive avoidance) has been extensively employed to evaluate memory in animals (e.g. Gold, 1986; Heise, 1981; Izquierdo and Medina, 1997). This task principally

involves emotional memory. In the step-through version, which was employed in the present study, the animal must avoid crossing to the dark compartment of a box in order to evade receiving a shock to the paws (Bureš et al., 1983).

Memory impairment has previously been shown to be induced by CSDS in animal tests other than inhibitory avoidance (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011). Ohl and Fuchs (1998, 1999) observed memory deficit in a modified holeboard task in male tree shrews exposed to CSDS. Touyarot et al. (2004) reported a marked deficit in spatial learning in the water maze in highly-reactive-to-novelty rats undergoing a 21-day CSDS schedule. Wang et al. (2011) also reported impairments in the spatial memory of chronically stressed mice (21 daily encounters of CSDS) in a novel object recognition test and Y-maze.

The mentioned memory impairment is an important negative consequence among the diverse effects produced by CSDS. Several explanations in the neurobiology of these effects have been proposed, such as neuritic atrophy, reduced neurogenesis and decreased neurotrophin levels in the hippocampus; as well as changes in the levels of brain derived neurotrophic factor within the basolateral amygdala (Krishnan, 2014). The amygdala, as the main brain region involved in the emotional memory of inhibitory avoidance, is possibly also the most important structure affected in the potential effects of CSDS on inhibitory avoidance learning. Thus, the amygdala could be the common element of the three above mentioned topics: animal



models of social stress, inhibitory avoidance and memory impairment produced by CSDS.

In the present work, we were interested in studying the effects of CSDS on inhibitory avoidance in mice, using the CD1 strain for the stressed subjects instead of the C57BL/6J strain used in the CSDS standard protocol (Golden et al., 2011). We think that the use of the same strain for the stressed animals and the aggressors could enhance the validity of the CSDS model.

Taking into account the effects of CSDS on memory previously reported in other memory paradigms (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011), we hypothesized that CSDS could have deleterious effects on inhibitory avoidance in mice. Nevertheless, the effects of CSDS on inhibitory avoidance learning could be different to those observed in other memory paradigms due to differences in the kind of memory (and the main brain region) involved. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of CSDS on memory in mice, using the inhibitory avoidance test. For this purpose, the effects of CSDS on performance in said task were evaluated in post-pubertal and adult male CD1 mice in three experiments. Subjects of these two age groups were assessed in order to evaluate possible differences in their vulnerability to the effects of social stress on memory. As puberty is a critical developmental period characterised by higher vulnerability to many factors, we predicted that post-pubertal mice would be more sensitive than adult mice to the effects of CSDS on memory. In addition to the inhibitory avoidance task, the animals were assessed in an elevated plus maze in order to

obtain complementary measures of locomotor activity and emotionality, taking into account that motor activity and anxiety may act as confounding factors in inhibitory avoidance performance.

Inhibitory avoidance performance of mice of the same strain can vary depending on the supplier: previous results obtained in our laboratory have shown differences in inhibitory avoidance learning among CD1 mice depending on the breeding facilities from which they originate, showing Charles River mice to acquire avoidance learning to a greater extent than Harlan or Janvier mice (Parra et al., 2013). Therefore, CD1 mice from Charles River were used in the present study.

### **3.3. MATERIAL AND METHODS**

#### **3.3.1. Subjects**

Post-pubertal (42 days) and adult (70 days) male CD1 mice (Charles River, Lyon, France) were used as experimental subjects in three separate experiments. The animals were housed in groups of 4 in translucent plastic cages (height 14.5 cm, width 27 cm, length 27 cm) with roofs of stainless steel bars (Panlab S.L., Barcelona, Spain). Male CD1 retired breeder mice of over 3 months of age (Janvier, France) were housed individually in similar cages in preparation for their use as aggressors. All the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $21\pm 2$  °C), under a reversed light-dark cycle (lights off: 07:30h-19:30h, local time), with food and water available ad libitum. Group-housed mice were marked for recognition

by painting their fur with purple coloring. They were subjected to a stress treatment and to several behavioural tests during the dark phase of the light cycle. The experimental protocol and use of animals were in compliance with the European Community's Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and the Spanish Real Decreto 53/2013.

### **3.3.2. Behavioural paradigms and apparatus**

A Chronic Social Defeat Stress (CSDS) paradigm was used as an animal model of social stress. In this paradigm, experimental male mice (stressed animals) are repeatedly subjected to bouts of social defeat by a larger CD1 mouse that has screened positive for aggressive behaviour (see next section for procedure). A step-through inhibitory avoidance apparatus for mice (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy) was employed to evaluate memory in the three experiments (see Parra et al., 2013 for description). An elevated plus-maze (Cibertec, Madrid, Spain) was also applied to measure unconditioned anxiety-like behavior and locomotor activity (see Vinader et al., 2006 for description).

### **3.3.3. Procedure**

After 10 days of acclimatization to the animal facility, post-pubertal (experiments 1 and 3) and adult (experiment 2) male CD1 mice were randomly distributed into two groups: NS (non-stressed) group (n = 10-12) and S (stressed) group (n = 10-11). In a pre-stress phase, CD1 retired breeders were selected as aggressors based on their attack latencies and number of attacks according to a 3-day screening procedure (inclusion criteria: attack latencies shorter than 60 s and 3 or more attacks in 3 minutes). The S mice were then submitted to the

CSDS procedure, following the guidelines of Golden et al. (2011), but using CD1 mice -instead of C57BL/6J strain- for the stressed animals.

In experiments 1 and 2, each S mouse (the intruder) was exposed to a daily 5-min social defeat by a larger and aggressive mouse (the resident) in its home cage on 21 consecutive days. After each encounter, both animals were maintained in sensory contact for 1 h by means of a wire mesh that divided the resident home cage into two halves. The intruder was then returned to its home cage. S mice were exposed to a novel resident each day. NS mice were also housed in pairs in an identical home cage set-up, being rotated on a daily basis throughout the 21-day period. Twenty-four hours after the last CSDS session, NS and S mice were submitted to a step-through inhibitory avoidance task (the main behavioural test) as previously described (Parra et al., 2013). Twenty-four hours after the inhibitory avoidance test phase, all mice were evaluated for 5 min in an elevated plus maze as a complementary behavioural test. Based on former studies (File, 2001; Lister, 1987; Rodgers and Johnson, 1995), the number of closed arm entries (defined as all four paws being placed on an arm) provided a measurement of locomotor activity, and the percentage of open arm entries provided a measurement of anxiety (the lower the score, the higher the anxiety). In experiment 3 the degree of CSDS was increased to 10-min encounters. The rest of the protocol details were the same as in the previous experiments.

#### **3.3.4. Statistical analysis**

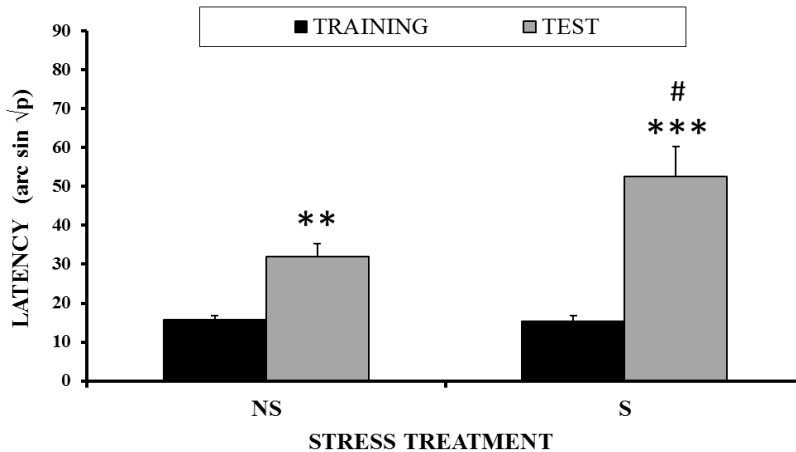
The inhibitory avoidance data were transformed into proportion ( $p = x/300$ ) values and then to arc sin ( $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ) values according to

Snedecor and Cochran (1980). This transformation is appropriate when a cut-off time is applied and crossing latencies that exceed this limit are interpreted as the maximum trial length. Therefore, all latencies are transformed into percentage or proportion values and these percentages ( $p$ ) are then transformed to arc sin (degree) values (according to the formula:  $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ), prior to statistical analysis and graphical constructions. Analyses of variance for training and test phases were performed separately. Training and test sessions were compared within the same group using the Student's  $t$  test for dependent samples. Analyses of variance was also carried out for the anxiety and locomotor activity data obtained in the elevated plus-maze, after checking that they fulfilled the criteria for normality and homogeneity. All analyses were performed using the "SPSS" software package, version 19 for windows by IBM (2010).

### **3.4. RESULTS**

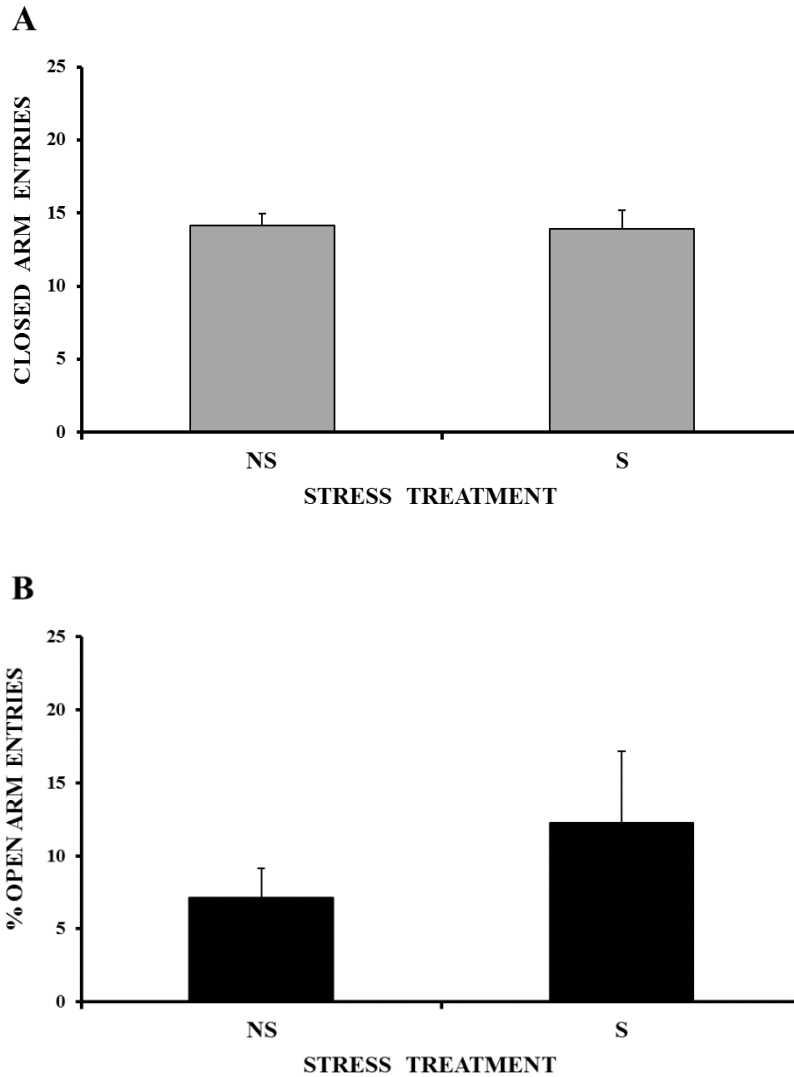
#### **3.4.1. Experiment 1 (post-pubertal mice, moderate degree of CSDS)**

***Inhibitory Avoidance:*** Treatment was not statistically significant in the Training phase, ( $F_{1,20}=0.032$ , n.s.). In the Test phase, Treatment was statistically significant ( $F_{1,20}=5.977$ ,  $p<0.05$ ) and one-way ANOVA revealed longer latencies in the stressed animals than in the control group. Inhibitory avoidance learning (longer test latencies than training latencies) was observed in both groups (NS group:  $t_{10}=4.446$ ,  $p<0.01$ ; S group:  $t_{10}=5.08$ ,  $p<0.001$ ) (see Fig. 11).



**Fig. 11.** Effects of CSDS (5-min encounters) on latencies of an inhibitory avoidance task in post-pubertal male CD1 mice (n = 11-12). NS = Non-Stressed group; S = Stressed group (idem in following figures). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p = x/300$ ) transformed to arc sin. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs Training phase; # $p < 0.05$  vs NS group.

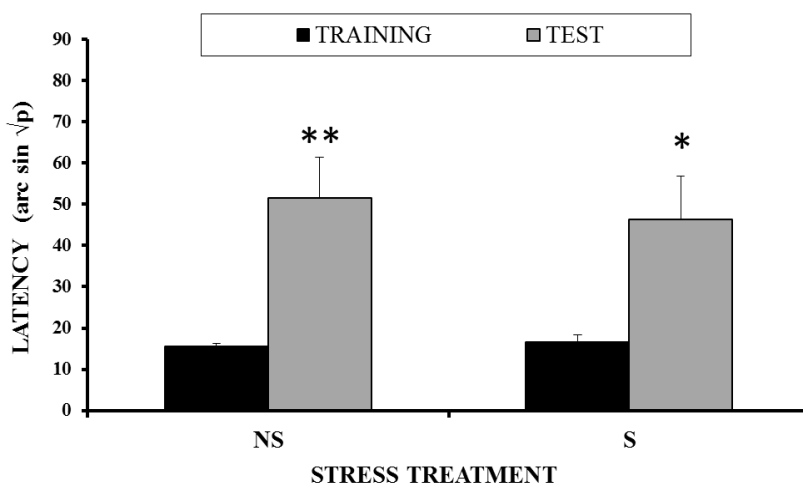
**Plus Maze:** No statistically significant differences were observed between stressed and control animals with respect to the plus maze task; neither in locomotor activity measurements (number of entries in closed arms) ( $F_{1,20} = 0.033$ , n.s.) nor in anxiety measurements (percentage of open arm entries) ( $F_{1,20} = 0.94$ , n.s.) (see Fig. 12).



**Fig. 12.** Effects of CSDS (5-min encounters) on measurements of a plus maze task in post-pubertal male CD1 mice (n = 11-12). A: locomotor activity measurement (number of closed arm entries). B: anxiety measurement (percentage of open arm entries). Values are expressed as means (+SEM).

### 3.4.2. Experiment 2 (adult mice, moderate degree of CSDS)

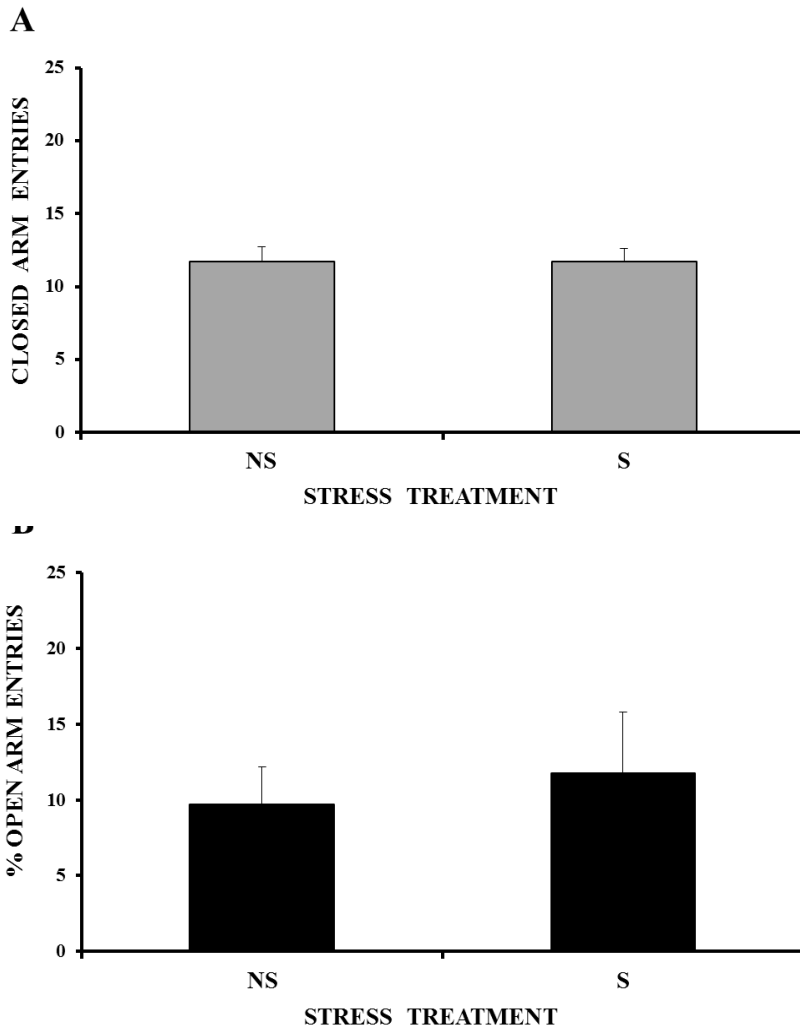
**Inhibitory Avoidance:** Treatment was not statistically significant in either the Training phase ( $F_{1,21}=0.375$ , n.s.) or Test phase ( $F_{1,21}=0.131$ , n.s.). Inhibitory avoidance learning (longer test latencies than training latencies) was observed in both groups (NS group:  $t_{11} = 3.817$ ,  $p < 0.01$ ; S group:  $t_{10} = 2.844$ ,  $p < 0.05$ ) (see Fig. 13).



**Fig. 13.** Effects of CSDS (5-min encounters) on latencies of an inhibitory avoidance task in adult male CD1 mice ( $n = 11$ ) (Experiment 2). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p = x/300$ ) transformed to arc sin. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Training phase.

**Plus Maze:** No statistically significant differences were observed between stressed and control animals in the plus maze task; neither in locomotor activity measurements (number of entries in closed arms) ( $F_{1,21}=0.0$ , n.s.) or anxiety measurements (percentage of open arm entries) ( $F_{1,21}=0.199$ , n.s.) (see Fig. 14).

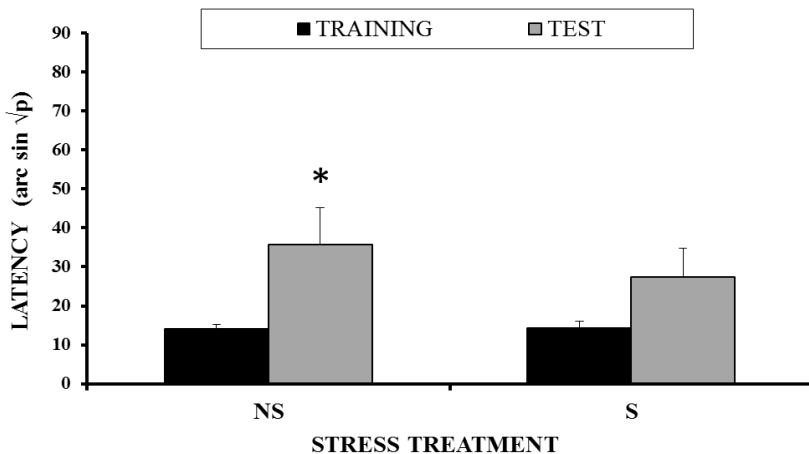




**Fig. 14.** Effects of CSDS (5-min encounters) on measurements of a plus maze task in adult male CD1 mice ( $n = 11$ ) (Experiment 2). A: locomotor activity measurement (number of closed arm entries). B: anxiety measurement (percentage of open arm entries). Values are expressed as means ( $+SEM$ ).

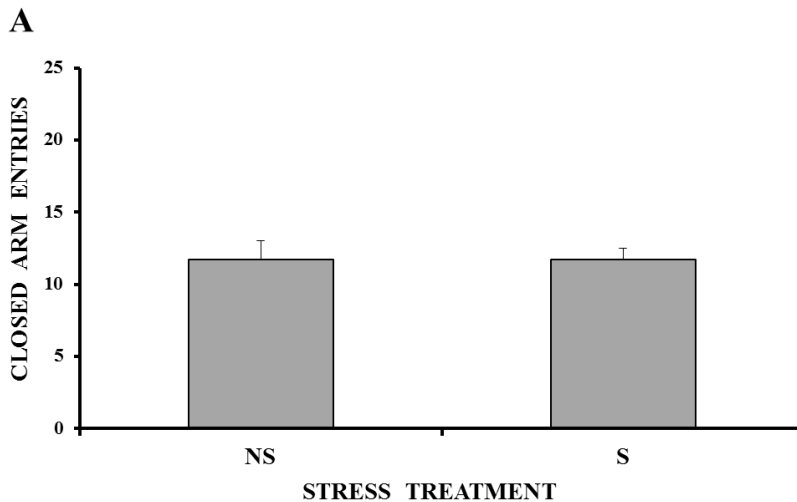
### 3.4.3. Experiment 3 (post-pubertal mice, high degree of CSDS)

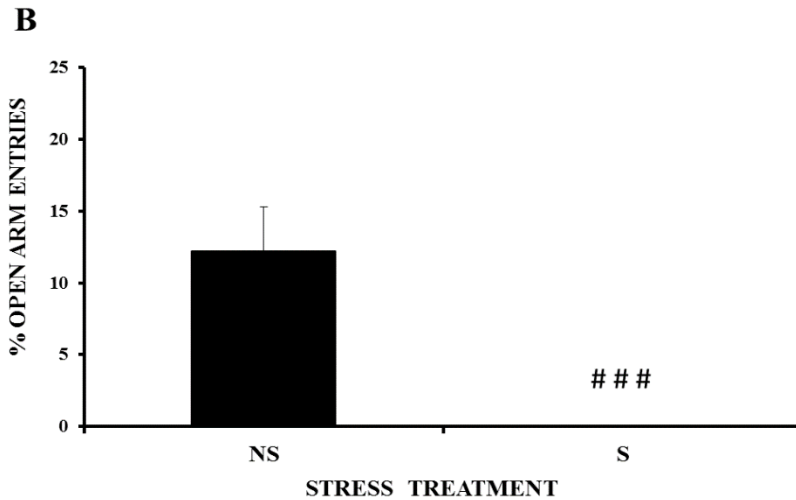
**Inhibitory Avoidance:** Treatment was not statistically significant in either the Training phase, ( $F_{1,18}=0.026$ , n.s.) or Test phase ( $F_{1,18}=0.461$ , n.s.). Inhibitory avoidance learning (longer test latencies than training latencies) was observed in the NS group ( $t_9=2.48$ ,  $p<0.05$ ) but not in the S group ( $t_9=1.59$ , n.s.) (see Fig. 15).



**Fig. 15.** Effects of CSDS (10 min encounters) on latencies of an inhibitory avoidance task in post-pubertal male CD1 mice ( $n = 10$ ) (Experiment 3). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p = x/300$ ) transformed to arc sin. \* $p<0.05$  vs Training phase.

**Plus Maze:** No statistically significant differences were observed between stressed and control animals in the locomotor activity measurement (number of entries in closed arms) ( $F_{1,18}=0.621$ , n.s.). However, differences between NS and S groups were statistically significant in the case of anxiety measurements (percentage of open arm entries) ( $F_{1,18}=15.564$ ,  $p<0.001$ ), which showed anxiety levels to be higher among stressed mice (which had a lower score in this measure, as none of these mice made any open arm entry in this experiment) (see Fig. 16).





**Fig. 16.** Effects of CSDS (10-min encounters) on measurements of a plus maze task in post-pubertal male CD1 mice (n = 10) (Experiment 3). A: locomotor activity measurement (number of closed arm entries). B: anxiety measurement (percentage of open arm entries) (Note: none of S mice made any open arm entry). Values are expressed as means (+SEM). ###  $p < 0.001$  vs NS group.

### 3.5. DISCUSSION

In the present study, the effects of CSDS on inhibitory avoidance memory in post-pubertal and adult mice were evaluated in several experiments, using the CD1 strain for the stressed subjects instead of the C57BL/6J strain used in the CSDS standard protocol (Golden et al., 2011).

The main significant finding was that moderate CSDS (5-min encounters) enhances later inhibitory avoidance conditioning in post-pubertal mice (Experiment 1): stressed subjects showed higher test

latencies than control animals. These results are consistent with previous studies, where stress (or administration of stress hormones) has enhanced memory (e.g. Azzinnari et al., 2014), including inhibitory avoidance (e.g. Ferry and McGaugh, 1999; McIntyre et al., 2002). However, this degree of CSDS did not have significant effects on memory in adult mice (Experiment 2): stressed mice did not differ to non-stressed animals.

In contrast, memory impairment produced by CSDS has previously been reported in animals in other memory paradigms (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011). The discrepancy between the results obtained in those studies and ours, especially in Experiment 1, could be mainly due to the memory paradigm employed: results can differ from one paradigm to other. The kind of memory and the main brain region involved in one paradigm can be different from those involved in other one. For example, the effects of CSDS on the emotional memory involved in the inhibitory avoidance paradigm can be different from its effects on the spatial memory involved in the water maze paradigm.

The discrepancy could be also partly due to differences in the species or strain of animal used, and differences in the stress protocol. Thus, the degree of stress experienced could be an important factor. According to the classic Yerkes-Dodson inverted U-shaped performance law (Yerkes and Dodson, 1908), there is an optimal amount of arousal for performance, and when arousal or stress is lower or higher than this optimal level, performance is poorer. The degree of CSDS inflicted in Experiments 1 and 2, along with the low difficulty of

the task (less difficult tasks have higher levels of optimal arousal) may have produced scores in the ascending limb of the curve, which would have resulted in an improvement in the performance of the stressed animals.

Taking into account the results obtained in experiments 1 and 2, the degree of CSDS was increased in experiment 3 by subjecting the S mice to 10-min (instead of 5-min) encounters in order to evaluate possible deleterious effects of a high degree of CSDS on inhibitory avoidance in mice. As post-pubertal animals had proved to be more sensitive to the effects of CSDS in the previous experiments (they were probably more on the left of the inverted U-shaped curve), this developmental period was also chosen for the third experiment. As hypothesized, the high degree of CSDS had a negative effect on mice's memory in Experiment 3, in which stressed animals did not show inhibitory avoidance learning, although their test latencies did not statistically differ from those of non-stressed mice.

Defeated or subordinate animals commonly show motor inhibition with a decrease in general activity, especially in locomotor and exploratory activities (Martinez et al., 1998). This reduction in activity has been reported in several species, such as rats (e.g. Rygula et al., 2006), tree shrews (e.g. Flügge et al., 1998, 2001; Fuchs et al., 1996; Van Kampen et al., 2000) and mice (e.g. Gómez-Lázaro et al., 2011; Iñiguez et al., 2014), although no significant decrease in activity (Iio et al., 2011) or hyperactivity (Venzala et al., 2012, 2013) have also been reported. In the present study, stressed mice did not show significant changes in spontaneous locomotor activity in any of the

three experiments. This lack of motor effects was evident not only in the elevated plus maze task (in which no differences were observed in the number of entries in closed arms), but also in the inhibitory avoidance task, as no statistically significant differences were observed between stressed and control mice in terms of their training latencies. Therefore, it can be concluded that the effects of CSDS on memory were not secondary to motor effects of stress.

Social defeat has previously been shown to enhance anxiety-like behavior of rats (e.g. Haller and Halasz, 2000) and mice (e.g. Avgustinovich et al., 1997) measured in the elevated plus-maze test, although the lack of such an enhancement has also been reported (Martinez et al., 1998). In the present study, differences in emotionality were detected only in experiment 3, in which stressed animals showed higher anxiety levels (i.e. lower percentage of open arm entries). Anxiety, as well as motor activity, could act as a confounding factor in the effects of CSDS on memory. However, the higher level of anxiety/fear of stressed animals might have resulted in these subjects taking longer to enter the dangerous compartment; as a consequence, their inhibitory avoidance performance would have improved. However, despite their enhanced anxiety, the stressed mice in experiment 3 did not display any inhibitory avoidance. Therefore, we believe that the effects of CSDS on memory are not secondary to its effects on anxiety.

Individual differences in response to social defeat are noticeable (Krishnan, 2014). This kind of differences have been reported in several neurological and immunological measures in mice, such as

hippocampal volume (Tse et al., 2014), prefrontal cortex control of amygdala activity (Kumar et al., 2014) and peripheral immune system response (Hodes et al., 2014). These individual differences could explain the differences in susceptibility to the behavioural effects of chronic social stress, including the effects of CSDS on inhibitory avoidance learning.

In conclusion, the present study has shown that a moderate degree of CSDS (5-min encounters) enhances memory in post-pubertal mice but it has no effects in adult mice; while a high degree of CSDS (10-min encounters) prevents the memory formation of inhibitory avoidance in mice. These effects of CSDS on the emotional memory involved in inhibitory avoidance do not seem to be secondary to motor or emotional effects of stress. Finally, the present study has shown that CD1 is a valid strain for the stressed mice in the CSDS protocol.

### **3.6. REFERENCES**

- Avgustinovich, D.F., Gorbach, O.V., Kudryavtseva, N.N., 1997. Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiology & Behavior* 61, 37–43. doi: 10.1016/S0031-9384(96)00303-4.
- Azzinnari, D., Sigrist, H., Staehli, S., Palme, R., Hildebrandt, T., Leparç, G., Hengerer, B., Seifritz, E., Pryce, C.R. 2014. Mouse social stress induces increased fear conditioning, helplessness and fatigue to physical challenge together with markers of altered immune and dopamine function. *Neuropharmacology* 85, 328-341. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.039.
- Björkqvist, K., 2001. Social defeat as a stressor in humans. *Physiology & Behavior* 73, 435-442. doi:10.1016/S0031-9384(01)00490-5.
- Blanchard, R.J., Hebert, M., Sakai, R.R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., McEwen, B.S., Blanchard, D.C., 1998. Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive Behavior* 24, 307-321. doi: 10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO;2-F.



- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior* 73, 261-271. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00449-8.
- Bureš, J., Burešová, O., Huston, J.P., 1983. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour*. Amsterdam: Elsevier.
- Ferry, B., McGaugh, J.L., 1999. Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory* 72, 8-12. doi:10.1006/nlme.1998.3904.
- File, S.E., 2001. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research* 125, 151-157.
- Flügge, G., Kramer, M., Rensing, S., Fuchs, E., 1998. 5HT1A-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone. *European Journal of Neuroscience* 10, 2685-2693. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00280.
- Flügge, G., Kramer, M., Fuchs, E., 2001. Chronic subordination stress in male tree shrews: replacement of testosterone affects behavior and central alpha(2)-adrenoceptors. *Physiology & Behavior* 73, 293-300. doi:10.1016/S0031-9384(01)00450-4.
- Fuchs, E., Kramer, M., Hermes, B., Netter, P., Hiemke, C., 1996. Psychosocial stress in tree shrews: domipramine counteracts behavioral and endocrine changes. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 54, 219-228. doi: 10.1016/0091-3057(95)02166-3.
- Golden, S.A., Covington, H.E., Berton, O., Russo, S.J., 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols* 6, 1183-1191. doi:10.1038/nprot.2011.361.
- Gold, P.E., 1986. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology* 46, 87-98. doi: 10.1016/S0163-1047(86)90927-1.
- Gómez-Lázaro, E., Arregi, A., Beitia, G., Vegas, O., Azpiroz, A., Garmendia, L., 2011. Individual differences in chronically defeated male mice: Behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. *Stress* 14, 537-548. doi: 10.3109/10253890.2011.562939.
- Haller, J., Halasz, J., 2000. Anxiolytic effects of repeated victory in male Wistar rats. *Aggressive Behavior* 26, 257-261. doi: 10.1002/(SICI)1098-2337(2000)26:3<257::AID-AB5>3.0.CO;2-7.
- Heise, G.A., 1981. Learning and memory facilitators: Experimental definition and current status. *Trends in Cognitive Sciences* 2, 158-160.
- Hodes, G.E., Pfau, M.L., Leboeuf, M., Golden, S.A., Christoffel, D.J., Bregmana, D., et al. 2014. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 16136-16141. doi: 10.1073/pnas.1415191111.

- IBM Corp., 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. IBM Corp., Armonk, NY.
- Iio, W., Matsukawa, N., Tsukahara, T., Kohari, D., Toyoda, A., 2011. Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade. *Neuroscience Letters* 504, 281-284. doi: 10.1016/j.neulet.2011.09.047.
- Iñiguez, S.D., Riggs, L.M., Nieto, S.J., Dayrit, G., Zamora, N.N., Shawhan, K.L., Cruz, B., Warren, B.L., 2014. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in doi:10.3109/10253890.2014.910650.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 25, 1-9.
- Krishnan, V., 2014. Defeating the fear: new insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Experimental Neurology* 261, 412-416. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.012.
- Kumar, S., Hultman, R., Hughes, D., Michel, N., Katz, B.M., Dzirasa, K., 2014. Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. *Nature Communications* 5, 4537. doi: 10.1038/ncomms5537.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180-185. doi:10.1007/BF00177912.
- Martinez, M., Calvo-Torrent, A., Pico-Alfonso, M.A., 1998. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. *Aggressive Behavior* 24, 241-256. doi: 10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M.
- McIntyre, C.K., Hatfield, T., McGaugh, J.L., 2002. Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *European Journal of Neuroscience* 16, 1223-1226. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02188.x.
- Niebylski, A., Boccolini, A., Bensi, N., Binotti, S., Hansen, C., Yaciuk, R., Gauna, H., 2012. Neuroendocrine changes and natriuresis in response to social stress in rats. *Stress & Health* 28, 179-185. doi: 10.1002/smi.1411.
- Ohl, F., Fuchs, E., 1998. Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23, 319-323. doi: 10.1016/S0149-7634(98)00033-5.
- Ohl, F., Fuchs, E., 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive Brain Research* 7, 379-387. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6410\(98\)00042-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6410(98)00042-1).
- Parra, A., Rama, E., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., 2013. Inhibitory avoidance in CD1 mice: Sex matters, as does the supplier. *Behavioural Processes* 100, 36-39. doi: 10.1016/j.beproc.2013.07.011.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 52, 297-303. doi: 10.1016/0091-3057(95)00138-M.

- Rygula, R., Abumaria, N., Domenici, E., Hiemke, C., Fuchs, E., 2006. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behavioural Brain Research* 174, 188-192. doi: 10.1016/j.bbr.2006.07.017.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1980. *Statistical Methods*. Ames: The Iowa State University Press.
- Stefanski, V., 2001. Effects of psychosocial stress or food restriction on body mass and blood cellular immunity in laboratory rats. *Stress & Health* 17, 133-140. doi: 10.1002/smi.894.
- Toth, I., Neumann, I.D., 2013. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Research*. 354, 107-118. doi: 10.1007/s00441-013-1636-4.
- Touyarot, K., Venero, C., Sandi, C., 2004. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29, 290-305. doi: 10.1016/S0306-4530(03)00031-3.
- Tse, Y.C., Montoya, I., Wong, A.S., Mathieu, A., Lissemore, J., Lagace, D.C., Wong, T.P., 2014. A longitudinal study of stress-induced hippocampal volume changes in mice that are susceptible or resilient to chronic social defeat. *Hippocampus* 24, 1120-1128. doi: 10.1002/hipo.22296.
- Van Kampen, M., Schmitt, U., Hiemke, C., Fuchs, E., 2000. Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 65, 539-546. doi: 10.1016/S0091-3057(99)00190-2.
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., Delagrangue, P., Tordera, R.M., 2012. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* 224, 313-325. doi: 10.1007/s00213-012-2754-5.
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., Tordera, R.M., 2013. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *European Neuropsychopharmacology* 23, 697-708. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.05.010.
- Vinader-Caerols, C., Martos, A., Monleón, S., Arenas, M.C., Parra, A. (2006). Acute effects of maprotiline on learning, anxiety, activity and analgesia in male and female mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 66, 23-31. doi: 16617674.
- Vidal, J., Buwalda, B., Koolhaas, J.M., 2011. Male Wistar rats are more susceptible to lasting social anxiety than Wild-type Groningen rats following social defeat stress during adolescence. *Behavioural Processes* 88, 76-80. doi:10.1016/j.beproc.2011.08.005.
- Wang, X.D., Chen, Y., Wolf, M., Wagner, K.V., Liebl, C., Scharf, S.H., Harbich, D., Mayer, B., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Müller, M.B., Schmidt, M.V., 2011. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiology of Disease* 42, 300-310. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.020.

Watt, M.J., Burke, A.R., Renner, K.J., Forster, G.L., 2009. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behavioral Neuroscience* 123, 564-576. doi: 10.1037/a0015752.

Yerkes, R.M., Dodson, J.D., 1908. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *Journal of Comparative Neurology and Psychology* 18, 459-482. doi: 10.1002/cne.920180503.

# **CAPÍTULO IV.**

## **EXPERIMENTOS 4 Y 5**

---

**Effects of several degrees of chronic social  
defeat stress on emotional and spatial  
memory in CD1 mice**

---

Publicado en (véase ANEXO II):

Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C (2016). Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice. *Behavioural Processes*. 124: 23-31.



#### **4.1. ABSTRACT**

In the present study, the effects of several degrees of CSDS (Chronic Social Defeat Stress) on emotional and spatial memory in mice were evaluated in separate experiments. Male CD1 mice were randomly assigned to four experimental groups (n = 10-12) for each experiment: NS (non-stressed), S5, S10 and S20 (5, 10 and 20 sessions of CSDS, respectively). The S groups underwent the corresponding number of agonistic encounters (10 min each) over a 20-day period. 24 h after the last session of CSDS, mice performed the inhibitory avoidance (experiment 1) or the Morris water maze test (experiment 2). In both experiments, animals were also evaluated in the elevated plus maze for 5 min to obtain complementary measures of locomotor activity and emotionality. The results showed that the highest degree of CSDS had impairing effects on inhibitory avoidance, while there were no significant differences between groups in the water maze. The S20 group exhibited higher anxiety levels in the elevated plus maze. No variations in locomotor activity were observed in any experiment. In conclusion, CSDS has a greater impact on emotional memory than on spatial memory. These negative effects of CSDS on memory do not seem to be secondary to the motor or emotional effects of stress.





## **4.2. INTRODUCTION**

Social stressors are the main source of stress in humans and contribute to the development and expression of diverse pathologies. Given that research on the behavioural, neurotransmitter and hormonal changes associated with long-term stress can involve highly invasive procedures, animal models are generally used (Blanchard et al., 1998). Conventional animal models of stress - including models of physical stress such as immobility and inescapable electric footshock - are quite removed from real-life situations, while those that involve a social context are more faithful recreations of reality (Martinez et al., 1998). It has been argued that models based on social conflict have clear advantages over environmental models because they involve a social form of stress, which is relevant to stress-induced psychopathology in humans (Krishnan et al., 2008; Sgoifo and Meerlo, 2002). Research on social stress in animals has traditionally employed specific models, of which the resident-intruder paradigm is one of the most popular (Björkqvist, 2001). The studies in question suggest that social defeat results in a large variety of symptoms, including behavioural, neuroendocrinological, physiological, neurochemical, neurological and immunological changes (Blanchard et al., 1998, 2001; Niebylski et al., 2012; Stefanski, 2001). Nowadays, chronic social defeat stress (CSDS) is an animal model widely used to emulate human diseases related to stress, such as anxiety (e.g. Toth and Neumann, 2013; Venzala et al., 2013; Vidal et al., 2011; Watt et al., 2009) and depression (e.g. Iñiguez et al., 2014; Venzala et al., 2012), in order to

determine the underlying mechanisms and identify pharmacological treatments.

Memory impairment can be an important negative consequence among the diverse effects produced by social stress. This impairment has previously been shown to be induced by CSDS in animal models (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011). For example, Ohl and Fuchs (1998, 1999) observed memory deficit in male tree shrews in a modified hole board task following exposure to CSDS. Touyarot et al. (2004) reported a marked deficit in spatial learning in the Morris water maze in highly-reactive-to-novelty rats undergoing a 21-day CSDS schedule. Wang et al. (2011) also observed impairments in the spatial memory of chronically stressed mice (21 daily encounters of CSDS) in a novel object recognition test and Y-maze.

Inhibitory avoidance (IA), also called passive avoidance, has been extensively employed to evaluate memory in animals (e.g. Gold, 1986; Heise, 1981; Izquierdo and Medina, 1997). This task mainly involves emotional memory. In the step-through version, used in the present and previous works carried out in our laboratory (e.g. Parra et al., 2013), the animal must avoid crossing to the dark compartment of a box in order to evade receiving a shock to the paws (Bureš et al., 1983).

Taking into account the effects of CSDS on memory reported in other memory paradigms (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011), we hypothesized that CSDS would have deleterious effects on IA in mice. Thus, in a previous study (Monleón

et al., 2015), we evaluated the effects of 21 sessions of 5-min or 10-min agonistic encounters of CSDS on IA in post-pubertal and adult male mice, using the CD1 strain for the stressed subjects instead of the C57BL/6J strain used in the CSDS standard protocol (Golden et al., 2011). A moderate degree of CSDS (5-min encounters) enhanced memory in post-pubertal but not in adult mice. However, a high degree of CSDS (10-min encounters) had a clear impairing effect, preventing the memory formation of IA in mice. These effects of CSDS on memory were not secondary to motor or emotional effects of stress. Furthermore, CD1 proved to be a valid strain of stressed mice in the CSDS model (Monleón et al., 2015).

The aim of the present work was to investigate the effects of several degrees of CSDS on emotional and spatial memory in mice. It is important to study the effects of different levels of CSDS, from light to severe, because humans are exposed to different degrees of social stress, and the CSDS paradigm is considered to be a model of the human condition. Taking into account the results obtained with the CSDS schedules used in our previous work (Monleón et al., 2015), in which the level of stress varied according to the duration of daily encounters (5 min vs 10 min), in the present study we decided to evaluate three degrees of CSDS by implementing different frequencies of 10-min encounters (the duration we had previously found to be effective in producing an impairing effect). Thus, the effects of three degrees (5, 10 or 20 encounters) of CSDS on performance in the inhibitory avoidance paradigm (experiment 1) and the Morris water maze (experiment 2) were evaluated in male mice. We employed the CD1 strain as stressed subjects in the protocol. The Morris water maze

is a test that relies on distal cues to navigate from starting locations around the perimeter of an open swimming arena to locate a submerged escape platform (Vorhees and Williams, 2006). This model was first established by neuroscientist Richard G. Morris in order to test hippocampal-dependent learning, including acquisition of spatial memory and long-term spatial memory (Morris, 1981). Since then, it has been a classic method to test spatial learning and memory function in rodents (e.g. D'Hooge and De Deyn, 2001). The effects of CSDS on the emotional memory of inhibitory avoidance learning and spatial memory in the Morris water maze can vary from those observed in other memory paradigms due to differences in the kind of memory (and the main brain region) involved.

In addition to the main tasks, our animals were assessed in an elevated plus maze in order to obtain complementary measures of locomotor activity and emotionality, taking into account that motor activity and anxiety can be confounding factors in the animals' performance of the main tasks.

### **4.3. MATERIAL AND METHODS**

#### **4.3.1. Subjects**

Post-pubertal (42 days) male CD1 mice (Charles River, Lyon, France) were used as experimental subjects in two separate experiments. The animals arrived at the laboratory weighing 30-39 g and were housed in groups of 4 in translucent plastic cages (height 14.5 cm, width 27 cm, length 27 cm) with roofs of stainless steel bars

(Panlab S.L., Barcelona, Spain). Male CD1 retired breeder mice of over 3 months of age (Janvier, France) were housed individually in similar cages in preparation for their use as aggressors. All the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $21\pm 2$  °C) under a reversed light-dark cycle (lights off: 07:30h-19:30h, local time) with food and water available ad libitum. Group-housed mice were marked for recognition by painting their fur with purple coloring. They were subjected to a stress treatment and to several behavioural tests during the dark phase of the cycle. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort caused to the animals. The experimental protocol and use of animals were in compliance with the European Community's Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and the Spanish Real Decreto 53/2013.

#### **4.3.2. Behavioural paradigms and apparatus**

A step-through inhibitory avoidance apparatus for mice (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy), which was located within an isolation box, was employed to evaluate emotional memory in Experiment 1. This cage is made of Perspex sheets and is divided into two compartments (both with height 15 cm, width 9.5 cm and length 16.5 cm), which are separated by a partition with an automatically operated sliding door. The floor is made of 48 stainless steel bars with a diameter of 0.7 mm and situated 8 mm apart. The safe compartment is white and continuously illuminated by a light fixture fastened to the cage lid (24 V, 10 W, light intensity of 290 lux at floor level, measured with the Panlux Electronic2 photometer manufactured by GOSSEN, Nürnberg,

Germany), whereas the “shock” compartment is made of black Perspex panels and is maintained in darkness at all times.

A Morris water maze apparatus for mice (Cibertec, Madrid, Spain) was employed for evaluating spatial memory in Experiment 2. This maze consists of a circle pool (1 m diameter) filled to a depth of 30 cm with water maintained at a constant temperature ( $24\pm 1$  °C). The floor is divided into four equal quadrants. A transparent plastic platform (6 x 6 cm<sup>2</sup>) was submerged 1 cm below the surface of the water in the northwest quadrant of the pool.

An elevated plus maze for mice (Cibertec, Madrid, Spain) was also applied to measure unconditioned anxiety-like behaviour and locomotor activity. This apparatus is composed of two open arms (30 x 5 cm<sup>2</sup> each) and two enclosed arms with walls (30 x 5 x 15 cm<sup>3</sup> each) that extend from a central common square (5 x 5 cm<sup>2</sup>). The maze is made of Plexiglas (black floor and walls) and is elevated to a height of 40 cm above floor level.

### **4.3.3. Procedure**

#### **Experiment 1 (Inhibitory avoidance)**

After 10 days of acclimatization to the animal facility, mice were randomly distributed into four groups (n = 10): NS (non-stressed or control group), S5 (5-day stressed group), S10 (10-day stressed group) and S20 (20-day stressed group).

A Chronic Social Defeat Stress (CSDS) paradigm was used as an animal model of social stress. In this paradigm, experimental male mice (stressed animals) are repeatedly subjected to bouts of social defeat

by a larger CD1 mouse that has screened positive for aggressive behaviour.

In a pre-stress phase, CD1 retired breeders were selected as aggressors based on their attack latencies and number of attacks launched during a 3-day screening procedure (attack latencies shorter than 60 s and 3 or more attacks in 3 minutes were the inclusion criteria for this screening).

In the CSDS phase, the stressed groups were submitted to different schedules on 20 consecutive days: the S5 group received a total of 5 SDS sessions (one every 4 days); the S10 group received a total of 10 SDS sessions (one every other day); and the S20 group received a total of 20 SDS sessions (one daily session). Following the guidelines of Golden et al. (2011), the protocol consisted of 10-min social defeats by a larger and aggressive mouse. In the agonistic encounters, each S mouse (also called the intruder) was placed in the home cage of an unfamiliar male (the aggressor, also called the resident). All the residents rapidly recognized and launched a first attack against the intruder within the 2 first minutes. Once the experimental mouse had been physically stressed by defeat during a 10-min period, both animals (intruder and resident) were maintained in sensory contact for 1 h by means of a wire mesh that divided the resident home cage into two halves. After this time, the intruder was returned to its home cage. In each subsequent defeat, experimental mice were exposed to a novel resident mouse. NS mice were also housed in pairs in an identical home cage set-up (a control animal on each side of the wire mesh) for 1 h per day throughout the 20-day

period. All control mice were rotated on a daily basis in a similar way to defeated mice. The body weight of animals was monitored before and after the CSDS procedure.

Twenty-four hours after the last CSDS session, control and stressed mice were submitted to a one-trial step-through inhibitory avoidance task, which was the main behavioural test employed in Experiment 1. This task consisted of two phases: training and test. The training phase began with a 90-s adaptation period in the light compartment of the apparatus. Following this, the door between the compartments was opened and the time taken to enter the dark compartment -defined as latency- was automatically measured in tenths of a second and manually recorded. The mouse was allowed to remain in the light compartment for a maximum of 300 s after the door was opened. As soon as the animal entered the dark compartment, the sliding door was closed and a foot-shock (0.3 mA for 5 s) was delivered through the grid floor. The test phase took place one week later, following the same procedure as in the training phase, with the exception that no shock was delivered.

Twenty-four hours after the test phase of the inhibitory avoidance task, control and stressed mice were evaluated in an elevated plus maze as a complementary behavioural test, as in previous studies carried out in our laboratory (e.g. Monleón et al., 2015; Vinader-Caerols et al., 2006). This task consisted of a 5-min session that began by placing the mouse in the central square (facing one of the open arms). All sessions were recorded by a video camera (Sony DCR-SR35) for subsequent analysis. The number of entries into the open and



closed arms (entry is defined as all four paws being placed on an arm) was scored by a trained observer who was unaware of the treatment applied. Based on former studies (File, 2001; Lister, 1987; Rodgers and Johnson, 1995), these scores provide measurements of locomotor activity (number of closed arm entries) and anxiety (percentage of open arm entries; the lower the score, the higher the anxiety).

### **Experiment 2 (Morris Water Maze)**

As in Experiment 1, after 10 days of acclimatization to the animal facility, another set of mice was randomly distributed between four groups: NS (non-stressed or control group) ( $n = 12$ ), S5 (5-day stressed group) ( $n = 12$ ), S10 (10-day stressed group) ( $n = 10$ ) and S20 (20-day stressed group) ( $n = 11$ ). In the pre-stress phase, different CD1 retired breeders to those of Experiment 1 were selected as aggressors according to a 3-day screening procedure (following the inclusion criteria described in Experiment 1). In the CSDS phase, the stressed groups were submitted to their respective schedules on 20 consecutive days (see section 2.3.1.).

Twenty-four hours after the last CSDS session, control and stressed mice were submitted to the Morris water maze, which was the main behavioural test of Experiment 2. The task was processed following a protocol previously used by our group (Vinader-Caerols et al., 2002) and other researchers (e.g. Vicens et al., 1999). This protocol consisted of two phases: an acquisition phase (with the hidden platform), followed by a probe trial (without the platform). The platform was fixed in the middle of the northwest quadrant. The acquisition phase was carried out during four consecutive days, and

each session began by placing the animal on the hidden platform for 30 s. Mice were given four trials per session, with a 30 s inter-trial interval. Each trial started by placing the subject with its nose facing the wall of a different quadrant. Animals were allowed to swim 60 s to find the hidden platform. When successful, the mouse remained on the platform for 30 s. The time to find the hidden platform in each trial was recorded as escape latency (in seconds). If unsuccessful within the cut-off time, the mouse was assigned a score of 60 s and was physically placed on the platform for 30 s. During the inter-trial interval, animals were placed on a dry bed under the heat of a dim light bulb, and were allowed to rest for 30 s. On the fifth day, mice underwent the probe trial for 60 s during which the platform was removed. The time that the animal spent in the goal quadrant (northwest quadrant), where the platform was placed during the acquisition phase, was recorded as an index of spatial memory. All trials were recorded by a video camera (Sony DCR-SR35) for subsequent analysis using the "Raton time" software.

Twenty-four hours after the probe trial of the water maze task, control and defeated mice were evaluated in the elevated plus maze as a complementary behavioural test, following the procedure described in Experiment 1. All the procedures of both experiments were carried out during the dark phase of the light/dark cycle.

#### **4.3.4. Statistical analysis**

Inhibitory avoidance data were transformed into proportion ( $p = x/300$ ) values and then to arc sin ( $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ) values according to Snedecor & Cochran (1980). This transformation is appropriate when

a cut-off time is applied, and crossing latencies that exceed this limit are interpreted as the maximum trial length. Therefore, all latencies are transformed into percentage or proportion values, and these percentages ( $p$ ) are then transformed to arc sin (degree) values (according to the formula:  $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ) prior to statistical analysis and graphical constructions. A two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) was performed for the factor Phase (training and test). One-way ANOVAs for training and test phases were also performed separately. Training and test sessions were compared within the same group using the Student's  $t$  test for dependent samples. Tukey tests were employed for post-hoc comparisons.

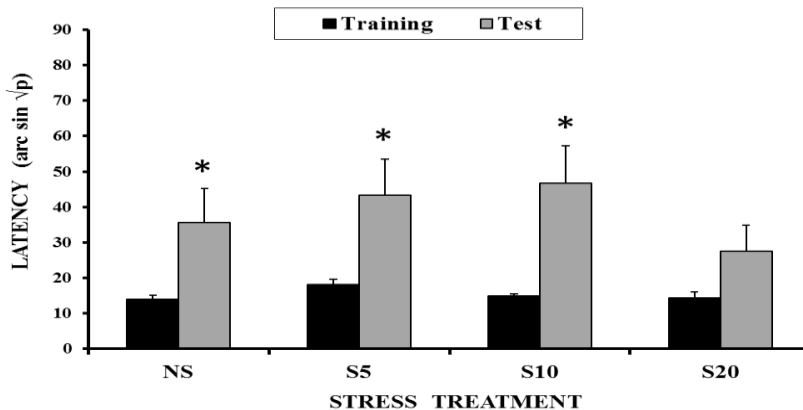
Factorial and one-way ANOVAs were applied to MWM data in order to analyse the differences between groups across the 4 days of the acquisition phase and during the probe test. After checking that data fulfilled the criteria for normality and homogeneity, analyses of variance were also carried out for the locomotor activity and anxiety data obtained in the elevated plus maze. Tukey tests were employed for post-hoc comparisons. All analyses were performed using the "SPSS" software package, version 19 for windows by IBM (2010).

## **4.4. RESULTS**

### **4.4.1. Experiment 1**

***Inhibitory avoidance:*** The two-way repeated measures ANOVA showed that the factor Phase was statistically significant ( $F_{1,36}=24.05$ ,  $p<0.001$ ), with test latencies being higher than training latencies.

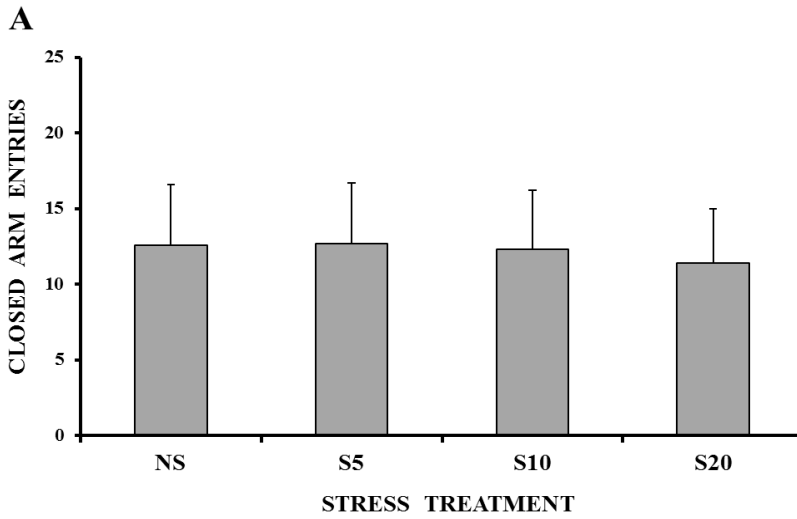
Neither the factor Treatment nor the interaction Treatment X Phase was statistically significant ( $F_{3,36}=0.94$ ,  $p=0.43$ ;  $F_{3,36}=0.69$ ,  $p=0.56$ ; respectively). The one-way ANOVA within each phase did not reveal statistically significant differences among the treatment groups in the Training phase ( $F_{3,36}=1.97$ ,  $p=0.14$ ) or in the Test phase ( $F_{3,36}=0.81$ ,  $p=0.50$ ). However, when training and test latencies were compared, inhibitory avoidance learning was observed in the NS, S5 and S10 groups ( $p<0.05$ , in all cases) but not in the S20 group ( $p>0.05$ ) (see Fig. 17).

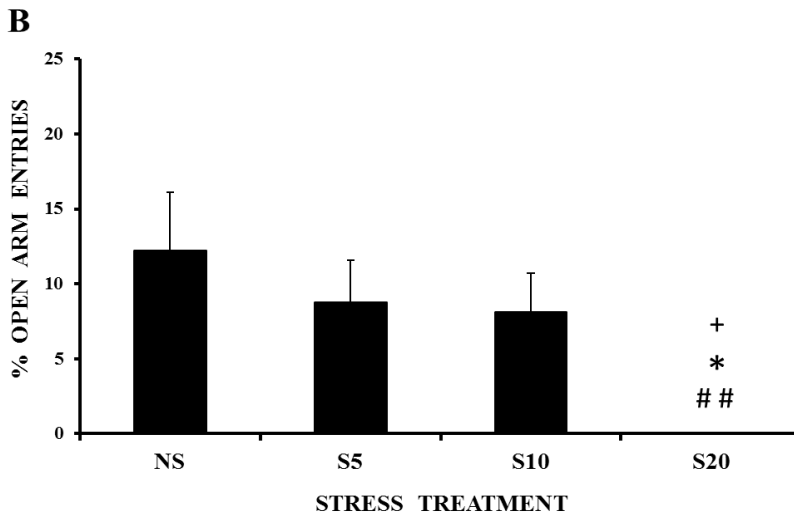


**Fig. 17.** Effects of several degrees of CSDS on latencies of male post-pubertal CD1 mice ( $n = 10$ ) in an inhibitory avoidance task (Experiment 1). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p = x/300$ ) transformed to arc sin. \* $p<0.05$  vs Training phase.

**Elevated plus maze:** No statistically significant differences were observed among the treatment groups with respect to locomotor activity (number of entries in enclosed arms) ( $F_{3,36}=0.27$ ,  $p=0.85$ ) (see Fig. 18A). However, one-way ANOVA revealed significant differences in anxiety (percentage of open arm entries) ( $F_{3,36}=5.285$ ,

$p < 0.01$ ). The post hoc analysis revealed significantly lower scores in the S20 group than in the control group ( $p < 0.01$ ), the S5 group ( $p < 0.05$ ) and the S10 group ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 18B).



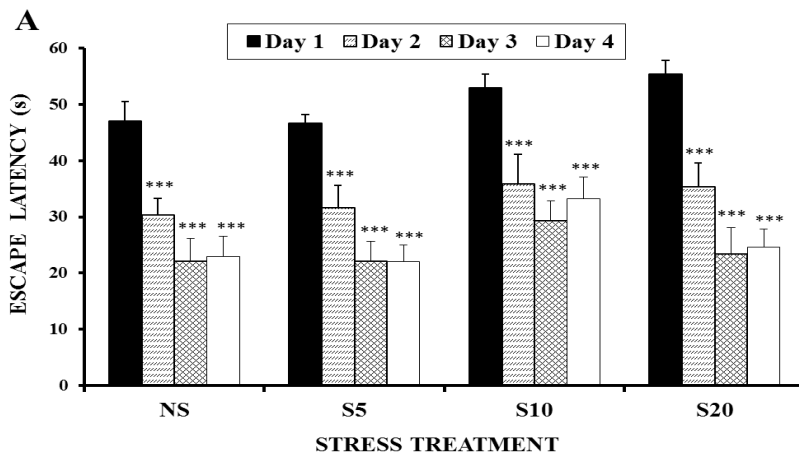


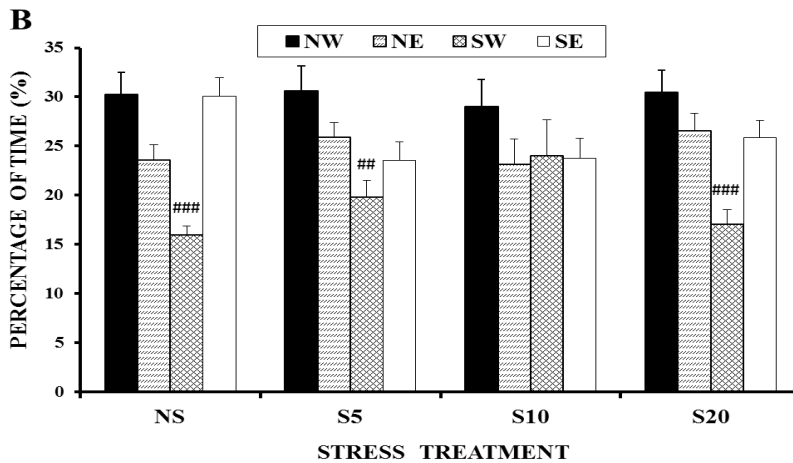
**Fig. 18.** Effects of several degrees of CSDS on measurements of male post-pubertal CD1 mice ( $n = 10$ ) in an elevated plus maze task (Experiment 1). A: locomotor activity measurement (number of closed arm entries). B: anxiety measurement (percentage of open arm entries). Values are expressed as means ( $\pm$ SEM). ##  $p < 0.01$  vs NS group; \*  $p < 0.05$  vs S5 group; +  $p < 0.05$  vs S10 group.

#### 4.4.2. Experiment 2

**Morris water maze:** During the acquisition phase, the factorial ANOVA showed that the factor Day was statistically significant ( $F_{1,41}=214.21$ ,  $p < 0.001$ ), with significantly different latencies observed between the first day and all the other days ( $p < 0.01$ , in all cases). Neither the factor Treatment nor the interaction Treatment X Day was statistically significant ( $F_{3,41}=2.00$ ,  $p=0.13$ ;  $F_{3,41}=1.79$ ,  $p = 0.16$ ; respectively). The one-way ANOVA within each day did not reveal statistically significant differences among the treatment groups on any day (day 1:  $F_{3,41}=2.83$ ,  $p=0.06$ ; day 2:  $F_{3,41}=0.43$ ,  $p=0.73$ ; day 3:

$F_{3,41}=0.66, p=0.58$ .; day 4:  $F_{3,41}=2.12, p=0.11$ ). Within each group, escape latencies decreased during the acquisition phase, with significant differences between the first day and any other day ( $p<0.01$ , in all cases), indicating spatial learning in all groups during this phase (see Fig. 19A).





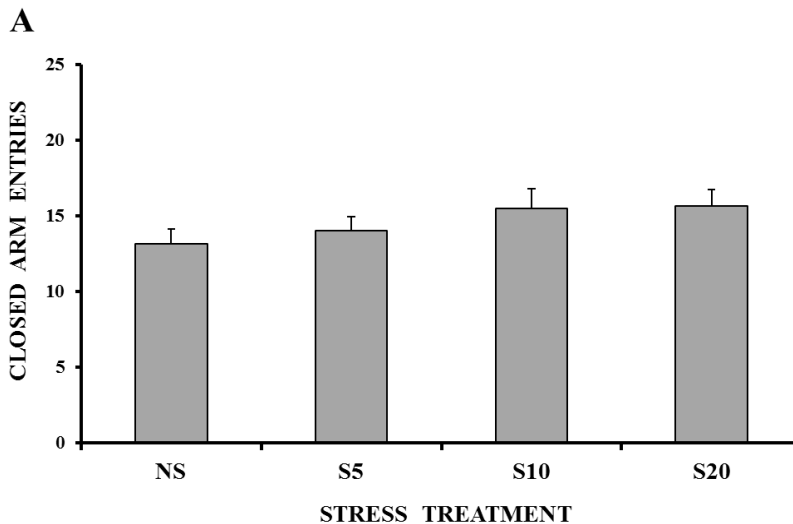
**Fig. 19.** Effects of several degrees of CSDS on measurements of male post-pubertal CD1 mice ( $n = 10-12$ ) in a Morris water maze task (Experiment 2). A: escape latencies in the acquisition phase (with platform). B: time spent (percentage) in each quadrant during the probe trial (without platform). NW (northwest) = goal quadrant (location of platform in acquisition phase). Values are expressed as means (+SEM). \*\*\* $p < 0.001$  vs Day 1; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs NW.

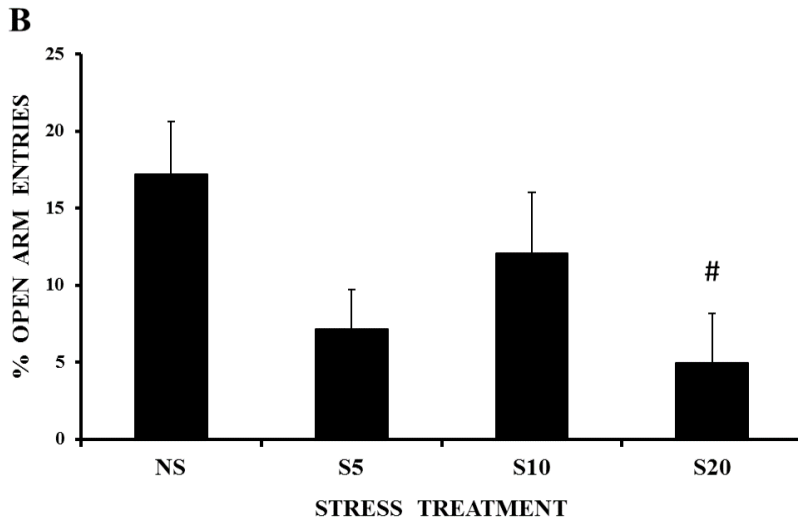
During the probe test, the factorial ANOVA showed that the factor Quadrant was statistically significant ( $F_{1,41}=8.21$ ,  $p < 0.01$ ), with significant differences between the time spent in the goal quadrant and that spent in the others ( $p < 0.05$ , in all cases). Neither the factor Treatment nor the interaction Treatment X Quadrant was statistically significant ( $F_{3,41}=1.91$ ,  $p=0.14$ ;  $F_{3,41}=0.47$ ,  $p=0.70$ ; respectively). The one-way ANOVA did not reveal statistically significant differences among the treatment groups in the percentage of time they spent in the goal quadrant (northwest quadrant) ( $F_{3,41}=0.09$ ,  $p=0.96$ ). Within



each group, comparing the time spent in the goal quadrant to the others, only the S10 group did not show any statistically significant difference between the goal and other quadrant (see Fig. 19B).

***Elevated plus maze:*** No statistically significant differences were observed among the treatment groups with regard to locomotor activity (number of entries in enclosed arms ( $F_{3,46}=1.44$ ,  $p=0.25$ ) (see Fig. 20A). However, one-way ANOVA revealed significant differences in anxiety (percentage of open arm entries) ( $F_{3,41}=5.17$ ,  $p<0.05$ ). The post hoc analysis revealed significantly lower scores in the S20 group than in the control group ( $p<0.05$ ), while differences with the rest of the groups were non-significant ( $p>0.05$  in all cases) (see Fig. 20B).





**Fig. 20.** Effects of several degrees of CSDS on measurements of male post-pubertal CD1 mice ( $n = 10-12$ ) in an elevated plus maze task (Experiment 2). A: locomotor activity measurement (number of closed arm entries). B: anxiety measurement (percentage of open arm entries). Values are expressed as means (+SEM). # $p < 0.05$  vs NS group.

#### 4.5. DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the effects of several degrees of CSDS on emotional and spatial memory in post-pubertal mice. General parameters of the CSDS standard protocol (Golden et al., 2011) were implemented, using three different degrees of social stress.

In Experiment 1, the highest degree of CSDS (20 SDS sessions) prevented inhibitory avoidance conditioning, in contrast with that observed in the control group and the groups subjected to a lesser degree of stress (S5 and S10 groups), in which inhibitory avoidance

learning was observed. Thus, the degree of stress experienced by animals would seem to be an important factor with respect to its consequences. In a previous study, we detected enhanced inhibitory avoidance conditioning in post-pubertal mice after 21 consecutive days of CSDS when the animals were exposed to 5-min sessions, whilst memory impairment was observed when the encounters lasted 10 min (Monleón et al., 2015), which is in line with the detrimental effects of CSDS observed in the S20 group in the present study. According to the classic Yerkes-Dodson inverted U-shaped performance law (Yerkes and Dodson, 1908), there is an optimal amount of arousal for performance, and when arousal or stress is lower or higher than this optimal level, performance is poorer. The stress degree inflicted with daily 5-min sessions, along with the low difficulty of the task (less difficult tasks have higher levels of optimal arousal) can produce scores in the ascending limb of the curve, which would result in an improvement in the performance of the stressed animals. However, the stress degree of daily 10-min sessions would be in the descending limb of the inverted U-shaped curve, which should result in memory impairment.

Memory impairment is an important negative consequence among the diverse effects produced by CSDS, and has previously been reported in animal tests other than inhibitory avoidance (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011). Several explanations of the neurobiology of these effects have been proposed, such as neuritic atrophy, reduced neurogenesis and decreased neurotrophin levels in the hippocampus, as well as changes in the levels of brain-derived neurotrophic factor within the basolateral amygdala (Krishnan, 2014). The amygdala, as the main brain region

involved in the emotional memory of inhibitory avoidance, is possibly also the most important structure affected by the effects of CSDS on inhibitory avoidance learning.

In Experiment 2, all the groups learned to find the hidden platform in a similar way during the acquisition phase of the water maze test. In addition, during the probe phase, all animals remained longer in the quadrant where the platform had been hidden during training than in the other quadrants, with the exception of S10 group (where the differences were not statistically significant). Nevertheless, during this phase, there were no differences in the time spent by the treatment groups in the goal quadrant. Therefore, every stressed group learned the spatial task in the present study. As mentioned above, other authors have reported impairment of spatial learning in rats in the Morris water maze after 21 days of CSDS (Touyarot et al., 2004). However, other studies in mice have reported no significant impairments in learning ability or reference memory in defeated subjects using the same task (Yu et al., 2011; Zhao et al., 2013), which is in accordance with the present study. In fact, cholinergic neurotransmission, which is critical for determining spatial memory function (D'Hooge and De Deyn 2001), has not been found to be impaired by social stress (Zhao et al., 2013), which is also consistent with our results.

These findings suggest that social stress has a differential impact depending on the brain structure and the behavioural processes being evaluated. Indeed, stress can produce diverse effects on cognitive functions depending on the stress paradigm in question, the intensity

and duration of the stressors, the learning tasks applied and the intervals between stress exposure and learning/memory tests (Sandi and Pinelo-Nava, 2007). The amygdala is a brain region known to be a primary locus for emotional memory (Dere et al., 2010; McGaugh and Roozendaal, 2002; Maren and Quirk 2004; Phelps and LeDoux, 2005; Roozendaal et al., 2009). In fact, the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) is a brain area that enables hormones and drugs to influence memory consolidation in emotionally-arousing tasks (McGaugh, 2002; McGaugh et al., 1996; McIntyre et al., 2012; Roesler and McGaugh, 2010). On the other hand, the hippocampus is crucial for the spatial memory involved in the water maze task (Redish and Touretzky, 1998). To a lesser degree, the amygdala is also linked to this spatial task. An increased metabolism of BLA has been observed during the first day of the acquisition phase of the water maze task, which suggests that amygdala is related to the emotional aspects of the task (Conejo et al., 2010). This would seem to be due to the novelty of the task, which can be stressful at first, but not to a change produced by the task itself, as in the case of hippocampus (Conejo et al., 2010). Actually, the apparent discrepancy between our results and those reported by Touyarot et al. (2004) could lie in the fact that the deficit in spatial learning produced by CSDS was observed only in their highly-reactive-to-novelty rats (but not in low-reactive-to-novelty rats). Furthermore, other variables could also have contributed to these different results, such as species (rats vs mice), apparatus (different water maze size) or procedure (number/duration of daily trials, latency cut-off, etc.).

Although it is known that hippocampal neurons are sensitive to stress (Rot et al., 2009), and especially to the long-term damaging influence of glucocorticoids (see Badowska-Szalewska et al., 2010), while performance in the water maze task is mediated by the hippocampus, the behavioural impact of stress can vary depending on the hippocampal area most affected. Therefore, whereas the inhibitory avoidance test involves mainly the amygdala, a structure strongly linked to emotional memory, the Morris water maze test targets hippocampus-related memory performance, which could reflect spatial memory and be more heavily dependent on the area most affected by social stress.

In relation to motor activity, our stressed mice did not show significant differences in spontaneous locomotor activity in the two experiments performed in this work, which is in accordance with previous results obtained in our laboratory (Monleón et al., 2015). This lack of motor effects was evident, not only in the elevated plus-maze task (in which no differences were observed in the number of entries in closed arms), but also in the inhibitory avoidance task, as no statistically significant differences were observed among the groups in terms of their training latencies. Therefore, it can be concluded that the effects of CSDS on memory were not secondary to motor effects of stress.

In both experiments of the present study, CSDS resulted in changes in anxiety between the S20 and the NS group, with the former exhibiting more anxiety-like behaviour. This increase in anxiety-like behaviours induced by CSDS has also been reported in previous studies

in mice (Berton et al., 2006; Kinsey et al., 2007; Krishnan et al., 2007; Razzoli et al., 2011), although a lack of enhancement has also been reported (Martinez et al., 1998). In our study, differences in emotionality were detected in animals subjected to the highest degree of stress, which displayed higher anxiety levels (i.e. lower percentage of open arm entries). Anxiety, as well as motor activity, could act as a confounding factor in the effects of CSDS on memory. However, the higher level of anxiety/fear of stressed animals might have resulted in these subjects taking longer to enter the dangerous compartment; as a consequence, their inhibitory avoidance performance would have improved. However, despite their enhanced anxiety, the stressed mice in the S20 group did not display any inhibitory avoidance. Therefore, we believe that the effects of CSDS on memory are not secondary to its effects on anxiety.

#### **4.6. CONCLUSIONS**

The present study shows that: i) CSDS impairs emotional memory involved in inhibitory avoidance in mice; ii) Emotional memory impairment is produced by a high (20 sessions) but not by a low (5 sessions) or moderate (10 sessions) degree of CSDS; iii) CSDS has no detrimental effects on the spatial memory of mice in the water maze; iv) The negative effects of CSDS on memory are not secondary to the motor effects of stress; v) The negative effects of CSDS on memory are not secondary to the emotional effects of stress; and vi) The CD1

strain of mice is confirmed to be valid for use as the stressed subjects in the CSDS protocol.

#### 4.7. REFERENCES

- Badowska-Szalewska, E., Spodnik, E., Klejbor, I., Morys, J., 2010. Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. *Acta. Neurobiol. Exp.* 70, 370–381.
- Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120972>.
- Blanchard, R.J., Hebert, M., Sakai, R.R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., McEwen, B.S., Blanchard, D.C., 1998. Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggress. Behav.* 24, 307–321, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO;2-F).
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* 73, 261–271, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8).
- Björkqvist, K., 2001. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol. Behav.* 73, 435–442, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00490-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00490-5).
- Bureš, J., Burešová, O., Huston, J.P., 1983. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour*, Elsevier, Amsterdam.
- Conejo, N.M., González-Pardo, H., González-Lima, F., Arias, J.L., 2010. Spatial learning of the water maze: progression of brain circuits mapped with cytochrome oxidase histochemistry. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 362–371, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.002>.
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P., 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain. Res. Rev.* 36, 60–90, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4).
- Dere, E., Zlomuzica, A., De Souza Silva, M.A., Ruocco, L.A., Sadile, A.G., Huston, J.P., 2010. Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behav. Brain. Res.* 215, 209–220, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.045>.



- File, S.E., 2001. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain. Res.* 125, 151–157, [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00292-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00292-3).
- Golden, S.A., Covington, H.E., Berton, O., Russo, S.J., 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* 6, 1183–1191, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.
- Gold, P.E., 1986. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural. Biol.* 46, 87–98, [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)90927-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-1047(86)90927-1).
- Heise, G.A., 1981. Learning and memory facilitators: Experimental definition and current status. *Trends. Cogn. Sci.* 2, 158–160, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147\(81\)90297-2](http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147(81)90297-2).
- IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp. (Released 2010).
- Iñiguez, S.D., Riggs, L.M., Nieto, S.J., Dayrit, G., Zamora, N.N., Shawhan, K.L., Cruz, B., Warren, B.L., 2014. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 17, 247–255, <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2014.910650>.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 25, 1–9, <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>.
- Kinsey, S.G., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Padgett, D.A., Avitsur, R., 2007. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behaviour and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain. Behav. Immun.* 21, 458–466, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.001>.
- Krishnan, V., 2014. Defeating the fear: new insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Exp. Neurol.* 261, 412–416, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.012>.
- Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J., 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131, 391–404, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>.
- Krishnan, V., Berton, O., Nestler, E., 2008. The use of animal models in psychiatric research and treatment. *Am. J. Psychiatry.* 165, 1109, <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08071076>.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–185, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00177912>.
- Maren, S., Quirk, G.J., 2004. Neuronal signaling of fear memory. *Nature* 5, 844–852.
- Martinez, M., Calvo-Torrent, A., Pico-Alfonso, M.A., 1998. Social Defeat and Subordination as Models of Social Stress in Laboratory Rodents: A Review. *Aggress.*

- Behav. 24, 241–256, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M).
- McGaugh, J.L., 2002. Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends. Neurosci.* 25, 456–461, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02211-7).
- McGaugh, J.L., Cahill, L., Roozendaal, B., 1996. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13508–13514.
- McGaugh, J.L., Roozendaal, B., 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 205–210, [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00306-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00306-9).
- McIntyre, C.K., McGaugh, J.L., Williams, C.L., 2012. Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1750–1762, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.11.001>.
- Monleón, S., Duque, A., Vinader-Caerols, C., 2015. Effects of chronic social defeat stress on memory in post-pubertal and adult CD1 mice. *Behav. Process.* 115, 64–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2015.03.003>.
- Morris, R.G.M., 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239–260, [http://dx.doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](http://dx.doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5).
- Niebylski, A., Bocolini, A., Bensi, N., Binotti, S., Hansen, C., Yaciuk, R., Gauna, H., 2012. Neuroendocrine changes and natriuresis in response to social stress in rats. *Stress Health* 28, 179–185, <http://dx.doi.org/10.1002/smi.1411>.
- Ohl, F., Fuchs, E., 1998. Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 319–323, [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00033-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00033-5).
- Ohl, F., Fuchs, E., 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive. Brain. Res.* 7, 379–387, [http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6410\(98\)00042-1](http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6410(98)00042-1).
- Parra, A., Rama, E., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., 2013. Inhibitory avoidance in CD1 mice: Sex matters, as does the supplier. *Behav. Process.* 100, 36–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2013.07.011>.
- Phelps, E.A., LeDoux, J.E., 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175–187, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025>.
- Razzoli, M., Carboni, L., Andreoli, M., Ballottari, A., Arban, R., 2011. Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behav. Brain. Res.* 216, 100–108, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.014>.
- Redish, A.D., Touretzky, D.S., 1998. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural. Comput.* 10, 73–111.

- Roesler, R., McGaugh, J.L., 2010. Memory consolidation, in: Koob, G.F., Le Moal, M., Thompson, R.F. (Eds.), *Encyclopedia of behavioral neuroscience*. Academic Press, Oxford, p. 206–214.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 297–303, [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M).
- Roosendaal, B., McEwen, B.S., Chattarji, S., 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 423–433, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2651>.
- Rot, M.A.H., Mathew, S.J., Charney, D.S., 2009. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *Can. Med. Assoc. J.* 180, 305–313, <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.080697>.
- Sandi, C., Pinelo-Nava, M.T., 2007. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural. Plast.* 2007, ID 78970, <http://dx.doi.org/10.1155/2007/78970>.
- Sgoifo, A., Meerlo, P., 2002. Animal models of social stress: implications for the study of stress related pathologies in humans. *Stress* 5, 1–2, <http://dx.doi.org/10.1080/102538902900012314>.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1980. *Statistical Methods*. Ames: The Iowa State University Press.
- Stefanski, V., 2001. Effects of psychosocial stress or food restriction on body mass and blood cellular immunity in laboratory rats. *Stress Health* 17, 133–140, <http://dx.doi.org/10.1002/smi.894>.
- Toth, I., Neumann, I.D., 2013. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell. Tissue. Res.* 354, 107–118, <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>.
- Touyarot, K., Venero, C., Sandi, C., 2004. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29, 290–305, [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00031-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00031-3).
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., Delagrangé, P., Tordera, R.M., 2012. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* 224, 313–325, <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-012-2754-5>.
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., Tordera, R.M., 2013. Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur. Neuropsychopharm.* 23, 697–708, <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.05.010>.
- Vicens, P., Bernal, M.C., Carrasco, M.C., Redolat, R., 1999. Previous training in the water maze: differential effects in NMRI and C57BL mice. *Physiol. Behav.* 67, 197–203, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00059-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00059-1).
- Vidal, J., Buwalda, B., Koolhaas, J.M., 2011. Male Wistar rats are more susceptible to lasting social anxiety than Wild-type Groningen rats following social defeat stress

- during adolescence. *Behav. Process.* 88, 76–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2011.08.005>.
- Vinader-Caerols, C., Ferrer-Añó, A., Arenas, M.C., Monleón, S., Parra, A., 2002. La maprotilina anula las diferencias entre ratones machos y hembras en el laberinto de agua de Morris. *Psicothema* 14, 823–827.
- Vinader-Caerols, C., Martos, A., Monleón, S., Arenas, M.C., Parra, A., 2006. Acute effects of maprotiline on learning, anxiety, activity and analgesia in male and female mice. *Acta. Neurobiol. Exp.* 66, 23–31, <http://dx.doi.org/16617674>.
- Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1, 848–858, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
- Wang, X.D., Chen, Y., Wolf, M., Wagner, K.V., Liebl, C., Scharf, S.H., Harbich, D., Mayer, B., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Müller, M.B., Schmidt, M.V., 2011. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol. Dis.* 42, 300–310, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.020>.
- Watt, M.J., Burke, A.R., Renner, K.J., Forster, G.L., 2009. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav. Neurosci.* 123, 564–576, <http://dx.doi.org/10.1037/a0015752>.
- Yerkes, R.M., Dodson, J.D., 1908. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J. Comp. Neurol. Psychol.* 18, 459–482, <http://dx.doi.org/10.1002/cne.920180503>.
- Yu, T., Guo, M., Garza, J., Rendon, S., Sun, X.L., Zhang, W., Lu, X.Y., 2011. Cognitive and neural correlates of depression-like behavior in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 303–317, <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145710000945>.
- Zhao, T., Huang, G.B., Muna, S.S., Bagalkot, T.R., Jin, H.M., Chae, H.J., Chung, Y.C., 2013. Effects of chronic social defeat stress on behavior and choline acetyltransferase, 78-kDa glucose-regulated protein, and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein in adult mice. *Psychopharmacology* 228, 217–230, <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-013-3028-6>.

# **CAPÍTULO V.**

## **EXPERIMENTO 6**

---

**Effects of social stress and clomipramine on  
emotional memory in mice.**

---

Publicado en (véase ANEXO III):

Duque A, Vinader-Caerols C, Monleón S. (2016). Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 76: 225-233.



## **5.1. ABSTRACT**

We have previously observed impairing effects of social defeat stress (CSDS) on inhibitory avoidance (IA) in mice. Given the similarity between changes produced by social stress in animals and symptoms of certain human psychopathologies such as depression and anxiety, the effects of the antidepressant clomipramine on IA impairment produced by CSDS were evaluated in the present study. Male CD1 mice were randomly assigned to the groups: non-stressed+saline, non-stressed+clomipramine, stressed+saline and stressed+clomipramine. Stressed animals were subjected to daily agonistic encounters (10 min) in the home cage of the aggressor over a 20-day period. Just before each encounter, non-stressed and stressed mice were injected i.p. with saline or clomipramine (10 mg/kg) according to their experimental condition. 24 hours after the last CSDS session, all the mice were tested in a step-through IA task. In the IA training phase, animals were punished by a shock to the paw when they entered the dark compartment of the apparatus. In the IA test phase (one week later) the same procedure took place, but without shock. Complementary measures were obtained by evaluating all the animals in an elevated plus maze (locomotor activity and emotionality) and on a hot plate (analgesia). IA learning was confirmed in all groups except the stressed+saline group, which was the only one that exhibited higher anxiety levels. No variations were observed in either locomotor activity or analgesia. In conclusion, CSDS induces anxiety and impairs emotional memory in mice; the negative effects of CSDS on memory appear to be attenuated by clomipramine, and these detrimental effects do not seem to be secondary to the effects of CSDS on locomotor activity, emotionality or pain sensitivity.





## **5.2. INTRODUCTION**

Social stressors are the main source of stress in humans and contribute to the development and expression of diverse pathologies, representing a major risk factor for depression (e.g. Campeau et al., 2011). In fact, heightened stress reactivity and dysregulation of the HPA (hypothalamus-pituitary-adrenal) axis are some of the most consistent features in patients suffering from major depression (Holsboer, 2000; Gallagher et al., 2007; Holsboer and Ising, 2010), while remission of this pathology is associated with normalization of the HPA axis (Holsboer, 2000; Ising et al., 2007). Experimental studies that address the long-term effects of social stress, due to ethical and time constraints, often require the use of animal models (Tanaś et al., 2015). Social defeat stress in animals, defined as being defeated in confrontations with conspecific animals (Jin et al., 2015), is frequently induced by the resident/intruder paradigm (Björkqvist, 2001). This kind of stress has been reported to cause a variety of behavioral, neuroendocrinological, physiological, neurochemical, neurological and immunological changes (Blanchard et al., 2001; Buwalda et al., 2005; Niebylski et al., 2012) that resemble certain symptoms of human psychopathologies, such as depression and anxiety (Bartolomucci and Leopardi, 2009). Therefore, animal models based on social stress are becoming increasingly popular for studying the relation between stress and the aforementioned psychopathologies (Sgoifo and Meerlo, 2002; Wood et al., 2010). CSDS (chronic social defeat stress) is an animal model widely used nowadays to emulate human diseases related to stress, such as anxiety (e.g. Watt et al., 2009; Toth and Neumann,

2013) and depression (e.g. Venzala et al., 2012; Iñiguez et al., 2014), in order to determine the underlying mechanisms and identify potential pharmacological treatments. Memory impairment can be also an important negative consequence produced by stress (e.g. Trofimiuk et al., 2006), and has previously been shown to be induced by CSDS in several animal paradigms (Ohl and Fuchs 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011; Patki et al., 2013; Monleón et al., 2015, 2016). For example, Ohl and Fuchs (1998, 1999) observed memory deficit in a modified hole-board task in male tree shrews exposed to CSDS. Touyarot and others (2004) reported a deficit in spatial learning in the Morris water maze in highly-reactive-to-novelty rats undergoing a 21-day CSDS schedule. Wang and colleagues (2011) also reported impairments in the spatial memory of chronically stressed mice (21 daily encounters of CSDS) in novel object recognition and the Y-maze, while Patki and others (2013) observed worse long-term memory in socially defeated rats tested in a radial arm water maze task. Inhibitory avoidance (IA), or passive avoidance, is a common procedure used to evaluate memory in animals (Gold 1986), which mainly involves emotional memory. In the step-through version, which was employed in the present and previous studies carried out in our laboratory (e.g. Parra et al., 2000, 2010, 2013; Monleón et al., 2002, 2009, 2015, 2016; Everss et al., 2005; Arenas et al., 2006), the animal is punished by a shock to the paw when it enters the dark compartment, which leads to an inhibition of its behavioral response in order to evade receiving a future shock (Bureš et al., 1983). In previous studies using the CD1 strain as stressed subjects, in place of the C57BL/6J strain used in the standard protocol (Golden et al., 2011), we found that CSDS (a 3-week

period of 10-min daily sessions) prevented the formation of IA memory in post-pubertal mice. Furthermore, these effects of CSDS on memory were not secondary to motor or emotional effects of stress (Monleón et al., 2015, 2016). As previously mentioned, stress has long been linked to neuropsychiatric diseases, such as depression (Barden 2004). Memory impairment is also a symptom of depression (e.g. Ramponi et al., 2010), and, along with other symptoms, is reduced by antidepressant therapy (Antikainen et al., 2001). Thus, the aim of the present work was to investigate whether chronic antidepressant treatment reverses the memory impairment produced by CSDS. In rodents repeatedly exposed to social defeat, there is a decrease in volume and cell proliferation in the hippocampus that can be reversed by chronic antidepressant treatment (Czéh et al., 2007; Becker et al., 2008; Van Bokhoven et al., 2011). Clomipramine, a tricyclic antidepressant widely used to treat depression and obsessive compulsive disorder, has been shown to reverse the behavioral deficits and inhibition of cell proliferation in the adult hippocampus induced by chronic unpredictable stress (Liu et al., 2008, 2012). We have evaluated the effect of chronic clomipramine on IA impairment produced by CSDS in post-pubertal male CD1 mice, hypothesizing that clomipramine would reverse the negative effects of CSDS on memory. In addition to the IA task, our animals were assessed in an elevated plus maze and a hot plate in order to obtain complementary measures of locomotor activity, emotionality and analgesia, as they could be confounding factors in the animals' performance of the main task.

### **5.3. MATERIAL AND METHODS**

#### **5.3.1. Subjects**

Post-pubertal (42 days) male CD1 mice (Charles River, Lyon, France) were used as experimental subjects. The animals arrived at the laboratory weighing 30–43 g and were housed in groups of 4 or 5 in translucent plastic cages (height 14.5 cm, width 27 cm, length 27 cm) with roofs of stainless steel bars (Panlab S.L., Barcelona, Spain). Male CD1 retired breeder mice of over 3 months of age (Janvier, France) were housed individually in similar cages in preparation for their use as aggressors. All the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) under a reversed light-dark cycle (lights off: 7:30 a.m.–7:30 p.m., local time) with food and water available ad libitum. Group-housed mice were marked for recognition by painting their fur with purple coloring. The animals were subjected to a stress treatment and to several behavioral tests during the dark phase of the cycle. Adequate measures were taken to minimize any pain or discomfort caused to the animals and they were evaluated daily by veterinary personnel. The experimental protocol and use of animals were in compliance with the European Community's Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and the Spanish Real Decreto 53/2013.

#### **5.3.2. Drugs**

Clomipramine hydrochloride (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, Spain) was dissolved in physiological saline (0.9% NaCl) and

administered i.p. in a volume of 0.01ml/g body weight. The control groups received the same volume of physiological saline.

### **5.3.3. Behavioural paradigms and apparatus**

A step-through inhibitory avoidance apparatus for mice (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy), contained within an isolation box, was employed to evaluate memory. This cage is made of Perspex sheets and is divided into two compartments (both with a height of 15 cm, width of 9.5 cm, and length of 16.5 cm) separated by a partition with an automatically-operated sliding door. The floor is made of 48 stainless steel bars with a diameter of 0.7 mm and situated 8 mm apart. The safe compartment is white and continuously illuminated by a light fixture fastened to the cage lid (24 V, 10 W, light intensity of 290 lux at floor level, measured with the Panlux Electronic2 photometer manufactured by GOSSEN, Nürnberg, Germany), whereas the "shock" compartment is made of black Perspex panels and is maintained in darkness at all times.

An elevated plus maze for mice (Cibertec, Madrid, Spain) was applied to measure unconditioned anxiety-like behavior and locomotor activity. This apparatus consists of two open arms (30×5 cm<sup>2</sup> each) and two enclosed arms with walls (30×5×15 cm<sup>3</sup> each) that extend outwards from a common central square (5×5 cm<sup>2</sup>). The maze is made of Plexiglas (black floor and walls) and is elevated to a height of 40 cm above floor level.

To assess nociceptive perception, we employed a hot plate (Mod. Socrel DS37, Ugo Basile, Varese, Italy) consisting of a metal plate

(25×25 cm<sup>2</sup>) located above a thermoregulator and a plastic cylinder (height 18 cm and diameter 19 cm) made of Plexiglas.

#### **5.3.4. Procedure**

After 10 days of acclimatization to the animal facility, mice were randomly distributed into four groups (n=12–14): NS+SAL (non-stressed+saline), NS+CLO (non-stressed+clomipramine), S+SAL (stressed+saline) and S+CLO (stressed+clomipramine).

Following a modified version of the guidelines proposed by Golden and colleagues (2011), a Chronic Social Defeat Stress (CSDS) paradigm was used as an animal model of social stress. In this paradigm, experimental male mice (stressed animals) are repeatedly subjected to bouts of social defeat by a larger CD1 mouse that has screened positive for aggressive behavior. In a pre-stress phase, CD1 retired breeders were selected as aggressors based on their attack latencies and the number of attacks they had launched during a 3-day screening procedure (attack latencies shorter than 60 s and 3 or more attacks in 3 min were the aggressor inclusion criteria). A total number of 28 aggressors were finally selected in this pre-stress phase. In the CSDS phase, the stressed groups were submitted to a daily 10-min social defeat experience by a larger and aggressive mouse on 20 consecutive days. In the agonistic encounters, each stressed mouse (also called the intruder) was placed in the home cage of an unfamiliar male (the aggressor, also called the resident). All the residents rapidly recognized and launched a first attack against the intruder within the 2 first minutes. Once the experimental mouse had been physically stressed by defeat during a 10-min period, both animals (intruder and resident)

were maintained in sensory contact for 1 h by means of a clear perforated Plexiglas divider that divided the resident home cage into two halves. Subsequently, the intruder was returned to its home cage. In each subsequent defeat, experimental mice were exposed to a novel resident mouse. Just before each agonistic encounter, all stressed animals were injected daily i.p. with saline or clomipramine (10 mg/kg) according to their experimental condition. Non-stressed mice (NS+SAL and NS+CLO groups) were not submitted to any social exposure, and the only manipulation they underwent was the daily pharmacological treatment. The body weight of all animals was monitored before and after the CSDS procedure. Taking into account that social defeat involves physical aggression and wounding, defeated mice were evaluated daily by veterinary personnel. All the encounters were supervised by a blind experimenter and none needed to be terminated due to excessive aggression. Nevertheless, after successive encounters, and in accordance with criteria of the veterinary personnel in our laboratory, two intruders were removed from the experiment and immediately euthanized because of excessive wounding, as indicated in the protocol of Golden and others (2011).

Twenty-four hours after the last CSDS session, all mice were submitted to a one-trial step-through inhibitory avoidance task, which was the main behavioral test employed in the study. This task consisted of two phases: training and test. The training phase began with a 90-s adaptation period in the light compartment of the apparatus. Following this, the door between the compartments was opened and the time taken to enter the dark compartment – defined as latency – was automatically measured in tenths of a second and

manually recorded. The mouse was allowed to remain in the light compartment for a maximum of 300 s after the door had opened. As soon as the animal entered the dark compartment, the sliding door was closed and a foot-shock (0.3 mA for 5 s) was delivered through the grid floor. The test phase took place one week later, following the same procedure as in the training phase, with the exception that no shock was delivered.

Twenty-four hours after the test phase of the inhibitory avoidance task, control and stressed mice were evaluated in an elevated plus maze in a complementary behavioral test, as in previous studies carried out in our laboratory (e.g. Vinader-Caerols et al., 2006; Monleón et al., 2015, 2016). This task consisted of a 5-min session that began by placing the mouse in the central square (facing one of the open arms). All sessions were recorded with a video camera (Sony DCR-SR35) for subsequent analysis. The number of entries into the open and closed arms (entry is defined as all four paws being placed on an arm) was scored by a trained observer who was unaware of the treatment applied. Based on former studies (Lister, 1987; Rodgers and Johnson, 1995; Rodgers and Dalvi, 1997; File 2001; Campos et al., 2013; Sestakova et al., 2013), these scores provide an uncontaminated measurement of locomotor activity through the number of closed arm entries, and one primary anxiety index through the percentage of open arm entries (the lower the score, the higher the anxiety).

Twenty-four hours after the elevated plus maze test, all mice were evaluated on a hot plate as a second complementary behavioral test. The metal plate was heated through a thermoregulator to a fixed



temperature of 55°C (the surface temperature was continuously monitored). Each mouse was placed on the hot plate inside a plastic cylinder to confine it to the heated surface. The latency to the lifting of one or both hind paws was recorded in seconds (s) and provided a nociceptive measurement (the lower the score, the higher the nociception). The animals that failed to lift their paws within 45 s were removed from the plate (to avoid thermal injury) and were assigned a response latency value of 45 s.

### **5.3.5. Statistical analysis**

Inhibitory avoidance data were transformed into proportion ( $p=x/300$ ) values and then to arc sin ( $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ) values according to Snedecor and Cochran (1980). This transformation is appropriate when a cut-off time is applied, and crossing latencies that exceed this limit are interpreted as the maximum trial length. Therefore, all latencies are transformed into a percentage or proportion values, and these percentages ( $p$ ) are then transformed to arc sin (degree) values (according to the formula:  $\text{arc sin } \sqrt{p}$ ) prior to statistical analysis and graphical constructions. A repeated measures analysis of variance (rANOVA) was then performed, with "Stress" (non-stressed and stressed) and "Drug" (saline and clomipramine) as between-subjects factors and "Phase" (training and test) as a within-subject factor (the repeated-measure factor). Two-way ANOVAs for training and test phases were also performed separately. Training and test sessions were compared within the same group using the Student's  $t$  test for dependent samples.

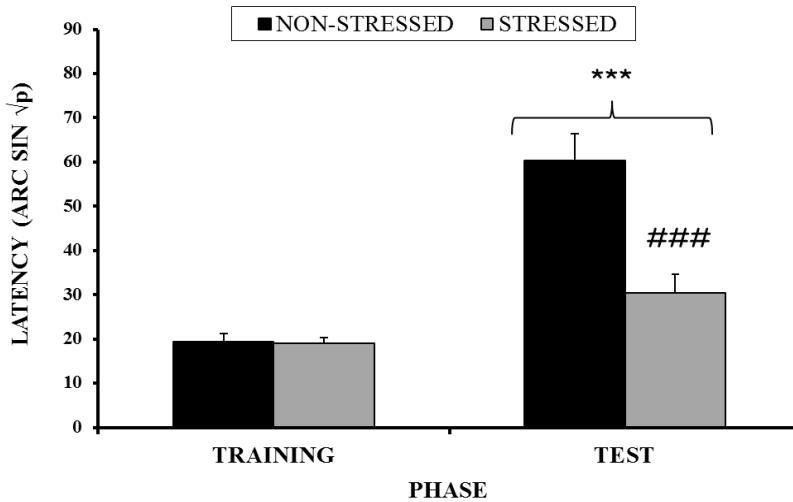
After checking that data fulfilled the criteria for normality and homogeneity, two-way ANOVAs were also carried out for the anxiety, locomotor activity and nociception data obtained in the elevated plus-maze and hot plate tests. The p value for statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

All analyses were performed using the "SPSS" software package, version 22 for windows by IBM Corp (2010).

## **5.4. RESULTS**

### **5.4.1. Inhibitory avoidance**

The rANOVA revealed that the main factor Phase was statistically significant ( $F_{1,47}=53.25$ ,  $p < 0.001$ ), with test latencies being longer than training latencies. The main factor Stress ( $F_{1,47}=12.11$ ,  $p < 0.001$ ) was also statistically significant, with stressed animals showing significantly lower escape latencies than non-stressed subjects. The interaction Phase X Stress was statistically significant ( $F_{1,47}=16.53$ ,  $p < 0.001$ ), showing that there were differences in escape latencies between non-stressed and stressed mice in the test phase but not in the training phase (see Fig. 21). Neither the main factor Drug ( $F_{1,47}=0.43$ , n.s.) nor any interaction involving this factor was statistically significant (Phase X Drug:  $F_{1,47}=0.52$ , n.s.; Stress X Drug:  $F_{1,47}=0.03$ , n.s.; Phase X Stress X Drug:  $F_{1,47}=0.06$ , n.s.).



**Fig. 21.** Effects of CSDS on training and test latencies of post-pubertal male CD1 mice in an inhibitory avoidance task (non-stressed group:  $n=26$ ; stressed group:  $n=25$ ). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p=x/300$ ) transformed to arc sin. \*\*\* $p<0.001$  vs. TRAINING; ### $p<0.001$  vs. NON-STRESSED.

### ***Training phase***

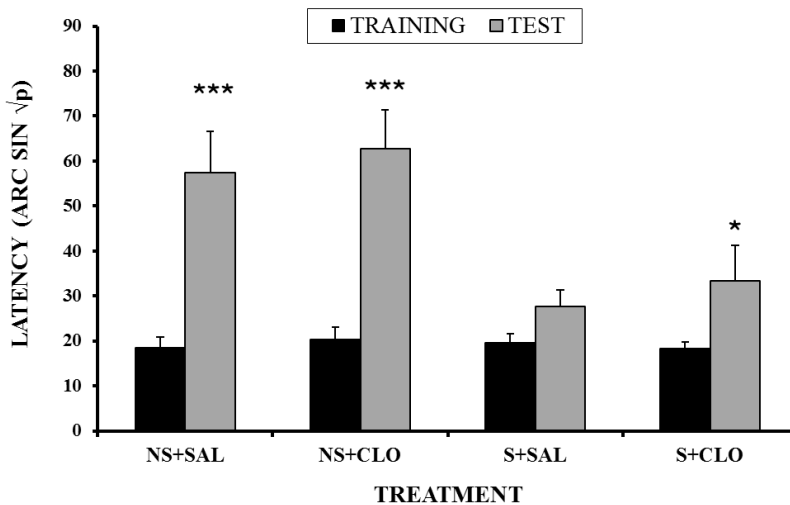
The two-way ANOVA for the training phase showed that the factors Stress and Drug were not statistically significant ( $F_{1,47}=0.04$ , n.s.;  $F_{1,47}=0.01$ , n.s.; respectively), and neither was the interaction Stress X Drug ( $F_{1,47}=0.51$ , n.s.).

### ***Test phase***

The two-way ANOVA for the test phase revealed that the main factor Stress was statistically significant ( $F_{1,47}=18.62$ ,  $p<0.001$ ), with stressed animals showing significantly lower test latencies than non-stressed subjects (see Fig. 1). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,47}=0.39$ , n.s.;  $F_{1,47}=0.01$ , n.s.; respectively).

### ***Training phase vs Test phase***

Inhibitory avoidance learning (significantly longer test latencies than training latencies) was observed in NS+SAL ( $p < 0.0001$ ), NS+CLO ( $p < 0.0001$ ) and S+CLO ( $p < 0.05$ ). However, inhibitory avoidance was absent in the S+SAL group ( $p > 0.05$ ) (see Fig. 22).

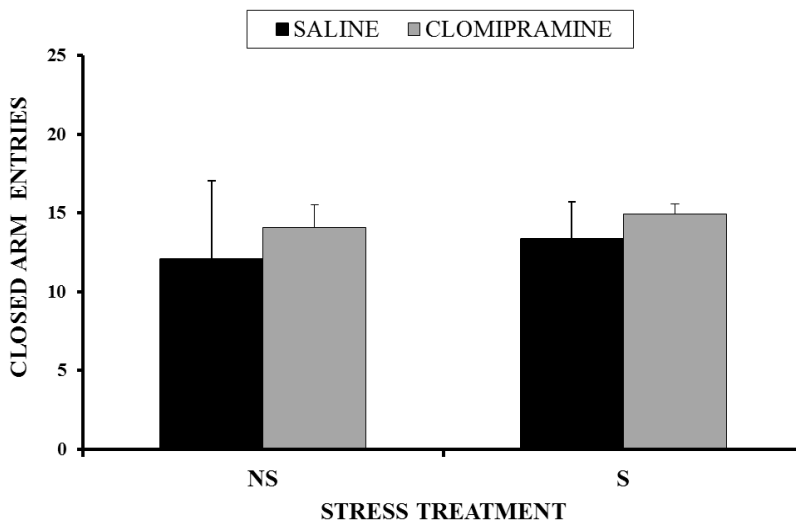


**Fig. 22.** Effects of CSDS and clomipramine on training and test latencies of post-pubertal male CD1 mice in an inhibitory avoidance task. NS+SAL=non-stressed+saline group (n=12); NS+CLO = non-stressed+clomipramine group (n=14); S+SAL = stressed+saline group (n=13); S+CLO = stressed+clomipramine group (n=12). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p=x/300$ ) transformed to arc sin. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. TRAINING.

### 5.4.2. Elevated Plus Maze

#### ***Locomotor Activity (number of entries in enclosed arms)***

Stress and Drug were not statistically significant ( $F_{1,47}=1.02$ , n.s.;  $F_{1,47}=2.75$ , n.s.; respectively), and neither was the interaction Stress X Drug ( $F_{1,47}=0.05$ , n.s.) (see Fig. 23).

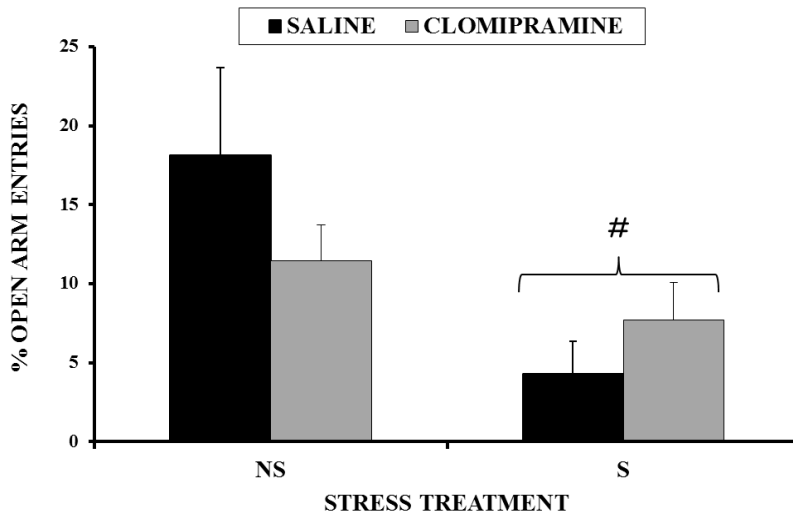


**Fig. 23.** Effects of CSDS and clomipramine on locomotor activity (number of closed arm entries) in post-pubertal male CD1 mice in an elevated plus maze task ( $n=12-14$  per group). Values are expressed as means (+SEM)

#### ***Anxiety (percentage of open arm entries)***

The two-way ANOVA showed significant differences in the measurement of anxiety, with the main factor - Stress - proving to be statistically significant ( $F_{1,47}=7.3$ ,  $p<0.05$ ) and significantly higher

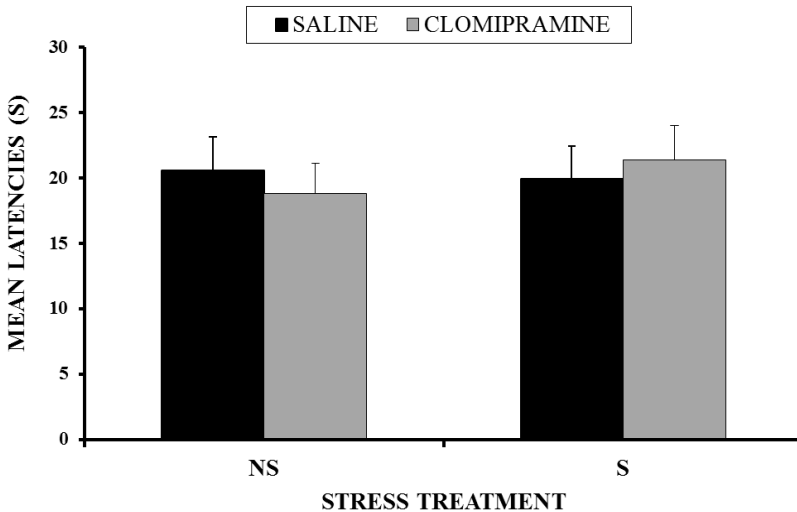
anxiety (lower scores) being detected in stressed vs. non-stressed subjects (see Fig. 24). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,47}=0.25$ , n.s.; and  $F_{1,47}= 2.41$ , n.s.; respectively).



**Fig. 24.** Effects of CSDS and clomipramine on anxiety (percentage of open arm entries) in post-pubertal male CD1 mice in an elevated plus maze task ( $n=12-14$  per group). Values are expressed as means (+SEM). # $p < 0.05$  vs. control (NON-STRESSED groups).

### 5.4.3. Hot Plate

No statistically significant differences were observed for either of the main factors -Stress or Drug ( $F_{1,47}=0.14$ , n.s.;  $F_{1,47}=0.01$ , n.s.; respectively)- or their interaction ( $F_{1,47}=0.41$ , n.s.) (see Fig. 25).



**Fig. 25.** Effects of CSDS and clomipramine on latencies to lift hind paws in post-pubertal male CD1 mice in a hot plate task (n=12–14 per group). Values are expressed as means (+SEM).

## 5.5. DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the effects of the tricyclic antidepressant clomipramine on IA impairment produced by CSDS in post-pubertal male CD1 mice. Overall, stressed subjects performed the IA task more poorly than non-stressed animals, regardless of whether they received saline or clomipramine treatment; and all the groups, with the exception of the non-drugged stressed animals (S+SAL group), showed IA learning.

In accordance with reports of the behavioral deficits, especially on memory, produced by CSDS in other paradigms (Ohl and Fuchs, 1998,

1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011; Patki et al., 2013), we have observed that CSDS impaired IA conditioning in post-pubertal mice: stressed subjects exhibited lower test latencies than non-stressed animals, which means that being submitted to CSDS had detrimental effects on their memory. Moreover, only non-drugged stressed animals failed to exhibit IA learning, unlike animals in the other groups, in which IA conditioning was confirmed. In relation to the memory processes most affected by CSDS, and taking into account that social stress was implemented before the memory task, we suspect that CSDS impaired mainly the memory acquisition process. Consolidation and retrieval memory processes were somehow less or not affected by CSDS, as social stress was no longer present (i.e. no agonistic encounters took place between training and test phases of the memory task). In this way, it could be said that CSDS impaired the learning rather than the memory of this task. The present results are also consistent with previous findings in our laboratory using the same degree of CSDS and the same behavioral task (but without pharmacological treatment), in which CSDS produced impairing effects on IA (Monleón et al., 2015, 2016). Several explanations in the neurobiology of these effects have been proposed, such as neuritic atrophy, reduced neurogenesis and decreased neurotrophin levels in the hippocampus, as well as changes in the levels of brain-derived neurotrophic factor within the basolateral amygdala (Krishnan, 2014). Actually, this structure is activated during emotional experiences that the individual perceives as anxiety, fear, stress and rage (Rogan and LeDoux, 1996). The amygdala, an important brain region involved in the control of affective stimuli (Lehner et al., 2010), including those



related to the emotional memory of IA, is possibly also the most important structure affected by the effects of CSDS on IA learning. It is well known that some emotional experiences mediated by the activation of amygdala are better remembered (e.g. McGaugh, 2002, 2004; Wolf, 2008). Nevertheless, it is also possible that this activation by CSDS is focused on fear-inhibiting pathways (Ehrlich et al., 2009), which prevented IA learning in the S+SAL group in our study.

The antidepressant clomipramine has been widely used to treat psychiatric disorders. Besides its use in depression, it is a reference treatment for anxiety disorders such as obsessive-compulsive disorder and panic disorder (Calegari et al., 2007). Unlike non-drugged stressed animals (S+SAL group), our stressed mice receiving clomipramine (S+CLO group) learned the IA task, which proves that chronic clomipramine treatment is effective in reversing the memory impairment produced by CSDS.

There are reports in the literature that pre-training administration of acute high doses (40 mg/kg) of clomipramine have detrimental effects on IA learning in mice, whilst chronic administration of lower doses (15 mg/kg) improves this kind of learning in rats (see Monleón et al., 2008). In the present study, chronic administration of clomipramine (10 mg/kg) did not have a significant effect when administered to non-stressed animals, but it counteracted the adverse effects of CSDS on memory when administered to defeated animals. It has also been repeatedly observed that infusions of norepinephrine into the amygdala enhance memory consolidation of a wide variety of training experiences (e.g. Hermans et al., 2014). Taking into account

that the amygdala is one of the main brain structures involved in the IA task, and that clomipramine, though more selective for serotonin reuptake inhibition, is involved in norepinephrine reuptake inhibition, it is reasonable to think that this drug is capable of reversing the negative effects produced by CSDS in the IA task. Indeed, given that stress is thought to induce a broad spectrum of behavioral changes considered as important analogues of depressive symptoms in both humans (e.g. Lavergne and Jay, 2010) and animals (e.g. Gardier, 2009; Lee and Kim, 2010), it is not surprising that the antidepressant clomipramine counteracts memory impairment produced by CSDS.

Spontaneous locomotor activity in our stressed mice was not affected by CSDS. Several studies have found that defeated animals commonly show a decrease in motor activity, with this hypo-activity being reported in several species, including rats (e.g. Watt et al., 2009), tree shrews (e.g. Van Kampen et al., 2000) and mice (e.g. Iñiguez et al., 2014). In contrast, other studies have reported no significant decrease in activity (Monleón et al., 2015, 2016) or hyperactivity (Venzala et al., 2013). The lack of motor effects observed in the present study was evident not only in the elevated plus-maze task (in which no differences were observed in the number of entries into the closed arms), but also in the IA task, as no statistically significant differences were observed between stressed and control mice in terms of their training latencies. Therefore, it can be concluded that the effects of CSDS on memory are not secondary to the motor effects of stress.

In the present study, CSDS led to changes in the anxiety measure between stressed and non-stressed animals, with socially defeated mice showing anxiety-like behavior (i.e., lower percentage of open arm entries). Some studies have found that social stress enhances anxiety-like behaviors of rats (Haller and Halasz, 2000) and mice (Bahi, 2013; Monleón et al., 2015, 2016) in the elevated plus-maze test, although others have failed to detect such an enhancement (Martinez et al., 1998). Anxiety could act as a confounding factor in the effects of CSDS on memory, which means that the higher level of anxiety/fear of stressed animals observed in the present study would have resulted in these subjects taking longer to enter the dangerous compartment; as a consequence, their IA performance would have improved. However, our stressed mice did not display IA learning. Thus, the effects of CSDS on memory would appear not to be secondary to its effects on anxiety, as occurs in the case of its motor effects. We observed no effects of chronic clomipramine treatment in either stressed or non-stressed animals in the elevated plus maze in the present study. It has been reported that the effects of clomipramine on heart rate, a physiological anxiety measure, depend on the dose administered (Frank et al., 2006). Therefore, it is reasonable to suspect that the lack of effects of clomipramine in reducing the anxiety symptoms of our stressed subjects was due to the dose of clomipramine administered.

It is important to confirm that CSDS does not increase animals' innate fear of light environments, as this could also act as a confounding factor in the effects of social stress on IA performance (an increased fear of light would lead to shorter escape latencies). This can be checked by a Light/Dark transition test (without shock). Although

such a Light/Dark test was not included in the present study, it can be argued that, if CSDS had increased the animals' innate fear of light, stressed subjects would have displayed shorter latencies than non-stressed mice in the training phase of the IA task (not only in the test phase). However, no significant differences in training latencies were observed between groups. Therefore, we believe that this potential confounding factor can be ruled out from our study.

A reduced pain perception is a classic effect produced by a variety of acute stressors in humans and animal models (Miguez et al., 2014). However, stress is reported to inhibit or exacerbate pain perception depending on the nature and/or parameters of the stressor (Butler and Finn, 2009). This dual action of stress on pain modulation depends to a great extent on pre-existing conditions, in particular previous pain experience associated with methodological factors, along with previous adverse life events (Larauche et al., 2012). In our study, pain sensitivity in chronically defeated mice was indistinguishable from that in non-defeated controls. Therefore, similarly to the rationale applied to motor and emotional effects, we consider that the effects of CSDS on memory are not secondary to its effects on pain sensitivity.

As with any research, our study has limitations and strengths. From our point of view, the main limitation of the present experiment is the use of a single dose of clomipramine, as testing a wider range of doses would have been ideal. We selected a single dose of clomipramine due to limitations in our laboratory in terms of the facilities and resources necessary for submitting such a number of animals to CSDS in an experimental design administrating several

doses of drug. The specific dose of clomipramine we have employed was based on previous studies in which pre-training administration of a rather low dose of clomipramine improved IA, whilst high doses had detrimental effects, as mentioned above. With respect to the strengths, the present work represents a step forward in the study of pharmacological treatment of the effects of CSDS on memory. Our results show that treatment with clomipramine is effective in attenuating CSDS-induced memory impairment. Importantly, we have controlled several potential confounding factors (locomotor activity, emotionality and pain sensitivity) through complementary tasks.

## **5.6. CONCLUSIONS**

The present study shows that: (i) CSDS impairs emotional memory involved in inhibitory avoidance in post-pubertal mice; (ii) the memory impairment produced by CSDS is slightly attenuated by a low dose (10 mg/kg) of the tricyclic antidepressant clomipramine; (iii) the detrimental effects of CSDS on emotional memory do not seem to be secondary to the effects of stress on locomotor activity, emotionality or pain sensitivity; and (iv) this work provides further evidence that CD1 is a valid strain of mice for use as stressed subjects in the CSDS protocol.

## 5.7. REFERENCES

- Antikainen R, Hänninen T, Honkalampi K, Hintikka J, Koivumaa-Honkanen H, Tanskanen A, Viinamäki H (2001) Mood improvement reduces memory complaints in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 6–11.
- Arenas MC, Vinader-Caerols C, Monleón S, Martos AJ, Everss E, Ferrer-Añó A, Parra A (2006) Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? *Behav Brain Res* 166: 150–158.
- Bahi A (2013) Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. *Stress* 16: 441–451.
- Barden N (2004) Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathophysiology of depression. *J Psychiatry Neurosci* 29: 185–193.
- Bartolomucci A, Leopardi R (2009) Stress and depression: Preclinical research and clinical implications. *PLoSOne* 4: e4265.
- Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ (2008) Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. *Mol Psychiatry* 13: 1079–1092.
- Björkqvist K (2001) Social defeat as a stressor in humans. *Physiol Behav* 73: 435–442.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* 73: 261–271.
- Buwalda B, Kole MH, Veenema AH, Huininga M, de Boer SF, Korte SM, Koolhaas, JM (2005) Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 83–97.
- Bureš J, Burešová O, Huston JP (1983) Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour. Elsevier, Amsterdam.
- Butler RK, Finn DP (2009) Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 88: 184–202.
- Calegari L, Gorenstein C, Gentil V (2007) Effect of chronic treatment with clomipramine on food intake, macronutrient selection and body weight gain in rats. *Biol Pharm Bull* 30: 1541–1546.
- Campeau S, Liberzon I, Morilak D, Ressler K (2011) Stress modulation of cognitive and affective processes. *Stress* 14: 503–519.
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS (2013) Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr* 35: S101-11.
- Czéh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E (2007) Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: Hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32: 1490–1503.

- 
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Lüthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62: 757–771.
- Everss E, Arenas MC, Vinader-Caerols C, Monleón S, Parra A (2005) Piracetam counteracts the effects of amitriptyline on inhibitory avoidance in CD1 mice. *Behav Brain Res* 159: 235–242.
- File SE (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 125: 151–157.
- Frank D, Gauthier A, Bergeron R (2006) Placebo-controlled double-blind clomipramine trial for the treatment of anxiety or fear in beagles during ground transport. *Can Vet J* 47: 1102–1108.
- Gallagher P, Watson S, Smith MS, Young AH, Ferrier, IN (2007) Plasma cortisol-dehydroepiandrosterone (DHEA) ratios in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr. Res* 90: 258–265.
- Gardier AM (2009) Mutant mouse models and antidepressant drug research: focus on serotonin and brain-derived neurotrophic factor. *Behav Pharmacol* 20: 18–32.
- Gold PE (1986) The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 46: 87–98.
- Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ (2011) A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols* 6: 1183–1191.
- Haller J, Halasz J (2000) Anxiolytic effects of repeated victory in male Wistar rats. *Aggress Behav* 26: 257–261.
- Hermans EJ, Battaglia FP, Atsak P, de Voogd LD, Fernández G, Roozendaal B (2014) How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. *Neurobiol Learn Mem* 112: 2–16.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23: 477–501.
- Holsboer F, Ising M (2010) Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol* 61: 81–109.
- IBM Corp (2010) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. IBM Corp, Armonk, NY.
- Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren, BL (2014) Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 17: 247–255.
- Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Künzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F (2007) Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biol Psychiatry* 62: 47–54.
- Jin HM, Shrestha Muna S, Bagalkot TR, Cui Y, Yadav BK, Chung YC (2015) The effects of social defeat on behavior and dopaminergic markers in mice. *Neuroscience* 288: 167–177.
-

- Krishnan V (2014) Defeating the fear: new insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Exp Neurol* 261: 412–416.
- Larauche M, Mulak A, Taché Y (2012) Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp Neurol* 233: 49–67.
- Lavergne F, Jay TM (2010) A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci* 4: 192.
- Lee BH, Kim YK (2010) The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 7: 231–235.
- Lehner M, Wisistig t. Psyc A, Maciejak P, Szyndler J, Sobolewska A, KrzaKrza P, PP, nik A (2010) The relationship between pain sensitivity and conditioned fear response in rats. *Acta Neurobiol Exp* 70: 56–66.
- Liu Q, Yu J, Mao-Ying QL, Mi WL, Wang J, Wang YQ, Wu GC (2008) Repeated clomipramine treatment reversed the inhibition of cell proliferation in adult hippocampus induced by chronic unpredictable stress. *Pharmacogenomics J* 8: 375–383.
- Liu Q, Zhu HY, Li B, Wang YQ, Yu J, Wu GC (2012) Chronic clomipramine treatment restores hippocampal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *J Affect Disord* 141: 367–372.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92: 180–185.
- Martinez M, Calvo-Torrent A, Pico-Alfonso MA (1998) Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. *Aggress Behav* 24: 241–256.
- McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends Neurosci* 25: 456–461.
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1–28.
- Miguez G, Laborda MA, Miller RR (2014) Classical conditioning and pain: conditioned analgesia and hyperalgesia. *Acta Psychol* 145: 10–20.
- Monleón S, Urquiza A, Arenas MC, Vinader-Caerols C, Parra A (2002) Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. *Behav Brain Res* 136: 483–488.
- Monleón S, Vinader-Caerols C, Arenas MC, Parra A (2008) Antidepressant drugs and memory: insights from animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 235–248.
- Monleón S, Urquiza A, Vinader-Caerols C, Parra A (2009) Effects of oxotremorine and physostigmine on the inhibitory avoidance impairment produced by amitriptyline in male and female mice. *Behav Brain Res* 205: 367–371.
- Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C (2015) Effects of chronic social defeat stress on memory in post-pubertal and adult CD1 mice. *Behav Process* 115: 64–69.



- Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C (2016) Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice. *Behav Process* 124: 23–31.
- Niebylski A, Boccolini A, Bensi N, Binotti S, Hansen C, Yaciuk R, Gauna H (2012) Neuroendocrine changes and natriuresis in response to social stress in rats. *Stress and Health* 28: 179–185.
- Ohl F, Fuchs E (1998) Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 319–323.
- Ohl F, Fuchs E (1999) Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive Brain Res* 7: 379–387.
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S (2013) Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539: 73–86.
- Parra A, Martos A, Monleón S, Arenas MC, Vinader-Caerols C (2000) Effects of acute and chronic maprotiline administration on inhibitory avoidance in male mice. *Behav Brain Res* 109: 1–7.
- Parra A, Ferrer-Añó A, Fuentes C, Monleón S, Vinader-Caerols C (2010) Effects of co-administration of amitriptyline and fluoxetine on inhibitory avoidance in mice. *Behav Brain Res* 214: 343–348.
- Parra A, Rama E, Vinader-Caerols C, Monleón S (2013) Inhibitory avoidance in CD1 mice: sex matters, as does the supplier. *Behav Process* 100: 36–39.
- Ramponi C, Murphy FC, Calder AJ, Barnard PJ (2010) Recognition memory for pictorial material in subclinical depression. *Acta Psychol* 135: 293–301.
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 801–810.
- Rodgers RJ, Johnson NJ (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 297–303.
- Rogan MT, LeDoux JE (1996) Emotion: system, cells, synaptic plasticity. *Cell* 85: 469–475.
- Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I (2013) Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol* 6: 126–135.
- Sgoifo A, Meerlo P (2002) Animal models of social stress: implications for the study of stress related pathologies in humans. *Stress* 5: 1–2.
- Snedecor GW, Cochran WG (1980) *Statistical Methods*. Ames, The Iowa State University Press.
- Tanaś Ł, Ostaszewski P, Iwan A (2015) Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp* 75: 72–9.

- Toth I, Neumann ID (2013) Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res* 354: 107–118.
- Touyarot K, Venero C, Sandi C (2004) Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrino* 29: 290–305.
- Trofimiuk E, Walesiuk A, Braszko JJ (2006) St john's wort (*Hypericum perforatum*) counteracts deleterious effects of the chronic restraint stress on recall in rats. *Acta Neurobiol Exp* 66: 129–38.
- Van Bokhoven P, Oomen CA, Hoogendijk WJ, Smit AB, Lucassen PJ, Spijker S (2011) Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 33: 1833–1840.
- Van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, Fuchs E (2000) Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 539–546.
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Delagrangé P, Tordera RM (2012) Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* 224: 313–325.
- Venzala E, García-García AL, Elizalde N, Tordera RM (2013) Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 697–708.
- Vinader-Caerols C, Martos AJ, Monleón S, Arenas MC, Parra A (2006) Acute effects of maprotiline on learning, anxiety, activity and analgesia in male and female mice. *Acta Neurobiol Exp* 66: 23–31.
- Wang XD, Chen Y, Wolf M, Wagner KV, Liebl C, Scharf SH, Harbich D, Mayer B, Wurst W, Holsboer F, Deussing JM, Baram TZ, Müller MB, Schmidt MV (2011) Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol Dis* 42: 300–310.
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster G (2009) Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci* 123: 564–576.
- Wolf OT (2008) The influence of stress hormones on emotional memory: relevance for psychopathology. *Acta Psychol* 127: 513–531.
- Wood SK, Walker HE, Valentino RJ, Bhatnagar S (2010) Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 151: 1795–1805.

# **CAPÍTULO VI.**

## **EXPERIMENTO 7**

---

**Indomethacin counteracts the effects of chronic social defeat stress on emotional but not recognition memory in mice**

---

Publicado en (véase ANEXO III):

Duque A, Vinader-Caerols C, Monleón S. (2017). Indomethacin counteracts the effects of chronic social defeat stress on emotional but not recognition memory in mice. PLoS ONE 12(3): e0173182.



## **6.1. ABSTRACT**

We have previously observed the impairing effects of chronic social defeat stress (CSDS) on emotional memory in mice. Given the relation between stress and inflammatory processes, we sought to study the effectiveness of the anti-inflammatory indomethacin in reversing the detrimental effects of CSDS on emotional memory in mice. The effects of CSDS and indomethacin on recognition memory were also evaluated. Male CD1 mice were randomly divided into four groups: non-stressed + saline (NS+SAL); non-stressed + indomethacin (NS+IND); stressed + saline (S+SAL); and stressed + indomethacin (S+IND). Stressed animals were exposed to a daily 10 min agonistic confrontation (CSDS) for 20 days. All subjects were treated daily with saline or indomethacin (10 mg/kg, i.p.). 24 h after the CSDS period, all the mice were evaluated in a social interaction test to distinguish between those that were resilient or susceptible to social stress. All subjects (n = 10–12 per group) were then evaluated in inhibitory avoidance (IA), novel object recognition (NOR), elevated plus maze and hot plate tests. As in control animals (NS+SAL group), IA learning was observed in the resilient groups, as well as in the susceptible mice treated with indomethacin (S+IND group). Recognition memory was observed in the non-stressed and the resilient mice, but not in the susceptible animals. Also, stressed mice exhibited higher anxiety levels. No significant differences were observed in locomotor activity or analgesia. In conclusion, CSDS induces anxiety in post-pubertal mice and impairs emotional and recognition memory in the susceptible subjects. The effects of CSDS on emotional memory, but not on recognition memory and anxiety, are reversed by indomethacin. Moreover, memory impairment is not secondary to the effects of CSDS on locomotor activity, emotionality or pain sensitivity.



## **6.2. INTRODUCTION**

In recent years, there has been a vast increase in research on how stress affects people lives. An accumulating body of evidence shows socially stressed individuals to be less psychologically and physically healthy (House et al., 1988; Fagundes et al., 2013; Jaremka et al., 2013). Given that social stress is a chronic or recurring factor in the lives of virtually all higher animal species (Blanchard et al., 2001), research has recently increased the use of social stress models. In fact, the most adequate and strongest effects on the behavior and physiology of animals living in groups may be obtained through manipulations of socially significant factors (Kudryavtseva et al., 1991). In animals, chronic psychosocial stress can cause elevated cortisol, adrenal gland hypertrophy, hippocampal atrophy, and downregulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, as well as depression-like behavioral changes (Wang et al., 2013). Among the animal models commonly used, the chronic social defeat stress (CSDS) paradigm has been shown to have excellent etiological, predictive, discriminative and face validity (Golden et al., 2011), as it induces enduring behavioral and neurobiological changes that mimic several symptoms of the human condition (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2008; Pérez-Tejada et al., 2013).

Among the diverse effects produced by social stress, memory impairment is an important negative consequence, as previously shown in a number of animal studies (Ohl and Fuchs, 1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011; Patki et al., 2013). In our laboratory, we have previously observed that CSDS (induced in a 3-

week period of 10 min daily sessions) prevented memory formation in post-pubertal mice evaluated in the inhibitory avoidance (IA; also called passive avoidance) test, a common procedure used to evaluate emotional memory in animals (Heise, 1981; Gold, 1986; Izquierdo and Medina, 1997). These effects of CSDS on memory were not secondary to motor or emotional effects of stress (Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016).

On the other hand, the one-trial novel object recognition (NOR) test is a recognition memory task used to evaluate the behavioral effects of different pharmacological and/or environmental interventions in rodents (Dere et al., 2007; Ennaceur, 2010; Kenney et al., 2011). This test is based on the tendency of rodents to spend more time exploring novel objects than familiar ones and to realize when the position of an object has been changed (Mesa-Gresa et al., 2013). It has been demonstrated that stressful situations usually impair object recognition (Silvers et al., 2007; Eagle et al., 2013).

The effects of stress seem to be partly mediated by inflammatory processes (Jung et al., 2015), and an increase in inflammation has been reported after repeated social stress (Quan et al., 2001). Furthermore, chronic exposure to adverse social environments is associated with stress-related increases in the expression of pro-inflammatory genes, which appear to contribute to a higher risk of disease (Powell et al., 2013). Therefore, taking into account the connection between stress and inflammatory processes, it is reasonable to think that anti-inflammatory treatments could have a reversing effect on the alterations produced by CSDS. Indomethacin



belongs to the family of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), which are available worldwide and frequently used. NSAIDs are safely employed in humans in many inflammatory conditions (Süleyman et al., 2007; Castro et al., 2009). It has been demonstrated that indomethacin can attenuate the increased release of stress hormones and neurotransmitters (Buller et al., 1998) via interleukin 1 $\beta$ , a cytokine which mediates many neurological effects related to inflammation in the brain (Rothwell, 1999).

Individual differences in stress-regulatory circuits can dramatically affect vulnerability to illness, and maladaptive responses have been implicated in environmental stress in the onset and exacerbation of neuropsychiatric diseases (Kumar et al., 2014). In fact, experiments using CSDS have revealed large inter-individual variability in subsequent behavioral tests (Panksepp et al., 2004; Krishnan et al., 2007), with some animals proving to be resilient to stress. In order to assess this behavioral variability, which can blur the real consequences of CSDS, several tests have been designed to assess sociability in rodents (Toth and Neumann, 2013), based on the preference of animals to explore social rather than non-social stimuli (File and Hyde, 1978; Berton et al., 2006; Lukas et al., 2011). Therefore, to evaluate the real effects of CSDS, the social preference-avoidance test for mice was employed (Berton et al., 2006; Golden et al., 2011). This test identifies animals which are resilient or susceptible to social stress, and some molecular and physiological differences have been identified in these two groups (Krishnan et al., 2007).

As already explained, the aim of this study was to assess the effects of chronic indomethacin administration on memory impairment produced by CSDS in post-pubertal male CD1 mice. To achieve this goal, animals were evaluated using the IA test for emotional memory and the NOR test for recognition memory. We predicted that indomethacin would reverse the negative effects of CSDS on memory. Considering that motor activity, anxiety and pain threshold can be confounding factors in animals' performance in the aforementioned tests (IA and NOR), our animals were additionally assessed in an elevated plus maze and a hot plate test, in which we obtained complementary measures of locomotor activity, emotionality and analgesia.

### **6.3. MATERIAL AND METHODS**

#### **6.3.1. Subjects**

Post-pubertal (42 days) male CD1 mice (Charles River, Lyon, France) were used as experimental subjects. The animals arrived at the laboratory weighing 30–39 g and were housed in groups of 4 in translucent plastic cages (height 14.5 cm, width 27 cm, length 27 cm) with roofs of stainless steel bars (Panlab S.L., Barcelona, Spain). Male CD1 retired breeder mice of over 3 months of age (Janvier, France) were housed individually in similar cages in preparation for their use as aggressors. As in previous studies by our group (Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016), we employed CD1 mice (rather than the commonly used C57BL/6J strain) as stressed animals

in the CSDS procedure (Golden et al., 2011) because using the same strain for the defeated and aggressor subjects enhanced the validity of this model. Furthermore, CD1 is an ideal strain for assessing inhibitory avoidance learning (one of the main memory tests used in the present study). In fact, we have conducted numerous experiments in our laboratory using CD1 mice in this paradigm (see Vinader-Caerols et al., 2011).

All the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) under a reversed light-dark cycle (lights off: 07:30h-19:30h, local time) with food and water available ad libitum. Group-housed mice were marked for identification by painting their fur with purple coloring. The animals were subjected to a stress treatment and to several behavioral tests during the dark phase of the cycle. Considering the negative physical consequences of social defeat, such as wounding, adequate measures were taken to minimize pain or discomfort caused to the animals (see Chronic Social Defeat Stress section for details). The experimental protocol and use of animals were in strict accordance with the European Parliament and the Council of the European Union's Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and the Spanish Real Decreto 53/2013. All animal experiments were also approved by the Ethics Committee of the University of Valencia (ethical permit number A13281856334).

### **6.3.2. Drugs**

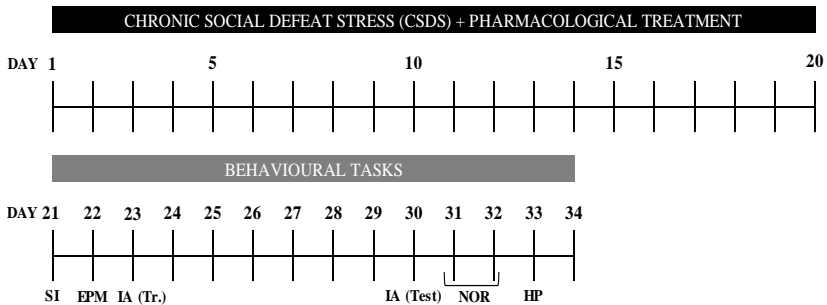
Indomethacin (Sigma–Aldrich Qui ´ mica, S.A., Madrid, Spain) was dissolved in physiological saline (0.9% NaCl) and administered by intraperitoneal injection (i.p.), at the dose 10 mg/kg, in a volume of

0.01ml/g body weight. The control groups received the same volume of physiological saline.

### **6.3.3. Procedure**

After 10 days of acclimatization to the animal facility, mice were randomly distributed into four groups: NS+SAL (non-stressed + saline), NS+IND (non-stressed + indomethacin), S +SAL (stressed + saline) and S+IND (stressed + indomethacin).

Mice were submitted to a Chronic Social Defeat Stress (CSDS) paradigm, which was used as an animal model of social stress. After the CSDS period, a battery of behavioral tests was applied. A social interaction test was implemented to distinguish between animals that were resilient or susceptible to CSDS (see Social Interaction section for details). All subjects (n = 10–12 per group) were then evaluated in two memory tasks (inhibitory avoidance and novel object recognition tests), as well as in several complementary tasks, in order to control potential confounding variables (elevated plus-maze and hot plate tests). Fig 26 illustrates the time schedule for the experimental design.



**Fig. 26.** Schedule of CSDS procedure and behavioral tasks performed. SI: Social Interaction; EPM: Elevated Plus Maze; IA (Tr.): Inhibitory Avoidance Training; IA (Test): Inhibitory Avoidance Test; NOR: Nobel Object Recognition; HP: Hot Plate.

### ***Chronic Social Defeat Stress***

Following a modified version of the guidelines proposed by Golden et al. (2011), a Chronic Social Defeat Stress (CSDS) paradigm was used as an animal model of social stress. In this paradigm, experimental male mice (stressed animals) are repeatedly subjected to bouts of social defeat by a larger CD1 mouse that has screened positive for aggressive behavior. In a pre-stress phase, CD1 retired breeders were selected as aggressors based on their attack latencies and the number of attacks they had launched during a 3-day screening procedure (attack latencies shorter than 60 s and 3 or more attacks in 3 min were the aggressor inclusion criteria). In the CSDS phase, the stressed groups were submitted to a daily 10 min social defeat experience by a larger and aggressive mouse on 20 consecutive days. This schedule of CSDS was selected in line with that used in previous studies in our laboratory (Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016) and by other groups (e.g. Ohl and Fuchs,

1998, 1999; Touyarot et al., 2004; Wang et al., 2011). In the agonistic encounters, each stressed mouse (also called the intruder) was placed in the home cage of an unfamiliar male (the aggressor, also called the resident). All the residents rapidly recognized and launched a first attack against the intruder within 2 minutes. Once the experimental mouse had been physically stressed by defeat during a 10 min period, both animals (intruder and resident) were maintained in sensory contact for 1 h by means of a clear perforated Plexiglas wall that divided the resident's home cage into two halves. Subsequently, the intruder was returned to its home cage. In each subsequent defeat, experimental mice were exposed to a new resident mouse to counteract any habituation to the resident aggressor and avoid large differences in the level of aggression experienced by the stressed animals. Immediately prior to each agonistic encounter, all stressed animals were injected i.p. with saline or indomethacin (10 mg/kg) according to their experimental condition (S+SAL or S+IND group). Non-stressed mice (NS+SAL and NS+IND groups) were not submitted to any social exposure, but received a daily pharmacological treatment. The body weight of all animals was monitored before and after the CSDS procedure. Every agonistic encounter was continuously supervised by the investigator. Considering that social defeat involves physical aggression, wounding of defeated mice was evaluated daily by veterinary personnel. Following their recommendation, the duration of the defeat sessions was reduced to 5 min (for all animals) from day 17 on. Four intruders had to be removed from the experiment and immediately euthanized in line with the criterion of open wounds exceeding 1 cm, as indicated

in the protocol of Golden et al. (2011). Wounds not exceeding 1 cm were observed in forty per cent of the mice that were not removed (these wounded animals represented 36% of the resilient group and 44% of the susceptible group). In order to minimize the discomfort of these animals, their wounds were treated daily with Betadine.

### ***Social Interaction***

Twenty-four hours after the last CSDS session, animals were submitted to a social interaction test for mice, to distinguish between animals that were resilient and those that were susceptible to CSDS (Berton et al., 2006; Golden et al., 2011). This two-step test took place in an open field arena made of clear Plexiglas (height 35 cm, width 30 cm, length 40 cm). There are two important areas in the open field arena: the 'interaction zone', which encompasses a 12 cm × 16 cm rectangular area projecting 8 cm around a circular perforated cylinder, and the 'corner zones', which encompass two 9 cm × 9 cm areas projecting from the two corner joints opposite the perforated cylinder (Golden et al., 2011). In the first 2.5 min session, the experimental mouse was able to freely explore the neutral area. The perforated cylinder (non-social stimulus) remained empty during that first trial (target absent). The animal was then removed from the open field arena and returned to its home cage for 30 s. During this short inter-exposure interval, an unfamiliar male mouse was placed in the perforated cylinder (social stimulus). In the second 2.5 min trial (target present), the experimental mouse was reintroduced into the arena containing the social target within the perforated cylinder. In this test, the mice used as social stimulus were the CD1 mice used as

aggressors in the CSDS procedure, having certified that each target had not been previously paired with the defeated subject throughout the CSDS sessions. The reason for using these animals was to ensure that they emitted similar olfactory, visual, and auditory stimuli as in the CSDS period. The cylinder and the open field were cleaned after each session with a solution of ethanol and water. All sessions were recorded with a video camera (Sony DCR-SR35) for subsequent analysis.

The behavior displayed by the mice during the test was analyzed by a blind researcher using 'Raton-time' software, a program for ethological analysis. A social interaction ratio (SI ratio) is obtained by dividing the time spent in the interaction zone when the target is present by the time spent in that zone when the target is absent. A SI ratio equal to 1, in which equal time is spent in the presence versus the absence of a social target, is used as the threshold for dividing defeated mice into resilient and susceptible categories (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Mice scored below this criterion are grouped as susceptible, whereas mice scored above this criterion are grouped as resilient (Golden et al., 2011). This means that resilient animals remain longer in the interaction zone when the target is present than when it is absent, which reflects a tendency to explore social stimuli, similar to the behavior seen in non-stressed mice. In contrast, susceptible animals remain in this zone for less time when the target is present than when it is absent, which reflects social avoidance as a result of social stress.



### ***Inhibitory Avoidance***

A one-trial step-through inhibitory avoidance apparatus for mice (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy), contained within an isolation box, was employed to evaluate emotional memory. This cage is made of Perspex sheets and is divided into two compartments (both with a height of 15 cm, width of 9.5 cm, and length of 16.5 cm) separated by a partition with an automatically-operated sliding door. The floor is made of 48 stainless steel bars with a diameter of 0.7 mm and situated 8 mm apart. The safe compartment is white and continuously illuminated by a light fixture fastened to the cage lid (24 V, 10 W, light intensity of 290 lux at floor level, measured with the Panlux Electronic 2 photometer manufactured by GOSSEN, Nu¨rnberg, Germany), whereas the 'shock' compartment is made of black Perspex panels and is maintained in darkness at all times.

This task consisted of two phases: training and test. The training phase began with a 90 s adaptation period in the light compartment of the apparatus. Following this, the door between the compartments was opened and the time taken to enter the dark compartment—defined as latency—was automatically measured in tenths of a second and manually recorded. The mouse was allowed to remain in the light compartment for a maximum of 300 s after the door had opened. As soon as the animal entered the dark compartment, the sliding door was closed and a foot-shock (0.3 mA for 5 s) was delivered through the grid floor. The test phase took place one week later, following the same procedure as in the training phase, with the exception that no shock was delivered.

### ***Nobel Object Recognition***

A novel object recognition (NOR) test was carried out to evaluate the natural preference of the mice for novel objects. An open field arena (height 35 cm, width 30 cm, length 60 cm) made of translucent Plexiglas was employed for this test.

Following the procedure reported by Antunes and Biala (2012), the NOR protocol consisted of three phases: (1) Habituation, in which mice were habituated to exploring the open field for 5 min; (2) Training (1 day after Habituation), in which two identical novel objects (two small bottles) were placed in the arena and mice were able to explore them for 10 min; and (3) Test (1 h after Training), in which mice explored a novel object and a familiar one previously explored for 5 min. All objects and the open field cage were cleaned with a solution of ethanol and water after each session. The location of the objects was varied across the treatment groups in order to avoid preference for location. Following the protocol used by other authors (e.g. Mesa-Gresa et al., 2013), all test sessions were recorded with a video camera (Sony DCR-SR35) and the behavior displayed by mice during the test was analyzed by a blind researcher using 'Raton-time' software. An object was considered to have been explored when the head of the animal was 0.5 cm from the object or when it touched the object. In contrast, exploration was considered not to have taken place when an animal climbed onto an object or used it as a base to explore the environment (Ennaceur, 2010). A discrimination index (total time spent exploring the novel object/total time devoted to exploration of both objects) was calculated for each

group to measure recognition memory during the test phase. In addition, the exploration time of the novel and familiar objects within the same group was obtained as another measure of recognition memory (Antunes and Biala, 2012).

### ***Elevated Plus Maze***

All the animals were evaluated in an elevated plus maze for mice (Cibertec, Madrid, Spain), as a complementary behavioral test to measure unconditioned anxiety-like behavior and locomotor activity, following the same protocol as in previous studies in our laboratory (e.g. Vinader-Caerols et al., 2006; Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016). This apparatus consists of two open arms (30 x 5 cm<sup>2</sup> each) and two enclosed arms with walls (30 x 5 x 15 cm<sup>3</sup> each) that extend outwards from a common central square (5 x 5 cm<sup>2</sup>). The maze is made of Plexiglas (black floor and walls) and is elevated to a height of 40 cm above floor level.

This task consisted of a 5 min session that began by placing the mouse in the central square (facing one of the open arms). All sessions were recorded with a video camera (Sony DCRSR35) for subsequent analysis. The number of entries into the open and closed arms (entry is defined as all four paws being placed on an arm) was scored by a trained observer who was unaware of the treatment applied. Based on former studies (Lister, 1987; Rodgers and Dalvi, 1997; Campos et al., 2013), these scores provide an uncontaminated measurement of locomotor activity through the number of closed arm entries, and one primary anxiety index through the percentage of open arm entries (the lower the score, the higher the anxiety).

### ***Hot Plate***

A hot plate test for mice (Mod Socrel DS37, Ugo Basile, Varese, Italy) was applied to assess nociceptive information. The apparatus consisted of a metal plate (25 x 25 cm<sup>2</sup>) located above a thermoregulator and a plastic cylinder (height 18 cm and diameter 19 cm) made of Plexiglas.

The metal plate was heated through a thermoregulator to a fixed temperature of 55°C (the surface temperature was continuously monitored). Each mouse was placed on the hot plate inside a plastic cylinder to confine it to the heated surface. The latency to lift one or both hind paws was recorded in seconds (s) and provided a nociceptive measurement (the lower the score, the higher the nociception). Animals that failed to lift their paws within 45 s were removed from the plate (to avoid thermal injury) and were assigned a response latency value of 45 s.

#### **6.3.4. Statistical analysis**

As suggested by Golden et al. (2011), social interaction data were analyzed by one-way ANOVA for the social interaction ratio and a 2×3 ANOVA was used to compare the interaction zone and corner zones times between target absent and target present in control, resilient and susceptible mice; followed by Tukey post hoc tests. Student's t tests for dependent samples were performed for comparisons within the same group.

Inhibitory avoidance data were transformed into proportion ( $p = x/300$ ) values and then to arc sin (arc sin  $pp$ ) values according to

Snedecor and Cochran (1980). This transformation is appropriate when a cut-off time is applied, and crossing latencies that exceed this limit are interpreted as the maximum trial length. Therefore, all latencies are transformed into a percentage or proportion value, and these percentages ( $p$ ) are then transformed to arc sin (degree) values (according to the formula:  $\arcsin \sqrt{p}$ ) prior to statistical analysis and graphical constructions. Two-way ANOVAs for training and test phases were performed separately. Tukey tests were employed for post-hoc comparisons. Given that inhibitory avoidance learning is defined as statistically significant differences between training and test latencies, a Student's  $t$  test for dependent samples was also carried out in order to check whether each group had learned the inhibitory avoidance task.

Recognition memory in the test phase of the novel object recognition test was measured using a discrimination index (total time spent exploring the new object/total exploration time). One-way ANOVAs were performed to assess differences between groups. Student's  $t$  tests for dependent samples were employed to compare the exploration time of the novel and the familiar object within the same group in the test phase.

After checking that data fulfilled the criteria for normality and homogeneity, one-way ANOVAs were also carried out for the anxiety, locomotor activity and nociception data obtained in the elevated plus-maze and hot plate tests.

The lack of outliers in the sample data was confirmed using the Outlier calculator online tool from 'GraphPad' software

(<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). The rest of analyses were performed using the IBM SPSS software package, version 22 for Windows (IBM, 2010).

## **6.4. RESULTS**

### **6.4.1. Social Interaction**

Table 1 summarizes the results obtained in the social interaction test.

Behavioral categories	Stress and pharmacological treatments					
	Non-stressed		Stressed-resilient		Stressed-susceptible	
Social Interaction ratio	1.7 ± 0.21		1.5 ± 0.10		0.5 ± 0.06 <sup>&amp;&amp;&amp;###</sup>	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	1.5 ± 0.27	1.9 ± 0.31	1.6 ± 0.15	1.3 ± 0.09	0.6 ± 0.06	0.5 ± 0.11
Time in interaction zone	40.7 ± 2.65		56.5 ± 3.17 <sup>&amp;</sup>		56.4 ± 2.67 <sup>&amp;</sup>	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	42 ± 3.6	39.4 ± 4.05	55.1 ± 5.13	58 ± 3.77	55.8 ± 3.06	57 ± 4.54
Target absent	84.9 ± 4.25		79.8 ± 5.34		27.2 ± 2.97 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	82.4 ± 6.42 <sup>***</sup>	87.4 ± 5.8 <sup>***</sup>	84.7 ± 8.48 <sup>**</sup>	74.5 ± 6.31 <sup>*</sup>	31.9 ± 3.56 <sup>***</sup>	22.5 ± 4.44 <sup>***</sup>
Target present	18.6 ± 1.8		13 ± 1.25 <sup>&amp;</sup>		14 ± 1.63	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	18 ± 1.78	19.3 ± 3.22	13.8 ± 1.82	12.1 ± 1.77	14.8 ± 2.4	13.3 ± 2.3
Time in corner zones	6.8 ± 1.07		9.2 ± 2.07		28.6 ± 4.83 <sup>&amp;&amp;&amp;###</sup>	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	7.3 ± 1.77 <sup>**</sup>	6.3 ± 1.27 <sup>*</sup>	9.8 ± 3.25	8.6 ± 2.61	30.7 ± 8.58 <sup>*</sup>	26.5 ± 4.89 <sup>*</sup>
Target absent	6.8 ± 1.07		9.2 ± 2.07		28.6 ± 4.83 <sup>&amp;&amp;&amp;###</sup>	
	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin	Saline	Indomethacin
	7.3 ± 1.77 <sup>**</sup>	6.3 ± 1.27 <sup>*</sup>	9.8 ± 3.25	8.6 ± 2.61	30.7 ± 8.58 <sup>*</sup>	26.5 ± 4.89 <sup>*</sup>

**Table 1.** Effects of CSDS on the behavior of male post-pubertal CD1 mice in the social interaction test. <sup>&</sup> $p < 0.05$ , <sup>&&</sup> $p < 0.001$  vs Non-stressed group; <sup>###</sup> $p < 0.001$  vs Stressed-resilient group; <sup>\*</sup> $p \leq 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs target absent.

***Social Interaction ratio (SI ratio)***

One-way ANOVA analyses revealed an effect of the factor Stress ( $F_{2,57}=21.727$ ,  $p<0.001$ ), with susceptible mice obtaining a significantly lower SI ratio value than non-stressed or resilient subjects ( $p<0.001$  in both cases). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,57}=0.001$ , n.s.;  $F_{2,57}=1.773$ , n.s.; respectively).

***Time spent in the interaction zone***

The factor Stress was significant in the time spent in the interaction zone when the target was absent ( $F_{2,57}=9.331$ ,  $p<0.001$ ), with resilient and susceptible subjects staying significantly longer in this zone than non-stressed subjects ( $p<0.01$  in both cases). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,57}=0.021$ , n.s.;  $F_{2,57}=0.224$ , n.s.; respectively). The factor Stress was also significant in this measure when the target was present ( $F_{2,57}=50.207$ ,  $p<0.001$ ), with susceptible subjects spending significantly less time in this zone than non-stressed and resilient subjects ( $p<0.001$  in both cases). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,57}=0.906$ , n.s.;  $F_{2,57}=0.896$ , n.s.; respectively).

***Time spent in the corner zones***

The time spent in the corner zones when the target was absent was dependent on an effect of the factor Stress ( $F_{2,57}=3.585$ ,  $p<0.05$ ), with resilient subjects staying significantly less time in this zone than non-stressed subjects ( $p<0.05$ ). Neither the factor Drug nor



the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,57}=0.124$ , n.s.;  $F_{2,57}=0.258$ , n.s.; respectively). The time spent in the corner zones when the target was present was also dependent on an effect of the factor Stress ( $F_{2,57}=14.546$ ,  $p<0.001$ ), with susceptible subjects spending significantly more time in this zone than non-stressed and resilient subjects ( $p<0.001$ , in both cases). Neither the factor Drug nor the interaction Stress X Drug was statistically significant ( $F_{1,57}=0.356$ , n.s.;  $F_{2,57}=0.081$ , n.s.; respectively).

### ***Interaction zone with absent vs present target***

Non-stressed and resilient animals spent more time in the interaction zone when the target was present (NS+SAL:  $p<0.001$ , NS+IND:  $p<0.001$ , RES+SAL:  $p<0.01$ , and RES+IND:  $p<0.05$ ), whereas susceptible subjects spent less time in said zone when the target was present (SUS+SAL:  $p<0.001$ ; SUS+IND:  $p<0.01$ ).

### ***Corner zones with absent target vs present target***

Non-stressed animals spent less time in the corner zones when the target was present (NS+SAL:  $p<0.01$ ; NS+IND:  $p<0.05$ ), whereas susceptible subjects spent more time in these zones when the target was present (SUS +SAL:  $p=0.05$ ; SUS+IND:  $p<0.05$ ).

## **6.4.2. Inhibitory Avoidance**

### ***Training phase***

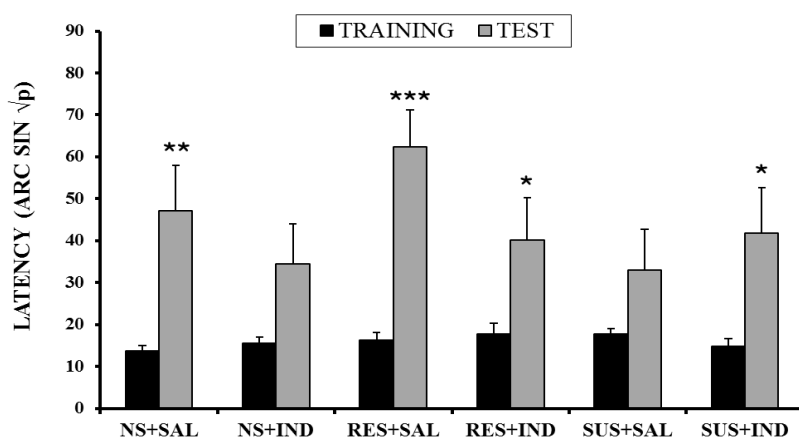
Neither of the main factors—Stress or Drug—was statistically significant ( $F_{2,57}=0.841$ , n.s.;  $F_{1,57}=0.004$ , n.s.; respectively), and nor was their interaction ( $F_{2,57}=0.962$ , n.s.).

### Test phase

Neither of the main factors—Stress or Drug—was statistically significant ( $F_{2,57}=1.097$ , n.s.;  $F_{1,57}=1.13$ , n.s.; respectively), and nor was their interaction ( $F_{1,57}=1.283$ , n.s).

### Training phase vs Test phase

Comparing training and test latencies in each group, IA learning was observed in NS+SAL ( $p<0.01$ ), RES+SAL ( $p<0.001$ ), RES+IND ( $p<0.05$ ) and SUS+IND ( $p<0.05$ ) groups, but not in NS+IND and SUS+SAL ( $p>0.05$  in both cases) groups (Fig 27).



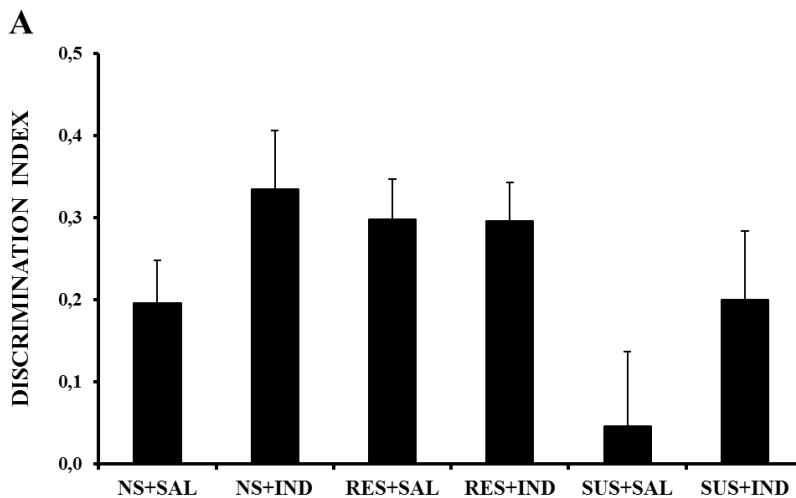
**Fig. 27.** Effects of CSDS and indomethacin on latencies of an inhibitory avoidance task in male post-pubertal CD1 mice. NS+SAL = Non-stressed + Saline group (n = 10); NS+IND = Non-stressed + Indomethacin group (n = 10); RES+ SAL = Resilient + Saline group (n = 12); RES+IND = Resilient + Indomethacin group; (n = 11); SUS+SAL = Stressed + Saline group (n = 10); SUS+IND = Stressed + Indomethacin group (n = 10). Values are expressed as means (+SEM) of square root of proportions ( $p = x/300$ ) transformed to arc sin.

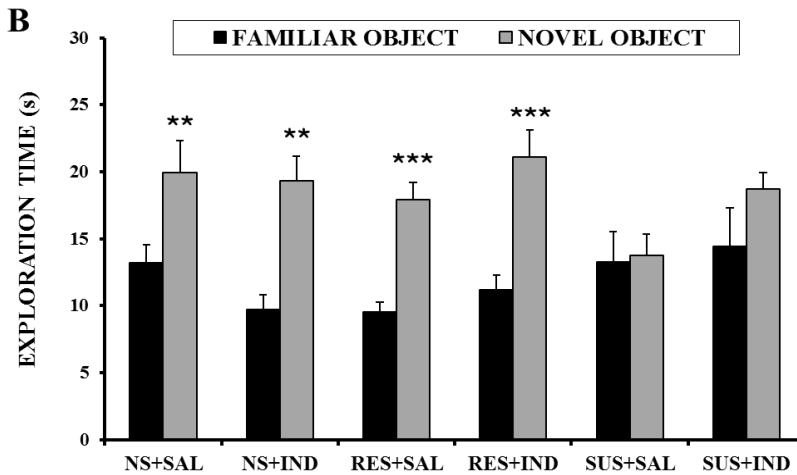
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs Training phase.

### 6.4.3. Novel Object Recognition

In the discrimination index, neither Stress nor Drug was statistically significant ( $F_{2,57}=2.347$ , n.s.;  $F_{1,57}=3.758$ , n.s.; respectively), and nor was the Stress X Drug interaction ( $F_{2,57}=1.102$ , n.s.) (Fig 28A).

However, the student's t tests for dependent samples revealed that recognition memory (exploration time of the novel object significantly higher than exploration time of the familiar one) was observed in NS+SAL ( $p<0.01$ ), NS+IND ( $p<0.01$ ), RES+SAL ( $p<0.001$ ) and RES+IND ( $p<0.001$ ) groups, whilst recognition memory was absent in S+SAL and S+IND ( $p>0.05$  in both cases) groups (Fig 28B).



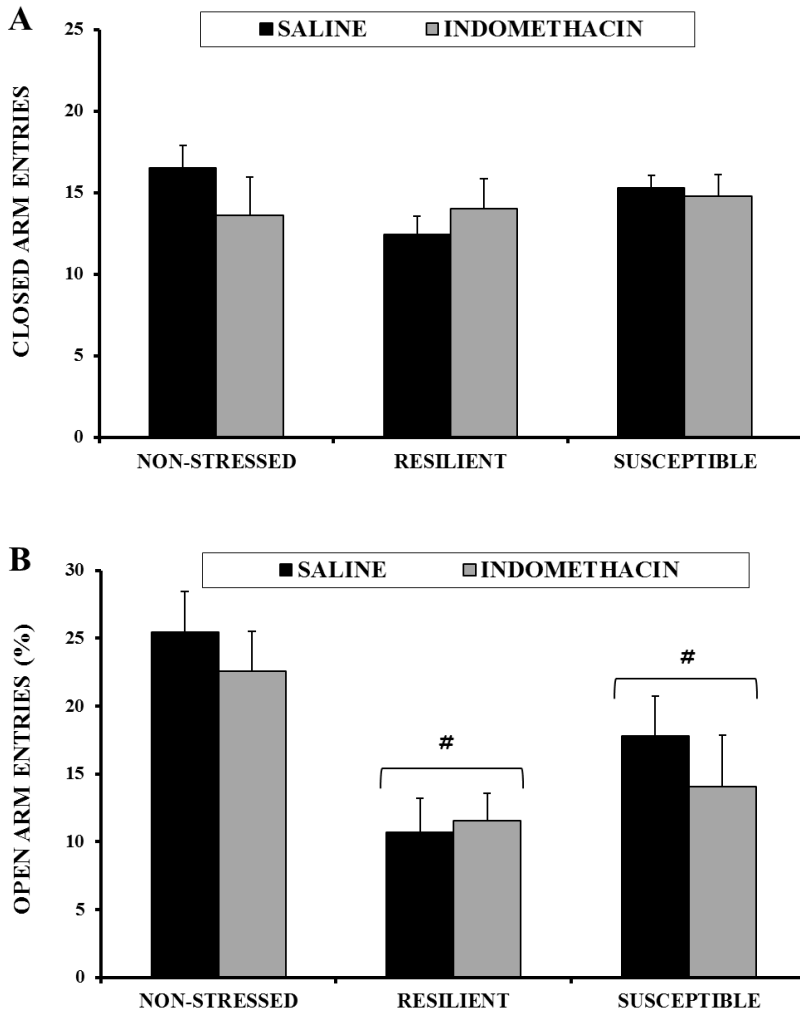


**Fig. 28.** Effects of CSDS and indomethacin on a novel object recognition task by male post-pubertal CD1 mice. A) Discrimination index; B) Exploration time of novel object vs familiar object. NS+SAL = Non-stressed + Saline group (n = 10); NS+IND = Non-stressed + Indomethacin group (n = 10); RES+ SAL = Resilient + Saline group (n = 12); RES+IND = Resilient + Indomethacin group; (n = 11); SUS+SAL = Stressed + Saline group (n = 10); SUS+IND = Stressed + Indomethacin group (n = 10). Values are expressed as means (+SEM). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs familiar object.

#### 6.4.4. Elevated Plus Maze

##### ***Locomotor Activity (number of entries in enclosed arms)***

Neither Stress nor Drug was statistically significant ( $F_{2,57}=1.733$ , n.s.; and  $F_{1,57}=0.403$ , n.s.; respectively), and nor was the interaction Stress X Drug ( $F_{2,57}=1.882$ , n.s.) (Fig 29A).



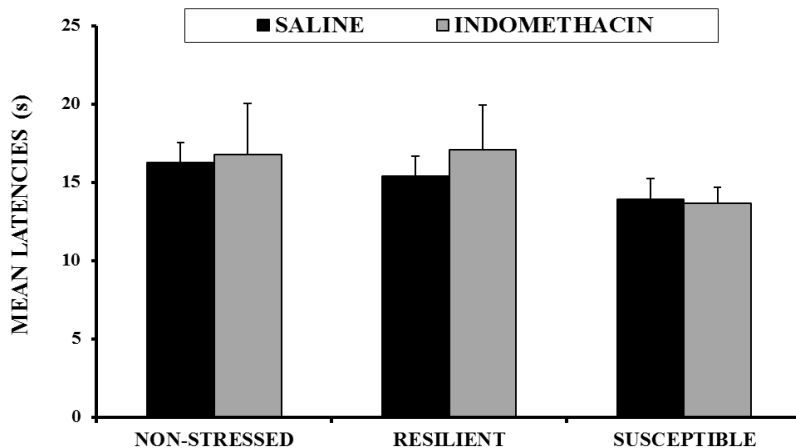
**Fig. 29.** Effects of CSDS and indomethacin on measurements of male post-pubertal CD1 mice in an elevated plus maze task. A) locomotor activity measurement (number of closed arm entries); B) anxiety measurement (percentage of open arm entries). Values are expressed as means (+SEM). #  $p < 0.05$  vs Non-stressed.

### ***Anxiety (percentage of open arm entries)***

One-way ANOVA revealed significant differences in anxiety; the main factor Stress proved to be statistically significant ( $F_{2,57}=10.259$ ,  $p<0.001$ ) and significantly higher levels of anxiety (lower scores) were detected in both resilient ( $p<0.05$ ) and susceptible ( $p<0.05$ ) subjects vs. non-stressed subjects (Fig 29B). Neither the factor Drug nor the Stress X Drug interaction was statistically significant ( $F_{1,57}=0.668$ , n.s.; and  $F_{2,57}=0.37$ , ns; respectively).

#### **6.4.5. Hot Plate**

No statistically significant differences were observed for either of the main factors, Stress or Drug ( $F_{2,57}=1.083$ , n.s.;  $F_{1,57}=0.153$ , n.s.; respectively), or their interaction ( $F_{2,57}=0.116$ , n.s.) (Fig 30).



**Fig. 30.** Effects of CSDS and indomethacin on latencies to lift hind paws in post-pubertal male CD1 mice in a hot plate task. Values are expressed as means (+SEM).

## **6.5. DISCUSSION**

The aim of the present study was to evaluate the effects of CSDS on emotional and recognition memory in post-pubertal male mice, using the CD1 strain for the stressed subjects instead of the C57BL/6J strain used in the CSDS standard protocol, and to assess the effectiveness of the anti-inflammatory indomethacin in reversing the said effects. Overall, both types of memory were impaired by CSDS; however, while chronic indomethacin treatment counteracted emotional memory impairment, it did not do so with respect to recognition memory impairment.

Behavioral processes and their underlying physiological systems vary throughout life. Adolescence in both rodents and humans is a period of ongoing refinement and maturation of neural circuitry, which continues into adulthood (Semple et al., 2013). Therefore, this developmental stage is a time of vulnerability to stressors that can alter neurobehavioral processes (Razzoli et al., 2011). Late adolescence is a period in which these changes still occur. Considering this and following previous results from our research evaluating the effects of CSDS at different life stages, from which we obtained stronger effects on post-pubertal animals (see Monleón et al., 2015, 2016), we chose to continue our research with mice from this age group.

It has been established that social stress is a risk factor for affective disorders in vulnerable individuals (Razzoli et al., 2011). This means there can be variability in behavior within a group of laboratory animals exposed to the same stressor, and so a stressor should be

combined with a coping or social exploration test (Krishnan, 2014). As expected, in this study the social interaction test allowed us to distinguish between animals that were resilient or susceptible to social stress based on the SI ratio (time spent in the interaction zone with target vs. without target), obtaining 53.5% of resilient and 46.5% of susceptible mice. Our data reveal that, with social stimuli (with the target present), resilient and non-stressed mice spent more time in the interaction zone and less time in the corner zones than susceptible animals. Similar to non-stressed mice, resilient animals remained in the interaction zone for a longer period when the target was present than when it was absent; however, susceptible subjects remained in the interaction zone for less time and spent longer periods in the corner zones when there was social stimuli. These data are consistent with previous studies (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Meduri et al., 2013) in which the social defeat stress paradigm induced two phenotypic responses during a subsequent social interaction test: resilient mice did not display a decrease in social interaction after social defeat, in a similar way to the non-stressed group, whereas susceptible mice were characterized by prolonged social avoidance, even though all animals had an identical genetic background and all had been exposed to similar conditions of social defeat stress. Therefore, resilient animals displayed a similar behavioral pattern to that of non-stressed mice. It is well established to study the effects of social stress distinguishing resilient versus susceptible subjects based on their behavior in the social interaction test. However, given that wounding is observed in defeated animals, it could be that wounded mice were behaviorally distinct from non-wounded mice and, therefore,



resilient/susceptible phenotypes arise from non-wounded/wounded condition. Nevertheless, taking into account that the percentage of wounded animals in the resilient and the susceptible groups were similar (around forty per cent), we think that the social interaction test is a suitable tool for distinguishing between resilient and susceptible individuals.

In our study, similar to the non-stressed animals treated with saline, IA learning was observed in the resilient groups, as well as in the susceptible mice treated with indomethacin. In contrast, non-stressed animals treated with indomethacin and susceptible mice treated with saline did not show IA learning. These results mean that CSDS prevented IA conditioning. Several studies have reported that CSDS impairs performance in some memory and learning tasks in several species, including tree shrews (Ohl and Fuchs, 1998, 1999), rats (Touyarot et al., 2004; Patki et al., 2013) and mice (Wang et al., 2011). Previous studies carried out in our laboratory using the CSDS paradigm (Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016) have shown that social stress impairs later IA conditioning in post-pubertal mice and can even impede stressed subjects from learning the task, thereby confirming the detrimental effects of CSDS on emotional memory. Considering that the neural circuits of the amygdala and its connected brain areas are thought to be essential for emotional learning (LeDoux, 2003), this structure could be a principal brain region involved in the effects of CSDS on IA learning. It has been established that some emotional experiences mediated by the activation of the amygdala are better remembered (e.g. McGaugh, 2004; Wolf, 2008); however, there is accumulating evidence indicating that local inhibitory circuits in the

amygdala contribute to, or even mediate, important aspects of emotional memory extinction (Ehrlich et al., 2009; Lee et al., 2013). Therefore, it is also possible that CSDS principally activates these fear-inhibiting pathways, which would have prevented IA learning in the stressed groups in our studies.

Other studies have demonstrated that CSDS leads to increased emotional learning and memory; e.g. in Pavlovian fear conditioning (Azzinnari et al., 2014; Fuertig et al., 2016). However, there is also evidence of fear conditioning impairment produced by CSDS (Costa-Nunes et al., 2014), as well as other social stress paradigms, such as social instability (Morrissey et al., 2011) and social isolation (Okada et al., 2015). A lack of effects of CSDS on IA learning has also been reported (Costa-Nunes et al., 2014). This discrepancy could be partly due to differences in the age of subjects when they were submitted to social stress and when their memory performance was tested. Deficits in emotional memory are usually observed when social stress is experienced by young subjects but evaluated in adult years, whereas improvements are usually observed when the animals are stressed in adulthood. A further explanation for the differential results found in the literature could stem from the degree of stress experienced. According to the classic Yerkes-Dodson inverted U-shaped performance law (Yerkes and Dodson, 1908), there is an optimal amount of arousal for performance, and when arousal or stress is lower or higher than this optimal level, performance is poorer. Unlike other studies using low degrees of stress, the degree in this study (which was rather high) would be in the descending limb of the inverted U-shaped curve, which should result in memory impairment.

In the NOR test, our results revealed a tendency for a lower discrimination index in the susceptible animals treated with saline, but no significant differences were observed between the groups. In the same way, Mesa-Gresa et al. (2016) also failed to find effects of social stress in the NOR task using this measure. On the other hand, the analyses of the total time spent by animals in exploring both objects during the test phase revealed that non-stressed and resilient groups spent longer investigating the novel than the familiar object, whereas susceptible animals spent a similar amount of time exploring both objects. This result reflects that social stress impairs recognition memory in susceptible subjects. It is recognized that the effects of stress are partly mediated by the action of glucocorticoid hormones on the hippocampal neurogenesis (Lehmann et al., 2013). Several explanations of the neurobiology of the effects of stress on NOR have been proposed, such as neuritic atrophy, reduced neurogenesis and decreased neurotrophin levels in the hippocampus, and an increase of glucocorticoids (Krishnan, 2014; Schroeder et al., 2015). Actually, this structure plays an important role in object recognition memory (Antunes and Biala, 2012). Some studies have linked chronically elevated stress-hormone levels to hippocampal disruption and subsequent cognitive impairment (e.g. Lupien et al., 1999; Stackman et al., 2003; Stankiewicz et al., 2015). Moreover, studies in humans have demonstrated that elevation of cortisol levels, as occurs with chronic stress or illness, induces memory impairment in a dosedependent manner (Lupien et al., 1999).

Social stressors are the main source of stress in humans and contribute to the development and expression of diverse pathologies,

representing a major risk factor for depression (e.g. Campeau et al., 2011). Interestingly, a proportion of subjects exposed to chronic social stress does not show any signs of psychopathology and maintains physiological stability, i.e. allostasis (Charney et al., 2004). Therefore, to study the differential effects of sustained social stress, it is very important to distinguish resilient and susceptible individuals. In this study, these two different phenotypes were identified by a social interaction test and these groups, displaying different social behavior, also evidenced different patterns in the memory tests. Moreover, the resilient subjects behaved similarly to the non-stressed animals, as if they had not been stressed. It is important to note that, in addition to the behavioral differences between resilient and susceptible subjects, other behavioral or neurobiological measures may vary between phenotypes, which could be potential indicators of vulnerability to stress. Therefore, further research is needed to elucidate the relative contribution of epigenetic, genetic, and environmental factors to the emergence of these phenotypes.

Glucocorticoid stress hormones are crucially involved in modulating mnemonic processing of emotionally arousing experiences (Cordero et al., 2003; de Quervain et al., 2017). Furthermore, glucocorticoids are crucial regulators of inflammation and immunity (Jung et al., 2015) and a growing body of literature suggests that stress significantly impacts on many facets of neuroimmune function (Uchoa et al., 2014). So, it is to be expected that stress has pro-inflammatory effects (Furtado and Katzman, 2015) that may be counteracted by anti-inflammatory treatments. The nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin has been found to effectively reduce

levels of pathophysiologically increased inflammation (Monje et al., 2003) and to exert a positive impact on neurogenesis in pathophysiological inflammation-associated models (Monje et al., 2003, Hoehn et al., 2005). Therefore, considering the relationship between glucocorticoids, inflammation and memory, we expected to observe a favorable effect of indomethacin on the detrimental consequences of CSDS on memory in mice, partly mediated by inflammatory processes. Among the stressed susceptible animals, those receiving indomethacin, unlike those that received saline, learned the IA task (emotional memory) to the same extent as the non-stressed mice receiving saline. This shows that chronic indomethacin treatment was effective in attenuating the emotional memory impairment produced by social stress in susceptible subjects. Given that wounding occurs with CSDS, it is difficult to establish if the behavioral effects of indomethacin are due to its peripheral or central actions, based only on evidence from our study in which we have exclusively studied behavioral measures. Nevertheless, studies that have not involved CSDS (and therefore without wounding) and in which indomethacin has been intraperitoneally administered have reported behavioral effects of this drug on the inhibitory avoidance task (e.g. Sato et al., 2007) and the Morris water maze (e.g. Teather et al., 2002; Ishida et al., 2007). Other studies without CSDS but using intrahippocampal administration of indomethacin also found this drug to have behavioral effects (e.g. Stéphan et al., 2003; Assadian Narenji et al., 2012). Furthermore, it has been reported that social defeat activates the immune system, producing lasting changes in peripheral and central inflammation parameters (Pfau and Russo, 2016). Indeed,

Fuertig et al. (2016), who used a modified protocol of CSDS with minimal physical wounding, observed higher blood levels of inflammation parameters in the amygdala and the hippocampus of stressed animals. Taking into consideration the aforementioned studies, we believe the effects of indomethacin on memory observed in our study were mediated more by its central actions than its peripheral actions.

In contrast to emotional memory, this treatment was not effective in counteracting the NOR task impairment produced by CSDS in relation to recognition memory. These results could be explained by the specific brain areas implicated in the NOR task, among which, in addition to the hippocampus, the perirhinal cortex, a cortical area adjacent to the hippocampus, also plays a major role. These structures are highly integrated, but while the perirhinal cortex is involved in object recognition after short retention intervals, the hippocampus is responsible for long-term object recognition (Reger et al., 2009). Therefore, a longer retention interval between training and test phases is probably necessary to observe the reversing effects of indomethacin on the NOR task impairment observed in our study. Indeed, there are inconsistencies in the literature regarding the effectiveness of indomethacin in reversing inflammation in the hippocampus. Although it has been shown to be effective in enhancing learning and memory by facilitating hippocampal synaptic transmission (see Kanno et al., 2012), some studies have found that indomethacin is unable to effectively attenuate neuroinflammation and protect neurons in the hippocampus (Boehme et al., 2014; Sorrells et al., 2014). The lack of effect of indomethacin on NOR performance could also stem from the

10-day gap between the last drug injection and NOR testing; in other words, it is possible that after the last administration the effects of indomethacin on recognition memory diminish over time and become undetectable at a certain point. Nevertheless, it is important to note that, in the other memory task (IA), where there was a 9-day gap between the last injection and the test session, effects of the drug (and of CSDS) were observed. On the other hand, the high inter-group variabilities (reflected by the SEM bars in Fig 3) could also explain the lack of differences between the NOR discrimination index in the SUS+SAL and SUS+IND groups. Nonetheless, it was confirmed that there were no outliers in our NOR data. Even so, the explanation for the differential effects of the drug must be proposed with caution. In relation to nonstressed mice, we found that indomethacin prevented the formation of emotional memory, whereas it did not disrupt recognition memory. Similarly, it has been reported that indomethacin impaired passive avoidance memory in mice (Sato et al., 2007) and in chicks (Holscher, 1995). Given that the neurobiological action of indomethacin on specific brain areas involved in these types of memory were not directly evaluated in our study, it is not possible to give a comprehensive explanation for the unexpected differential results on emotional memory in non-stressed and stressed subjects. Therefore, further research is required to better understand the effects of this drug on memory.

In relation to motor activity, stressed mice did not show significant changes in spontaneous locomotor activity. Although several studies have found a decrease in motor activity in defeated animals of several species, such as rats (e.g. Watt et al., 2009), tree shrews (e.g. Van

Kampen et al., 2000) and mice (e.g. Iñiguez et al., 2014), our data are in accordance with results obtained previously in our laboratory in mice (Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016). This lack of motor effects was evident not only in the elevated plus-maze task (in which no differences were observed in the number of closed arms entries), but also in the inhibitory avoidance task, as no statistically significant differences were observed among the groups in terms of their training latencies. Therefore, it can be concluded that the effects of CSDS on memory were not secondary to the motor effects of stress.

In this study, CSDS induced different levels of anxiety in stressed and non-stressed animals, as anxiety-like behavior was heightened in socially defeated mice (i.e., lower percentage of open arm entries). There is increasing evidence of enhancement of anxiety-like behaviors in rodents, as a consequence of social stress, when measured in the elevated plus-maze test (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007; Razzoli et al., 2011; Bahi, 2013; Negrón-Oyarzo et al., 2014; Monleón et al., 2015, 2016; Duque et al., 2016), although the absence of this anxiogenic effect has also been reported (Martinez et al., 1998; Monleón et al., 2015). Similar to our results, other studies have found that defeated mice from both the susceptible and unsusceptible groups displayed anxiety-like behavior in the elevated plus-maze test (e.g. Krishnan et al., 2007; Yang et al., 2016; Jianhua et al., 2017) as well as in other anxiety tests, such as the open field test (e.g. Yang et al., 2016) and the light/ dark preference test (e.g. Smith et al., 2011). It is possible that the lack of difference in anxiety between resilient and susceptible animals stems from the large within-group variability. Nevertheless, we ran a further analysis distinguishing a third group of



“in-between” animals by clusters based on the SI Ratio, and the three stressed groups also showed higher anxiety (without significant differences between them) than the non-stressed mice. Anxiety could act as a confounding factor in the effects of CSDS on memory. On the one hand, the higher level of anxiety/fear observed in stressed animals in this study could have resulted in these subjects taking longer to enter the dangerous compartment; as a consequence, their IA performance would have improved. However, our stressed mice did not display IA learning, despite their enhanced anxiety. On the other hand, this higher level of anxiety in the stressed mice could have resulted in them being more active and having lower test latencies. Nevertheless, it is important to note that there were no significant differences in locomotor activity between stressed and non-stressed mice in either the elevated plus maze or with respect to training latencies of IA. Therefore, we believe that the effects of CSDS on memory are not secondary to its effects on anxiety. In this study, no effects of chronic indomethacin treatment were observed in either stressed or non-stressed animals. Little is known about the effects of indomethacin on anxiety, but Smith et al. (2011) reported that indomethacin had no significant effect on the cardiovascular response of conscious lambs to lipopolysaccharide. Therefore, it is not surprising that our study observed the inefficacy of indomethacin in reducing symptoms of anxiety in stressed mice.

Pain research has shown that not all noxious stimuli are processed centrally or peripherally in the same way and not all aversive stimuli are capable of eliciting an analgesic response, but can, in fact, elicit a hyperalgesic response (Craig, 2006). Indeed, stress can affect pain

perception differentially, as accession of hyperalgesia or hypoalgesia depends on the type of stressor, as well as its intensity and duration (Imbe et al., 2006; Butler and Finn, 2009). It has been argued that this dual action of stress–exacerbation vs. inhibition–on pain modulation depends to a great extent on pre-existing conditions, in particular previous pain experience associated with methodological factors, along with previous adverse life events (Larauche et al., 2012). In our study, pain sensitivity in chronically defeated mice was indistinguishable from that in non-defeated animals. In the same way, Aghajani et al. (2012) reported that pain behavior in an unstable group (whose cage-mate was changed) did not differ from control animals. Therefore, similar to the rationale applied to motor and emotional effects, we believe that the effects of CSDS on emotional memory are not secondary to its effects on pain sensitivity.

As with any research, our study has its limitations and strengths. From our perspective, the main limitation is the lack of stress hormones measures (e.g. corticosterone levels) and other physiological measures, such as inflammation parameters (e.g. prostaglandins levels)–peripherally and centrally–that can be correlated with the behavioral data to determine the specific actions of indomethacin. Establishing the relationships between endocrine system, immune system and behavior will improve our knowledge about the real contribution of the agents mediating the effects of stress. This would obviously allow a more comprehensive interpretation of our results. These measures were not taken due to conditions in our laboratory in terms of facilities and resources necessary for performing such physiological analyses. Nevertheless, we plan to carry out future

studies including these measures (in collaboration with other labs where necessary). Another limitation stems from the order of tasks: when a set of behavioral tests is run, the results of each task can be influenced by experience acquired in the previous tests of the battery. Therefore, in our study, the NOR performance could have been biased by the previous IA experience. In fact, the IA test can in itself be stressful, and an inverted U-shaped relationship between footshock intensity and memory performance has been reported (Finsterwald et al., 2015). Nevertheless, it is important to note that the footshock intensity used in our study (0.3 mA) was lower than the minimum intensity (0.6 mA) used in the referenced study. Furthermore, the corticosterone levels in the animals receiving the lowest intensity were not significantly higher than those in naïve animals (Finsterwald et al., 2015). Based on this rationale, with IA being the main memory test in our line of research, we chose to perform the memory tasks in that order (IA before NOR), acknowledging that other studies have carried out these tasks in the same order (e.g. Lawlor et al., 2007; Borniger et al., 2014). In respect of the strengths of this study, we believe it represents a development in the study of pharmacological treatment of the effects of CSDS on memory. Our results show that treatment with the anti-inflammatory indomethacin is effective in attenuating CSDS-induced emotional memory impairment. Furthermore, we have importantly controlled several potential confounding factors (locomotor activity, emotionality and pain sensitivity) through complementary tasks.

## 6.6. CONCLUSIONS

This study shows that: i) Social stress impairs both emotional memory (inhibitory avoidance test) and recognition memory (novel object recognition task) in susceptible subjects; ii) Social stress induces anxiety in post-pubertal mice; iii) The effects of social stress on emotional memory, but not on recognition memory and anxiety, are reversed by indomethacin; iv) The detrimental effects of social stress on emotional and recognition memory are not secondary to the effects of stress on locomotor activity, emotionality or pain sensitivity; v) The social interaction test is confirmed to be a useful tool for distinguishing between subjects that are resilient or susceptible to the effects of CSDS; vi) CD1 is a valid strain of mice to use as stressed subjects in the CSDS protocol, therefore confirming previous evidence.

## 6.7. REFERENCES

- Aghajani M, Vaez Mahdavi MR, Khalili Najafabadi M, Ghazanfari T. The effect of social stress on chronic pain perception in female and male mice. *PLoS One* 2012; 7: e47218. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047218>. PMID: 23082150.
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 2012; 13: 93–110. doi: <http://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>. PMID: 22160349.
- Assadian Narenji S, Naghdi N, Oryan S, Azadmanesh K. Effect of 3 $\alpha$ -androstane-20-one and indomethacin on acquisition, consolidation and retrieval stage of spatial memory in adult male rats. *Iran Biomed J* 2012; 16: 145–155. doi: <http://doi.org/10.6091/IBJ.1046.2012>.
- Azzinnari D, Sigrist H, Staehli S, Palme R, Hildebrandt T, Leparç G et al. Mouse social stress induces increased fear conditioning, helplessness and fatigue to physical challenge together with markers of altered immune and dopamine function. *Neuropharmacology* 2014; 85: 328–341. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.039>.

- Bahi A. Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. *Stress* 2013; 16: 441–451. doi: <http://doi.org/10.3109/10253890.2012.754419>. PMID: 23194312.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 2006; 311: 864–868. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1120972>. PMID: 16469931.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* 2001; 73: 261–271. doi: [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8). PMID: 11438351.
- Boehme M, Guenther M, Stahr A, Liebmann M, Jaenisch N, Witte OW, et al. Impact of indomethacin on neuroinflammation and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Neurosci Lett* 2014; 572: 7–12. doi: <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.043>. PMID: 24796813.
- Borniger JC, McHenry ZD, Abi Salloum BA, Nelson RJ. Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiol Behav* 2014; 133: 99–106. doi: <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.012>.
- Buller KM, Xu Y, Day T. Indomethacin attenuates oxytocin and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1 beta. *J Neuroendocrinol* 1998; 10: 519–528. doi: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1998.00231.x>. PMID: 9700679.
- Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 184–202. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>. PMID: 19393288.
- Campeau S, Liberzon I, Morilak D, Ressler K. Stress modulation of cognitive and affective processes. *Stress* 2011; 14: 503–519. doi: <http://doi.org/10.3109/10253890.2011.596864>. PMID: 21790481.
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr* 2013; 35: S101–11. doi: <http://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>. PMID: 24271222.
- Castro P, Nasser H, Abrahão A, Dos Reis LC, Riça I, Valença SS, et al. Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1029–1039. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.12.012>. PMID: 19161990.
- Charney DS, Manji HK. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 2004; 225: re5. doi: <http://doi.org/10.1126/stke.2252004re5>. PMID: 15039492.
- Cordero MI, Venero C, Kruyt ND, Sandi C. Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats. Evidence for a role of corticosterone. *Horm Behav* 2003; 44: 338–345. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00160-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00160-0).
- Costa-Nunes J, Zubareva O, Araújo-Correia M, Valença A, Schroeter CA, Pawluski JL, Vignisse J, Steinbusch H, Hermes D, Phillipines M, Steinbusch HM, Strekalova T. Altered emotionality, hippocampus-dependent performance and expression of

- NMDA receptor subunit mRNAs in chronically stressed mice. *Stress* 2014; 17: 108–116. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2013.872619>.
- Craig KD. Emotions and psychobiology. In: McMahon, S.B., Koltzenburg, M., (Eds.), *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, Elsevier, Philadelphia; 2006: pp. 231–240.
- de Quervain D, Schwabe L, Roozendaal B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18: 7–19. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.155>.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav R* 2007; 3: 673–704. doi: <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.005>. PMID: 17368764.
- Duque A, Vinader-Caerols C, Monleón S. Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice. *Acta Neurobiol Exp* 2016; 76: 225–233. PMID: 27685775.
- Eagle AL, Fitzpatrick CJ, Perrine SA. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. *Behav Brain Res* 2013; 256: 591–597. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.014>. PMID: 24036168.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Lüthi A. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 2009; 62: 757–771. doi: <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>. PMID: 19555645.
- Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010; 215: 244–254. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>. PMID: 20060020.
- Fagundes CP, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain Behav Immun* 2013; 27: 8–12. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.014>. PMID: 22771426.
- File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 1978; 62: 19–24. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>. PMID: 563752.
- Finsterwald C, Steinmetz AB, Travaglia A, Alberini CM. From memory impairment to posttraumatic stress disorder-like phenotypes: the critical role of an unpredictable second traumatic experience. *J Neurosci* 2015; 35: 15903–15915. doi: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-15.2015>.
- Fuertig R, Azzinnari D, Bergamini G, Cathomas F, Sigrist H, Seifritz E, Vavassori S, Luippold A, Hengerer B, Ceci A, Pryce CR. Mouse chronic social stress increases blood and brain kynurenine pathway activity and fear behaviour: Both effects are reversed by inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Brain Behav Immun* 2016; 54: 59–72. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.020>.
- Furtado M, Katzman MA. Neuroinflammatory pathways in anxiety, posttraumatic stress, and obsessive compulsive disorders. *Psychiatry Res* 2015; 229: 37–48. doi: <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.05.036>. PMID: 26296951.

- Gold PE. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 1986; 46: 87–98. doi: [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)90927-1](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(86)90927-1). PMID: 3015121.
- Golden SA, Covington HE, Berto, O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols* 2011; 6: 1183–1191. doi: <http://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>. PMID: 21799487.
- Heise GA. Learning and memory facilitators: Experimental definition and current status. *Trends Cogn Sci* 1981; 2: 158–160. doi: [http://doi.org/10.1016/0165-6147\(81\)90297-2](http://doi.org/10.1016/0165-6147(81)90297-2).
- Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 2005; 36: 2718–2724. doi: <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000190020.30282.cc>. PMID: 16282546.
- Holder MK, Blaustein JD. Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35: 89–110. doi: <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.004>.
- Holscher C. Inhibitors of cyclooxygenase produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Eur J Neurosci* 1995; 7:1360–1365. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01127.x>. PMID: 7582110.
- House JS, Landis KR, Umberson D. Social relationships and health. *Science* 1988; 241: 540–545. doi: <http://doi.org/10.1126/science.3399889>. PMID: 3399889.
- Huang GB, Zhao T, Gao XL, Zhang HX, Xu YM, Li H, Lv LX. Effect of chronic social defeat stress on behaviors and dopamine receptor in adult mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 66: 73–79. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.12.002>.
- IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. IBM Corp, Armonk, NY; 2010.
- Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci* 2006; 11: 2179–2192. doi: <http://doi.org/10.2741/1960>. PMID: 16720304.
- Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, et al. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* 2014; 17: 247–255. doi: <http://doi.org/10.3109/10253890.2014.910650>. PMID: 24689732.
- Ishida T, Sato T, Irifune M, Tanaka K, Nakamura N, Nishikawa T. Effect of acetaminophen, a cyclooxygenase inhibitor, on Morris water maze task performance in mice. *J Psychopharmacol* 2007; 21: 757–767. doi: <http://doi.org/10.1177/0269881107076369>.
- Izquierdo I, Medina JH. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology* 1997; 25: 1–9. doi: <http://doi.org/10.1006/nlme.1997.3799>.
- Jaremka LM, Fagundes CP, Glaser R, Bennett JM, Malarkey WB, Kiecolt-Glaser JK. Loneliness predicts pain, depression, and fatigue: understanding the role of

- immune dysregulation. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38: 1310–1317. doi: <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.11.016>. PMID: 23273678.
- Jianhua F, Wei W, Xiaomei L, Shao-Hui W. Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. *Behav Brain Res* 2017; 316: 136–144. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.011>.
- Jung SH, Wang Y, Kim T, Tarr A, Reader B, Powell N, et al. Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA. *Brain Behav Immun* 2015; 44: 195–206. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.015>. PMID: 25317829.
- Kanno T, Yaguchi T, Nagata T, Shimizu T, Tanaka A, Nishizaki T. Indomethacin enhances learning and memory potential by interacting with CaMKII. *J Cell Physiol* 2012; 227: 919–926. doi: <http://doi.org/10.1002/jcp.22800>. PMID: 21503887.
- Kenney JW, Adoff MD, Wilkinson DS, Gould TJ. The effects of acute, chronic, and withdrawal from chronic nicotine on novel and spatial object recognition in male C57BL/6J mice. *Psychopharmacology* 2011; 217: 353–365. doi: <http://doi.org/10.1007/s00213-011-2283-7>. PMID: 21487656.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 2007; 131: 391–404. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>. PMID: 17956738.
- Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008; 455: 894–902. doi: <http://doi.org/10.1038/nature07455>.
- Krishnan V. Defeating the fear: new insights into the neurobiology of stress susceptibility. *Exp Neurol* 2014; 261: 412–416. doi: <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.012>. PMID: 24852100.
- Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 38: 315–320. doi: [http://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90284-9](http://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90284-9). PMID: 2057501.
- Kumar S, Hultman R, Hughes D, Michel N, Katz BM, Dzirasa K. Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. *Nat Commun* 2014; 5: 4537. doi: <http://doi.org/10.1038/ncomms5537>. PMID: 25072279.
- Larauche M, Mulak A, Taché Y. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp Neurol* 2012; 233: 49–67. doi: <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.04.020>. PMID: 21575632.
- Lawlor PA, Bland RJ, Das P, Price RW, Holloway V, Smithson L, Dicker BL, During MJ, Young D, Golde TE. Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. *Mol Neurodegener* 2007; 2: 11. doi: <http://doi.org/10.1186/1750-1326-2-11>.
- LeDoux J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 2003; 23: 727–738. doi: <http://doi.org/10.1023/A:1025048802629>. PMID: 14514027.



- Lee S, Kim SJ, Kwon OB, Lee JH, Kim JH. Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Front Neural Circuits* 2013; 7: 129. doi: <http://doi.org/10.3389/fncir.2013.00129>. PMID: 23914157.
- Lehmann ML, Brachman RA, Martinowich K, Schloesser RJ, Herkenham M. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. *J Neurosci* 2013; 33: 2961–2972. doi: <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3878-12.2013>.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92: 180–185. doi: <http://doi.org/10.1007/BF00177912>.
- Lukas M, Toth I, Reber SO, Slattery DA, Veenema AH, Neumann ID. The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 2159–2168. doi: <http://doi.org/10.1038/npp.2011.95>. PMID: 21677650.
- Lupien, SJ, Nair NP, Brière S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, et al. Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 1999; 10: 117–139. doi: <http://doi.org/10.1515/REVNEURO.1999.10.2.117>. PMID: 10658955.
- Martinez M, Calvo-Torrent A, Pico-Alfonso MA. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. *Aggress Behav* 1998; 24: 241–256. doi: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M).
- McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 1–28. doi: <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>. PMID: 15217324.
- Meduri JD, Farnbauch LA, Jasnow AM. Paradoxical enhancement of fear expression and extinction deficits in mice resilient to social defeat. *Behav Brain Res* 2013; 256: 580–590. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.009>. PMID: 24029700.
- Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav* 2013; 39: 269–279. doi: <http://doi.org/10.1002/ab.21481>. PMID: 23588702.
- Mesa-Gresa P, Ramos-Campos M, Redolat R. Corticosterone levels and behavioral changes induced by simultaneous exposure to chronic social stress and enriched environments in NMRI male mice. *Physiol Behav* 2016; 158: 6–17. doi: <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.027>. PMID: 26905450.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003; 302: 1760–1765. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1088417>. PMID: 14615545.
- Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C. Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice. *Behav Process* 2016; 124: 23–31. doi: <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.12.002>. PMID: 26679824.

- Monleón S, Duque A, Vinader-Caerols C. Inhibitory avoidance learning in CD1 mice: Effects of chronic social defeat stress. *Behav Process* 2015; 115: 64–69. doi: <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.03.003>. PMID: 25745884.
- Morrissey MD, Mathews IZ, McCormick CM. Enduring deficits in contextual and auditory fear conditioning after adolescent, not adult, social instability stress in male rats. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 95: 46–56. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2010.10.007>.
- Negrón-Oyarzo I, Pérez MÁ, Terreros G, Muñoz P, Dagnino-Subiabre A. Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex. *Behav Brain Res* 2014; 259: 342–53. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.11.001>. PMID: 24216268.
- Ohl F, Fuchs E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive Brain Res* 1999; 7: 379–87. doi: [http://doi.org/10.1016/S0926-6410\(98\)42-1](http://doi.org/10.1016/S0926-6410(98)42-1). PMID: 9838198.
- Ohl F, Fuchs E. Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 319–323. doi: [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)33-5](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(98)33-5). PMID: 9884125.
- Okada R, Fujiwara H, Mizuki D, Araki R, Yabe T, Matsumoto K. Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory in mice. *Neuroscience* 2015; 299: 134–145. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.064>.
- Panksepp J, Burgdorf J, Beinfeld MC, Kroes RA, Moskal JR. Regional brain cholecystokinin changes as a function of friendly and aggressive social interactions in rats. *Brain Res* 2004; 1025: 75–84. doi: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.076>. PMID: 15464747.
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 2013; 1539: 73–86. doi: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.033>. PMID: 24096214.
- Pérez-Tejada J, Arregi A, Gómez-Lázaro E, Vegas O, Azpiroz A, Garmendia L. Coping with chronic social stress in mice: hypothalamic-pituitary-adrenal/sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment: implications for the study of stress-related psychopathologies. *Neuroendocrinology* 2013; 98: 73–88. doi: <http://doi.org/10.1159/000353620>. PMID: 23796983.
- Pfau ML, Russo SJ. Neuroinflammation regulates cognitive impairment in socially defeated mice. *Trends Neurosci* 2016; 39: 353–355. doi: <http://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.004>.
- Powell ND, Sloan EK, Bailey MT, Arevalo JM, Miller GE, Chen E, et al. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via  $\beta$ -adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 16574–16579. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.1310655110>. PMID: 24062448.

- Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Shah M, Caligiuri M, et al. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *J Neuroimmunol* 2001; 115: 36–45. doi: [http://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00273-9](http://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00273-9). PMID: 11282152.
- Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Michielin F, Ballottari A, Arban R. Strain-specific outcomes of repeated social defeat and chronic fluoxetine treatment in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 97: 566–76. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.010>. PMID: 20863846.
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 2009; 51: 672–678. <http://doi.org/10.1002/dev.20402>. PMID: 19739136.
- Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801–810. doi: [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9). PMID: 9415905.
- Rothwell NJ. Annual review prize lecture: cytokines-killers in the brain? *J Physiol* 1999; 514: 3–17. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.003af.x>. PMID: 9831712.
- Sato T, Ishida T, Irifune M, Tanaka K, Hirate K, Nakamura N, Nishikawa T. Effect of NC-1900, an active fragment analog of arginine vasopressin, and inhibitors of arachidonic acid metabolism on performance of a passive avoidance task in mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 560: 36–41. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.011>.
- Schroeder A, Buret L, Hill RA, van den Buuse M. Gene-environment interaction of reelin and stress in cognitive behaviors in mice: Implications for schizophrenia. *Behav Brain Res* 2015; 287: 304–314. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.063>. PMID: 25845740.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013; 106-107: 1–16. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
- Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Meth* 2007; 166: 99–103. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.06.032>. PMID: 17719091.
- Smith FG, Fewell JE, Qi W. Indomethacin abolishes core temperature, but not cardiovascular or renal, responses to lipopolysaccharide in conscious lambs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38: 494–500. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05536.x>. PMID: 21585420.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. University Press, Ames, The Iowa State; 1980.
- Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC, Yen S, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats. *Neuroendocrinology* 2014; 100: 129–140. doi: <http://doi.org/10.1159/000367849>. PMID: 25228100.

- Stackman RW, Eckenstein F, Frei B, Kulhanek D, Nowlin J, Quinn JF. Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp Neurol* 2003; 184: 510–520. doi: [http://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00399-6](http://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00399-6). PMID: 14637120.
- Stankiewicz AM, Goscik J, Majewska A, Swiergiel AH, Juszcak GR. The Effect of Acute and Chronic Social Stress on the Hippocampal Transcriptome in Mice. *PLoS One* 2015; 10: e0142195. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0142195>. PMID: 26556046.
- Stéphan A, Laroche S, Davis S. Learning deficits and dysfunctional synaptic plasticity induced by aggregated amyloid deposits in the dentate gyrus are rescued by chronic treatment with indomethacin. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1921–1927. doi: <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02610.x>.
- Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 247–258. PMID: 17652824.
- Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem* 2002; 9: 41–47. doi: <http://doi.org/10.1101/lm.43602>.
- Toth I, Neumann ID. Animal models of social avoidance and social fear. *Cell Tissue Res* 2013; 354: 107–118. doi: <http://doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>. PMID: 23760888.
- Touyarot K, Venero C, Sandi C. Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 290–305. doi: [http://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00031-3](http://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00031-3). PMID: 14604607.
- Uchoa ET, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, de Sousa MB. Novel aspects of glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol* 2014; 26: 557–572. doi: <http://doi.org/10.1111/jne.12157>. PMID: 24724595.
- Van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, Fuchs E. Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65: 539–546. doi: [http://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00190-2](http://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00190-2). PMID: 10683496.
- Vinader-Caerols C, Martos AJ, Monleón S, Arenas MC, Parra A. Acute effects of maprotiline on learning, anxiety, activity and analgesia in male and female mice. *Acta Neurobiol Exp* 2006; 66: 23–31. doi: <http://dx.doi.org/10.16617674>. PMID: 16617674.
- Vinader-Caerols C, Parra A, Monleón S. Effects of antidepressants on inhibitory avoidance in mice: a review. In: Lu, R-B. (Ed.), *Effects of Antidepressants*. Intech, Rijeka; 2012: pp. 23–46. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/38540>.
- Wang J, Chai A, Zhou Q, Lv L, Wang L, Yang Y, et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews. *PLoS One* 2013; 8: e80980. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080980>. PMID: 24312510.

- Wang XD, Chen Y, Wolf M, Wagner KV, Liebl C, Scharf SH, et al. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol Dis* 2011; 42: 300–310. doi: <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.020>. PMID: 21296667.
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster G. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behav Neurosci* 2009; 123: 564–576. doi: <http://doi.org/10.1037/a0015752>. PMID: 19485563.
- Wolf OT. The influence of stress hormones on emotional memory: relevance for psychopathology. *Acta Psychol* 2008; 127: 513–531. doi: <http://doi.org/10.1016/j.actpsy.2007.08.002>. PMID: 17900515.
- Yang L, Shi LJ, Yu J, Zhang YQ. Activation of protein kinase A in the amygdala modulates anxiety-like behaviors in social defeat exposed mice. *Mol Brain* 2016; 9: 3. doi: <http://doi.org/10.1186/s13041-015-0181-3>.
- Yerkes RM, Dodson JD. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol Psychol* 1908; 18: 459–482. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.920180503>.



# **CAPÍTULO VII.**

## **DISCUSIÓN GENERAL**

---





## **7.1. PRINCIPALES HALLAZGOS**

Los principales resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas internacionales de impacto, contribuyendo a la literatura científica existente sobre el modelo de CSDS y sus efectos sobre la memoria, así como su posible modulación farmacológica. En general, estos resultados reflejan la validez del modelo de CSDS en ratones como un paradigma capaz de generar alteraciones conductuales incapacitantes para el sujeto víctima de este tipo de estrés social. Además, se han evaluado las consecuencias de este tipo de experiencia estresante en función de la susceptibilidad-resiliencia de los sujetos, difiriendo ambos fenotipos en medidas de aprendizaje y memoria. Asimismo, se ve plasmada la utilidad de tratamientos farmacológicos específicos, como antidepresivos o antiinflamatorios, para poder hacer frente a los efectos nocivos del CSDS y, más concretamente, a las alteraciones producidas sobre la memoria emocional.

Es importante destacar que, en el contexto de la presente Tesis Doctoral, se hace referencia a niveles bajos, intermedios y muy altos de estrés tomando como referencia los grados de CSDS aplicados en los estudios contenidos en la misma. El nivel bajo se ubica en 5 ó 10 sesiones de 10 minutos de encuentros agonísticos + 1 hora de contacto sensorial posterior durante 20 días consecutivos; el nivel intermedio en sesiones diarias de 5 minutos de encuentros agonísticos + 1 hora de contacto sensorial posterior durante 20 días consecutivos y finalmente el nivel muy alto en sesiones diarias de 10

minutos de encuentros agonísticos + 1 hora de contacto sensorial posterior durante 20 días consecutivos.

A continuación, se presenta un resumen de los mismos en función de los objetivos e hipótesis planteados.

**Objetivo general 1:** estudiar los efectos producidos por la experiencia crónica de derrota social sobre la memoria en ratones.

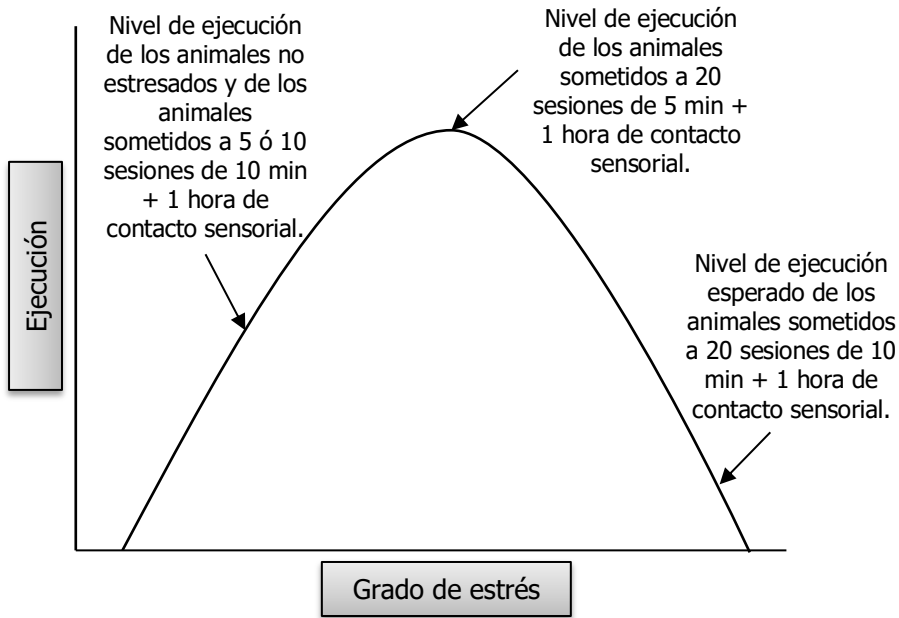
- ✓ **Objetivo específico 1.1:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria emocional de los ratones estresados.

Varios estudios en la literatura han evaluado los efectos de la derrota social crónica sobre la memoria emocional en roedores, basándose en el aprendizaje pauloviano de miedo condicionado, estando bien establecido que los sujetos derrotados muestran en general una mejor ejecución respecto a los animales controles. Sin embargo, también es cierto que los hallazgos varían en función de la edad de los sujetos, así como de la intensidad de la situación social estresante, lo cual se hace patente en los estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, observamos una modulación de la variable edad en los resultados obtenidos. Los ratones que fueron estresados en su etapa adulta (a partir de los 70 días de edad) sometidos a un nivel intermedio de CSDS no vieron afectada su memoria emocional, mostrando aprendizaje de IA similar a los controles (estudio 2). Sin embargo, los ratones que fueron estresados socialmente en la etapa postpubertal o adolescencia tardía (a partir de los 42 días de edad), sí que experimentaron las consecuencias en su memoria emocional. De

forma más concreta, un nivel intermedio de CSDS mejoró su ejecución, mostrando aprendizaje de IA y siendo sus latencias de test más elevadas que las de los animales controles (estudio 1). En contraste, un nivel muy alto de CSDS deterioró su ejecución, no mostrando aprendizaje de la tarea de IA (estudios 3, 5-7).

En segundo lugar, en el caso de los ratones postpubertales, se ve reflejada la influencia de la variable intensidad de la experiencia estresante. Un nivel bajo de CSDS no tuvo efecto en la ejecución de los animales derrotados, habiendo aprendizaje de la tarea; un nivel intermedio mejoró su ejecución respecto al grupo control; finalmente, un nivel muy alto deterioró su ejecución. En este contexto, como ya se mencionó, la Ley de Yerkes-Dodson plantea la existencia de una relación en forma de U invertida entre los niveles de estrés y la eficacia al realizar una tarea cognitiva. En principio, a mayor activación, mejor rendimiento; sin embargo, una vez pasado el punto óptimo de activación, el rendimiento cae de manera brusca. En el contexto de la presente Tesis Doctoral, niveles bajos de estrés no tienen efecto sobre la eficacia al realizar la tarea de IA, mostrando los animales estresados aprendizaje de la tarea IA, al igual que los animales no estresados (estudio 3); niveles muy altos producen una baja eficacia, no mostrando los animales estresados un aprendizaje de la tarea a diferencia de los animales no estresados (estudios 3, 5-7); y por último niveles intermedios conducen a una buena eficacia, mostrando los animales estresados no sólo un aprendizaje de la tarea de IA, sino una mayor latencia de test respecto a los animales no estresados (estudio 1). La figura 31 representa de forma gráfica los resultados en relación a la hipótesis 1.1.



**Fig. 31.** Representación gráfica de los resultados en relación a la hipótesis 1.1.

Por tanto, se cumple la hipótesis 1.1. en el caso de los ratones postpubertales, ya que mientras que niveles bajos de CSDS no tienen efectos, niveles intermedios mejoran y niveles muy altos deterioran la memoria emocional de los animales derrotados.

- ✓ **Objetivo específico 1.2:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria espacial de los ratones estresados.

Como ya se ha comentado anteriormente, el hipocampo es una estructura críticamente implicada en la regulación de la memoria espacial y, al mismo tiempo, es una región directamente afectada por el estrés. De hecho, se ha visto que los niveles sostenidos de corticosteroides derivados del estrés crónico o del tratamiento

exógeno con GCs en roedores producen un cambio en estructura y función hipocampales.

Nuestros resultados reflejan que no existe una ejecución diferente en la tarea del MWM entre los animales sometidos a los niveles bajos y muy alto de CSDS y los animales controles (estudio 4). Se observa que ambos grupos de ratones muestran una curva de aprendizaje adecuada durante las fases de adquisición. Asimismo, en la fase de retención, todos los animales pasan significativamente más tiempo en el cuadrante en el que se encontraba la plataforma durante las fases de adquisición en comparación con el resto de cuadrantes. Aunque no se cumple la hipótesis 1.2., estos resultados se ven corroborados por otros estudios en los que no se ha encontrado un deterioro de la memoria espacial de referencia por el CSDS, utilizando el MWM.

Estos resultados pueden sorprender teniendo en cuenta el deterioro observado en el caso de la memoria emocional; sin embargo, son destacables dos diferencias básicas entre las dos tareas empleadas que podrían explicar la causa de que el aprendizaje de miedo se vea afectado la mayoría de las veces por el estrés social (ya sea mejorándolo o deteriorándolo) y que el aprendizaje espacial no se vea afectado en unas ocasiones o se vea afectado (normalmente deteriorado) en otras. En el caso del MWM, los animales deben aprender a llevar a cabo una acción para escapar del agua subiéndose a una plataforma, un estímulo que (fuera del contexto del laberinto acuático) es neutro, mientras que, en el caso de la prueba de IA, los animales deben inhibir una tendencia natural de

aproximación a través de la administración de una descarga eléctrica, un estímulo que es intensamente aversivo por sí solo. Por ello, es probable que el CSDS tenga efectos en conductas innatas de aproximación basadas en la aplicación de estímulos salientes, ya sean aversivos (como ocurre en el caso de la evitación inhibitoria) o apetitivos (como se explicará en el caso de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso).

- ✓ **Objetivo específico 1.3:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria de reconocimiento de los ratones estresados.

Hasta la fecha, un reducido número de estudios han evaluado los efectos del estrés de derrota social sobre la memoria de reconocimiento, evaluada a partir de la tarea de NOR, y los resultados existentes son contradictorios. En nuestro caso, observamos un efecto con el grado más alto de CSDS sobre la memoria de reconocimiento, produciendo un deterioro en el caso de los ratones susceptibles (estudio 7). Por un lado, es cierto que no se observaron diferencias entre los grupos en el índice de discriminación, una medida clásicamente establecida para evaluar la memoria de reconocimiento en esta prueba. No obstante, cabe destacar la presencia de una elevada variabilidad dentro de los diferentes grupos (a pesar de no haber ningún sujeto con valores extremos en sus tiempos de exploración dentro de su grupo de referencia), lo cual pudo enmascarar el verdadero efecto del CSDS. Por otro lado, todos los grupos pasaron significativamente más tiempo explorando el objeto nuevo respecto al familiar, salvo en el

caso de los ratones susceptibles que pasaron el mismo tiempo explorando ambos objetos (los resultados relacionados con los ratones susceptibles vs resilientes serán comentados en el apartado del objetivo correspondiente).

Siguiendo con la argumentación presentada anteriormente, al igual que la prueba de IA, la tarea de NOR se basa en una conducta de aproximación, en este caso, a un estímulo nuevo, el cual es apetitivo, comparado con el estímulo familiar que sería neutro, lo cual vuelve a corroborar el razonamiento anteriormente planteado según el cual el CSDS afecta en conductas de aproximación basadas en la aplicación de estímulos naturalmente salientes.

Por tanto, se cumple parcialmente la hipótesis 1.3., ya que el CSDS produce un deterioro de la memoria de reconocimiento, lo cual se limita a una tendencia en el caso del índice de discriminación y a un verdadero efecto significativo en el caso de los tiempos de exploración.

- ✓ ***Objetivo específico 1.4:*** estudiar los efectos del CSDS sobre posibles variables contaminantes en la interpretación de los resultados obtenidos en la memoria de los ratones estresados.

Existen factores que pueden influir sobre las variables dependientes, dando lugar a una interpretación errónea de los efectos de las variables independientes y siendo fundamental por ello su control para poder extraer conclusiones adecuadas. Así, en la presente Tesis Doctoral, el control de determinadas variables como la ansiedad, la actividad locomotora y la sensibilidad al dolor ha sido

realmente importante para poder descartar elementos confundentes a la hora de dar sentido a los resultados obtenidos en las pruebas de memoria, especialmente en el caso de la memoria emocional.

En cuanto a la ansiedad, a diferencia de los animales sometidos a los niveles bajo e intermedio de CSDS, los ratones estresados que recibieron un nivel muy alto fueron los que mostraron un estado ansiógeno (estudios 1-7). Éste se manifestó a través del menor porcentaje de entradas en los brazos abiertos en el EPM, en comparación con los ratones controles. Sin embargo, este estado en los animales sometidos al nivel más alto de CSDS no debería dar lugar a una inadecuada interpretación de los resultados obtenidos, fundamentalmente en el caso de la memoria emocional, ya que, si realmente influyese el nivel de ansiedad de los animales, éstos en cualquier caso deberían haber tardado más en cruzar en la fase de test de la IA, lo cual no ocurrió. Así, en base a este razonamiento, se puede afirmar que los efectos del CSDS sobre la memoria emocional no son debidos a sus efectos sobre la ansiedad. Por tanto, se cumple en parte la hipótesis 1.4.1., ya que únicamente los animales sometidos al nivel más elevado de CSDS son los que mostraron mayor nivel de ansiedad.

Respecto a la actividad locomotora, tanto la prueba de IA como el EPM mostraron una ausencia de diferencias entre los grupos experimentales. En la tarea de IA, la fase de entrenamiento no reveló diferencias en las latencias entre los grupos (estudios 1-7) y, en el EPM (estudios 1-7), no hubo diferencias en el número de entradas en los brazos cerrados entre los grupos. Así, se puede decir que los



efectos del CSDS sobre las pruebas de memoria no son debidos a una mayor o menor activación motora de unos grupos respecto a otros. Por tanto, se cumple la hipótesis 1.4.2., ya que no hay efectos en esta medida en los ratones sometidos a CSDS.

Por último, en relación a la sensibilidad al dolor, del mismo modo que en el caso de la actividad locomotora, la prueba HP indicó una ausencia de diferencias entre los animales estresados y controles, ya que las latencias de retirada de las patas traseras fueron similares en todos los grupos (estudios 6 y 7), cumpliéndose la hipótesis 1.4.3. Estos resultados permiten interpretar de forma adecuada los datos obtenidos para la memoria emocional, basada en el recuerdo del sujeto de la administración de una descarga eléctrica, como un efecto del CSDS directamente sobre la memoria no explicado por sus efectos sobre el umbral de detección del estímulo negativo.

***Objetivo específico 1.5:*** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria en función del fenotipo resiliente *vs* susceptible de los ratones estresados.

Se sabe que el conocimiento de cómo difieren los animales susceptibles y resilientes frente al estrés social en medidas de aprendizaje y memoria proporciona una adecuada comprensión del síndrome de derrota social y su validez etológica en relación a determinados trastornos asociados al estrés. Es importante destacar que la prueba de interacción social no ha sido incluida desde el principio de la Tesis Doctoral, por lo que únicamente se presentan los datos relativos al nivel alto de CSDS.

Por un lado, nuestros resultados indican que emergen dos fenotipos diferenciados, en base al ratio de SI. En general, el fenotipo resiliente no muestra descensos en su conducta de interacción social tras la derrota social de forma similar a los animales no estresados; sin embargo, el fenotipo susceptible se caracteriza en mayor medida por su conducta de evitación social. Por otro lado, en cuanto a las conductas no sociales exhibidas por ambos fenotipos, existe un deterioro de la memoria emocional y de reconocimiento sólo en el caso de los ratones susceptibles, lo cual no ocurre en el caso de los ratones resilientes y controles. Por último, en relación a las medidas complementarias, se observa un efecto ansiogénico del CSDS tanto en los ratones susceptibles como en los resilientes (estudio 7).

Por tanto, se cumple la hipótesis 1.5., ya que, ante una misma situación estresante crónica, los sujetos reaccionan de diferente forma en función de su mayor-menor propensión a la enfermedad, lo cual vendría determinado en parte por su susceptibilidad-resiliencia al estrés. Así, todo ello plantea la necesidad de realizar más estudios que permitan conocer en qué aspectos se diferencian los sujetos en función de su mayor susceptibilidad o resiliencia al CSDS.

**Objetivo general 2:** estudiar la modulación farmacológica de las alteraciones cognitivas observadas en los ratones sometidos a una experiencia crónica de derrota social.

- ✓ **Objetivo específico 2.1:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico clomipramina sobre las alteraciones de memoria en los ratones estresados.

La administración crónica de clomipramina (inmediatamente anterior a cada sesión de derrota social diaria) revirtió los efectos deteriorantes producidos por un nivel muy alto de CSDS sobre la memoria emocional. Así, a diferencia de los animales derrotados tratados con salino, los animales derrotados tratados con clomipramina aprendieron la tarea de IA, siendo sus latencias en la fase de test superiores a las de entrenamiento (estudio 6).

En el caso del estado ansiógeno manifestado por los animales derrotados, la clomipramina no fue capaz de revertirlo, mostrando todos los animales derrotados, tanto los tratados con salino como con clomipramina, mayor ansiedad que los animales no derrotados (estudio 6).

Por tanto, se cumple la hipótesis 2.1. en relación a la memoria emocional, ya que los animales sometidos a CSDS tratados con clomipramina mostraron aprendizaje emocional, a diferencia de los sujetos derrotados que recibieron salino. Por otro lado, en cuanto a las variables contaminantes, aunque no se formuló una hipótesis de partida, se puede decir que, a pesar de que la clomipramina es un fármaco utilizado como tratamiento de preferencia para el trastorno de pánico, un trastorno típico de ansiedad, no hubo efecto del mismo sobre la ansiedad observada en los animales derrotados.

- ✓ **Objetivo específico 2.2:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antiinflamatorio indometacina sobre las alteraciones cognitivas en los ratones estresados.

La administración crónica de indometacina por sí sola deterioró la memoria emocional. Así, se observó una ausencia de aprendizaje en

este grupo, al no diferir las latencias de test y las de entrenamiento. Por otro lado, la indometacina fue efectiva en revertir el efecto deteriorante producido por el nivel más alto de CSDS sobre la memoria emocional de los ratones susceptibles. De esta forma, a diferencia de los animales susceptibles tratados con salino, los sujetos susceptibles tratados con indometacina aprendieron la tarea de IA, siendo sus latencias de test superiores a las de entrenamiento. En el caso de los ratones resilientes, tanto los tratados con salino como con indometacina, aprendieron la tarea de IA (estudio 7).

En relación a la memoria de reconocimiento, aunque se observó una tendencia, la indometacina no mejoró el rendimiento de los animales susceptibles, lo cual se manifestó a través de la ausencia de diferencias entre los tiempos de exploración del objeto familiar y del nuevo, al igual que ocurrió en los ratones susceptibles tratados con salino. En el caso de los animales resilientes, tanto los tratados con salino como con indometacina, mostraron memoria de reconocimiento (estudio 7).

En el caso de la respuesta de ansiedad manifestada por los animales derrotados, la indometacina no fue capaz de revertirla, mostrando todos los animales derrotados, resilientes y susceptibles, tratados con salino y con indometacina, una mayor ansiedad que los animales no derrotados (estudio 7).

Por tanto, se cumple la hipótesis 2.2. en relación a la memoria emocional, ya que los animales susceptibles tratados con indometacina mostraron aprendizaje emocional, a diferencia de aquellos sujetos susceptibles a los que se les administró salino. En

relación a la memoria de reconocimiento, no se cumple la hipótesis debido a que los animales susceptibles, tanto los tratados con salino como con indometacina, no mostraron memoria de reconocimiento. Por otro lado, en cuanto a las variables contaminantes, aunque no se formuló una hipótesis de partida, se puede decir que no hubo efecto de la indometacina sobre la ansiedad observada en los animales derrotados.

## **7.2. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Los resultados obtenidos y las conclusiones derivadas de los estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral ponen sobre la mesa determinadas limitaciones, algunas de las cuales han sido replanteadas como perspectivas de futuro a tener en cuenta en esta línea de investigación.

La principal limitación a la que se enfrenta la línea de investigación contenida en la Tesis Doctoral presentada se deriva del propio protocolo de CSDS, el cual se sabe que es invasivo para los animales. Sin embargo, es importante destacar que el protocolo experimental ha estado en todo momento en estricta conformidad con la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea de 22 de septiembre de 2010 (2010/63 / EU) y el Real Decreto español 53/2013, además de que todos los experimentos con animales han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia (número de autorización ética A13281856334). Asimismo, teniendo en cuenta las consecuencias físicas negativas de la derrota

social, como las heridas, los animales han estado bajo continuo control veterinario. Por último, las heridas fueron diariamente supervisadas, eliminando directamente del experimento a aquellos animales intrusos con heridas mayores a 1 cm. de extensión y, en aquellos estudios en los que fue necesario, la duración de las sesiones de derrota fue reducida (e.g. de 10 a 5 minutos).

Teniendo en cuenta que se ha demostrado que la edad es un factor modulador clave de los efectos del CSDS sobre la conducta y que se ha hecho uso fundamentalmente (a excepción del estudio 2) de animales en etapa postpuberal, sería importante introducir otras etapas del ciclo vital. Asimismo, incluso sabiendo que tiene efectos diferenciados cuando los sujetos estresados se hallan en la etapa postpuberal, se podría evaluar si también se produce una variabilidad de efectos cuando el CSDS es administrado en diferente frecuencia y duración durante la etapa adulta.

Como ya se ha explicado anteriormente, la prueba de SI que sirve como base para diferenciar los sujetos resilientes de los susceptibles frente al CSDS, se ha introducido en el último estudio de la presente Tesis Doctoral. Esto hace que, en el caso de la memoria espacial evaluada mediante el MWM, no haya datos respecto a las consecuencias del CSDS sobre este tipo de memoria en ratones resilientes y susceptibles. Así, sería necesario diferenciar la ejecución entre ambos fenotipos. En la misma línea, se podría evaluar los efectos diferenciales del CSDS en animales resilientes vs susceptibles sobre las memorias evaluadas, emocional y de reconocimiento, pero

también espacial, no sólo para el grado más alto de CSDS administrado sino también para el resto de niveles.

En cuanto a las pruebas complementarias, sería interesante el uso de otras pruebas que midan ansiedad y actividad locomotora o, incluso, tomar como referencia otras medidas dentro del EPM como podría ser el tiempo total transcurrido en los brazos abiertos y cerrados. Respecto a la prueba de percepción de dolor, resultaría más apropiado utilizar otros instrumentos de analgesia que utilicen el mismo tipo de estímulo doloroso que el empleado para evaluar la memoria emocional, una descarga eléctrica y, de este modo, poder extraer unas conclusiones más ajustadas.

La prueba de IA es el principal test de memoria tanto en la presente Tesis Doctoral como en la línea de investigación del equipo de trabajo en el que se encuadra este proyecto, por lo que se decidió desde el inicio dar prioridad a la misma sobre el resto de pruebas conductuales en los estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, gracias a las constructivas críticas de los revisores de los artículos, se ha tomado una mayor consciencia de que el orden de las pruebas puede afectar a los resultados obtenidos en función de lo estresantes que éstas puedan ser más allá de la importancia que el investigador les pueda otorgar a cada una de ellas. Por ello, sería conveniente aleatorizar las diferentes pruebas conductuales o elegir el orden de pase de los animales en función de lo aversivas que sean.

En relación al tratamiento farmacológico, debido a cuestiones pragmáticas, se decidió emplear una única dosis de cada uno de los

fármacos empleados. Sin embargo, también gracias a las sugerencias de los revisores de los artículos, se considera muy oportuna la posibilidad de conocer el efecto modulador que otras dosis de las sustancias utilizadas pudieran tener sobre las consecuencias conductuales del CSDS observadas en los estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, debido también a cuestiones pragmáticas y económicas, los fármacos empleados son sustancias con un mecanismo de acción muy conocido aunque no selectivo. Así, la clomipramina es un potente inhibidor de la recaptación de 5-HT aunque su principal metabolito activo, la desmeticlomipramina, actúa preferentemente inhibiendo la recaptación de NA. Por otro lado, la indometacina tiene un efecto mucho más intenso sobre la enzima COX-1 aunque también actúa sobre la COX-2. En este sentido, el escitalopram o la fluoxetina e, incluso, la paroxetina serían buenos fármacos antidepresivos candidatos y el celecoxib o el etoricoxib en el caso de los fármacos antiinflamatorios.

Se sabe que las medidas conductuales, aunque son una parte importante del patrón de respuesta del organismo, en ocasiones, necesitan ser complementadas con otro tipo de medidas a la hora de dar sentido a los resultados derivados de la investigación en neurociencias. Así, el uso de un solo nivel de análisis puede llevar a la pérdida de información relevante del fenómeno bajo estudio. En el caso de la presente Tesis Doctoral, ya sea por motivos de escasez de recursos económicos, de falta de formación del personal o, simplemente, por tradición investigadora con especial énfasis en observaciones conductuales, los estudios contenidos se centran exclusivamente en la evaluación conductual. Dicho nivel de análisis



suele ser el más “confuso”, en el sentido de que la conducta es la expresión última de una combinación de múltiples y muy variados factores biológicos determinantes. En este contexto, aunque se trata de dar sentido a los datos desde otros niveles de análisis, no dejan de ser elucubraciones e inferencias que podrían haber sido muchos más reveladoras combinadas con otros tipos de medidas, fisiológicas y/o cerebrales.

Por último, no sólo como una cuestión específica de los estudios contenidos en la presente Tesis Doctoral, sino de cualquier investigación que se lleve a cabo en animales, es necesario prestar una atención especial a la extrapolación de los resultados a la especie humana. Eso se debe al hecho de que, a diferencia de los experimentos con animales de laboratorio en los que todo es controlable, en el caso de los seres humanos, por claras razones éticas, hay muchos factores que escapan del control del investigador. Así, en el ámbito de estudio que nos ocupa, por ejemplo, la intensidad, la duración y la edad de inicio de la exposición es difícil de controlar y cuantificar en humanos. Por ello, serían necesarios más estudios, tanto en seres humanos como en animales, que permitan profundizar en las cuestiones más peliagudas con el fin de aportar suficiente evidencia científica, ya que no existe un único método verdadero, sino un gran número de ellos que, en conjunto, sean capaces de proporcionar una información fiable y válida del fenómeno que está siendo estudiado.

A pesar de las limitaciones comentadas, las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en los estudios contenidos en

la presente Tesis Doctoral reflejan lo incapacitante que puede llegar a ser para un sujeto el hecho de ser sometido a un ataque social continuo por parte de otros seres conspecíficos. Así, siendo los conflictos interpersonales los factores de estrés más frecuentes en la sociedad actual y el estrés social una de las mayores epidemias del siglo XXI, este fenómeno debe ser estudiado en profundidad de forma urgente con el fin de poder prevenir la aparición de los síntomas derivados de la exposición a éste o, en el caso de que éstos emerjan, poder paliarlos y combatirlos.

# **CAPÍTULO VIII.**

## **CONCLUSIONS**

---



The empirical studies presented in this doctoral thesis and their subsequent results led to some important conclusions which are outlined in this last chapter:

1. A moderate degree of Chronic Social Defeat Stress (CSDS) enhances the emotional memory involved in an inhibitory avoidance (IA) task in post-pubertal mice but it has no effects in adult mice.
2. A low degree of CSDS doesn't affect either the emotional memory of IA or the spatial memory formation of the Morris water maze (MWM) in post-pubertal mice.
3. A high degree of CSDS prevents the emotional memory of IA and the recognition memory formation of a novel object recognition (NOR) task, but it has no effects on the spatial memory of the MWM in post-pubertal mice.
4. A low or a moderate degree of CSDS don't have any effect on anxiety response in the elevated plus maze (EPM) in post-pubertal mice.
5. A moderate degree of CSDS doesn't have any effects on anxiety response in the EPM in adult mice.
6. A high degree of CSDS produced an anxious state evaluated in the EPM in post-pubertal mice.
7. None of the CSDS degrees applied has an effect on locomotor activity in the EPM in post-pubertal mice.
8. A high degree of CSDS doesn't have any effects on pain sensitivity in the hot plate in post-pubertal mice.

9. The detrimental effects of CSDS on emotional memory do not seem to be secondary to the effects of stress on emotionality, locomotor activity or pain sensitivity.
10. The social interaction test is confirmed to be a useful tool for distinguishing between subjects that are resilient and susceptible to the effects of CSDS.
11. CD1 is a valid strain of mice for use as stressed subjects in the CSDS protocol.
12. The memory impairment, but not the anxiety, produced by CSDS is attenuated by chronic treatment of the tricyclic antidepressant clomipramine.
13. The effects of CSDS on emotional memory, but not on recognition memory and anxiety, are reversed by chronic treatment of the anti-inflammatory indomethacin.

Overall, the studies contained in this doctoral thesis have demonstrated that CSDS may have different behavioral effects depending on several factors such as the age of the subjects at which the stressful experience begins; the frequency and duration of exposure to social stress; or the drugs administration. Initiated in the post-pubertal life stage, CSDS has cognitive effects in the adult stage that do not occur when it is totally administered in the adult stage. On the other hand, when CSDS begins to be implemented in the post-pubertal period, the duration and frequency of the stressful experience produce different kinds of effects on memory, deteriorating or enhancing it, and anxiety. Finally, the administration

of antidepressant and anti-inflammatory drugs can modulate some of the behavioral effects produced by CSDS but not others.





**CAPÍTULO IX.**  
**RESUMEN GENERAL**

---



## **9.1. INTRODUCCIÓN**

Todos hemos experimentado estrés alguna vez en nuestra vida, pero ¿qué es el estrés? Es una pregunta difícil de responder debido a que hay tantas definiciones del término como personas existen. De hecho, Hans Selye, uno de los fundadores del concepto moderno de estrés, afirmaba que "todo el mundo sabe qué es estrés y, al mismo tiempo, nadie sabe qué es estrés" (Selye, 1973). Más recientemente, McEwen y Wingfield (McEwen y Wingfield, 2003) planteaban que "el problema con el término estrés es que posee demasiados significados".

La Organización Mundial de la Salud define el estrés como "el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción" (OMS, 1994). Estas reacciones son, por ello, necesarias para la adaptación a nuevas situaciones que ponen en peligro la supervivencia del organismo por amenazar su homeostasis. Así, en un primer momento, el estrés sería adaptativo, ya que ayuda al individuo a funcionar de forma adecuada dentro de su entorno. Sin embargo, cuando la situación estresante se prolonga en el tiempo, hablamos de estrés crónico y es cuando empieza a emerger su faceta más desadaptativa. De hecho, en la sociedad actual, los grandes cambios que se están produciendo, fundamentalmente en relación a las nuevas tecnologías han hecho que el estrés se convierta en un problema de salud pública de interés cada vez más creciente.

El estrés es un concepto multidimensional que puede ser categorizado en base a diferentes parámetros como el tipo de

estresor, su intensidad, duración o frecuencia. En base a la dimensión origen o tipo de estresor, emerge la categoría social, también denominada emocional o psicosocial, que es conceptualizada como las contingencias sociales, incluyendo desde los sucesos vitales o hasta las relaciones con los congéneres y pudiendo ser negativas (e.g. separaciones, pérdidas...) o positivas (e.g. éxitos en las fases iniciales del matrimonio, nacimiento de un hijo) (Sandi y cols., 2001). Estas experiencias interpersonales dan lugar a cambios afectivos que pueden desencadenar diversas patologías en función de la predisposición genética, la experiencia y el ambiente cultural del individuo (Molina-Jiménez y cols., 2008). De esta perspectiva, en el caso de los seres humanos, en tanto que especie social, el entorno y las relaciones interpersonales pueden llegar a establecerse como una fuente inagotable de estrés. Precisamente, este tipo de estrés social o psicosocial aumenta el riesgo de padecer un importante número de trastornos mentales y físicos, siendo, de especial relevancia el estudio en profundidad de sus consecuencias. De hecho, en la actualidad, debido a la naturaleza de nuestro estilo de vida, los estresores sociales son considerados como las experiencias estresantes más potentes en los seres humanos, contribuyendo al desarrollo y expresión de trastornos muy variados, tanto mentales como físicos. Así, más allá de su intensidad, duración o frecuencia, hay que tener en cuenta la naturaleza de una experiencia estresante a la hora de evaluar sus consecuencias, considerándose que los individuos son más susceptibles a padecer sus efectos más negativos cuando además de crónica e impredecible, es de naturaleza social

(Björkqvist, 2001; Blanchard y cols., 2002; De Kloet y cols., 1998; Koolhaas y cols., 1997).

En esta línea, los modelos animales basados en el estrés social, como el paradigma de Estrés Crónico de Derrota Social, *Chronic Social Defeat Stress* (CSDS) en terminología inglesa, un tipo de estrés psicosocial en roedores, están siendo adoptados cada vez más para determinar los mecanismos neurobiológicos del estrés y las patologías asociadas al mismo. El CSDS se basa en la aparición de un conflicto social entre dos machos, en el que uno de ellos -el residente, agresor o vencedor- defiende su territorio frente a otro macho desconocido de su misma especie -el intruso, derrotado o perdedor. Es destacable el hecho de que la manera en que el sujeto perciba y afronte cada estresor social particular determinará el grado de estrés que experimente y sus consecuencias sobre los diferentes sistemas del organismo, haciéndole más o menos sensible al desarrollo de determinadas patologías (Rivest, 2002; Sandín, 2003). Así, desde el modelo de diátesis-estrés plantea que la vulnerabilidad o predisposición psicobiológica (diátesis) interactúa con el ambiente social (estrés) para desencadenar trastornos psicológicos. Por tanto, ante las mismas situaciones negativas, tendrían menor o mayor probabilidad de deprimirse aquellas personas conocidas como "resilientes" o "susceptibles" de forma respectiva en función de su menor o mayor cantidad e intensidad de factores de vulnerabilidad (Anisman y Matheson, 2005; Vázquez y cols., 2010).

Varias investigaciones han informado de diversos efectos del estrés social sobre la memoria, lo que avala la asunción general de

que emociones y cognición se hallan íntimamente vinculadas (Belmonte, 2007). De hecho, existen centros corticales y subcorticales que se comunican a través de determinadas sustancias que, en última instancia, van a determinar una valoración subjetiva consciente e inconsciente de la experiencia, lo cual finalmente repercutirá en la forma en que esta última quedará registrada en nuestro cerebro. Asimismo, se ha visto que muchos de los efectos del estrés social sobre la memoria pueden verse modulados mediante la administración de fármacos.

## 9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El interés de la presente Tesis Doctoral ha sido analizar el impacto que tiene el CSDS sobre la cognición en ratones, con especial énfasis en sus efectos sobre la memoria, fundamentalmente emocional, pero también espacial y de reconocimiento. Además, se ha evaluado si los efectos del CSDS pueden revertirse mediante modulación farmacológica.

- ✓ **Objetivo general 1:** estudiar los efectos producidos por la experiencia crónica de derrota social sobre la memoria en ratones.
  - **Objetivo específico 1.1:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria emocional de los ratones estresados.
    - **Hipótesis 1.1:** se espera encontrar una potenciación de la memoria emocional en nuestros ratones sometidos a un grado intermedio de CSDS, una ausencia de efectos en los ratones

sometidos a un grado bajo de CSDS y un deterioro en los ratones sometidos a un grado muy alto de CSDS.

- **Objetivo específico 1.2:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria espacial de los ratones estresados.
  - **Hipótesis 1.2:** se espera encontrar un deterioro de la memoria espacial en nuestros ratones sometidos a CSDS.
- **Objetivo específico 1.3:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria de reconocimiento de los ratones estresados.
  - **Hipótesis 1.3:** aunque es difícil plantear una hipótesis respecto a la memoria de reconocimiento, se espera encontrar un deterioro de la memoria de reconocimiento en nuestros ratones sometidos a CSDS.
- **Objetivo específico 1.4:** estudiar los efectos del CSDS sobre posibles variables contaminantes en la interpretación de los resultados obtenidos en la memoria de los ratones estresados.
  - **Hipótesis 1.4.1:** se espera encontrar un aumento de la respuesta de ansiedad en nuestros ratones sometidos a CSDS.
  - **Hipótesis 1.4.2:** Teniendo en cuenta que algunos de los estudios que utilizan el laberinto elevado en cruz, no encuentran efectos del estrés social sobre la actividad exploratoria espontánea, se espera no encontrar efectos en esta medida en nuestros ratones sometidos a CSDS.
  - **Hipótesis 1.4.3:** se espera no encontrar efectos en la respuesta de analgesia en nuestros ratones sometidos a CSDS.

- **Objetivo específico 1.5:** estudiar los efectos del CSDS sobre la memoria en función del fenotipo resiliente *vs* susceptible de los ratones estresados.
  - **Hipótesis 1.5:** se espera encontrar efectos diferenciales del CSDS sobre la memoria de los sujetos derrotados en función del fenotipo de vulnerabilidad al estrés, mostrando afectación de sus capacidades cognitivas aquellos animales caracterizados por su susceptibilidad y no manifestando déficits aquellos caracterizados por su resiliencia al estrés social.
- ✓ **Objetivo general 2:** estudiar la modulación farmacológica de las alteraciones cognitivas observadas en los ratones sometidos a una experiencia crónica de derrota social.
  - **Objetivo específico 2.1:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico clomipramina sobre las alteraciones de memoria en los ratones estresados.
    - **Hipótesis 2.1:** se espera encontrar que el tratamiento crónico con el antidepresivo clomipramina revierta las alteraciones cognitivas producidas por el CSDS.
  - **Objetivo específico 2.2:** estudiar los efectos del tratamiento crónico con el antiinflamatorio indometacina sobre las alteraciones cognitivas en los ratones estresados.
    - **Hipótesis 2.2:** se espera encontrar que el tratamiento crónico con el antiinflamatorio indometacina revierta las alteraciones cognitivas producidas por el CSDS.



### **9.3. METODOLOGÍA**

#### **9.3.1. Sujetos experimentales**

Los estudios experimentales se han realizado utilizando ratones machos de la cepa CD1. En el caso de los animales intrusos utilizados como derrotados, los ratones postpuberales tenían 42 días de edad, mientras que los ratones adultos tenían 70 días de edad (al inicio del correspondiente experimento). Los animales residentes utilizados como agresores tenían 3 meses o más de edad. Para ser seleccionados como agresores, cada animal fue sometido a un exhaustivo proceso de cribado de 3 días consecutivos de duración a lo largo de cual, cada 24 h, se evaluó su nivel de agresividad durante 3 minutos. Únicamente los animales que atacaron en 2 sesiones consecutivas de las 3 y cuya latencia de ataque fue inferior a 60 segundos fueron seleccionados como agresores.

#### **9.3.2. Paradigmas conductuales**

El protocolo de CSDS consistió en someter a cada ratón intruso a encuentros agonísticos al ser introducido en la jaula de uno de los animales residentes. Dichos encuentros agonísticos variaron en duración y frecuencia a lo largo de los experimentos, aunque el régimen de CSDS más ampliamente utilizado en la presente Tesis Doctoral fue el consistente en encuentros diarios de 10 minutos de duración durante 20 días consecutivos.

La prueba de interacción social es uno de los paradigmas empleados para evaluar la conducta social espontánea en roedores tras haber sido sometidos a CSDS con el fin de distinguir entre

aquellos animales resilientes y susceptibles al estrés social. Además, el hecho de no requerir un entrenamiento previo del animal la convierte en una prueba realmente interesante.

El paradigma de evitación inhibitoria se usa tradicionalmente como una manera rápida y fácil de explorar la memoria emocional en roedores mediante la inducción de un conflicto entre la preferencia por las zonas oscuras y la aversión por zonas iluminadas. Así, el animal debe evitar un estímulo negativo en forma de descarga eléctrica inhibiendo su conducta innata de permanecer en un espacio negro a oscuras frente a otro blanco iluminado.

La prueba del laberinto acuático de Morris es uno de los modelos más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores. En este laberinto los animales tienen que nadar por una piscina circular llena de agua para localizar una plataforma oculta y evitar el estímulo negativo que representa el agua para los roedores. Los animales finalmente aprenden la ubicación exacta de la plataforma en base a las claves visuales extra-laberinto.

La prueba de reconocimiento de objetos, basada en el paradigma etológico de preferencia por la novedad, ha sido ampliamente utilizada como modelo para evaluar memoria episódica de reconocimiento en roedores. Así, este modelo supone que la preferencia se debe a la novedad de los objetos, de tal forma que el animal pasa más tiempo explorando un objeto novedoso en relación al objeto familiar.

El laberinto en cruz elevado es uno de los modelos de ansiedad en roedores disponibles en la actualidad, aunque también permite

evaluar actividad locomotora. Se basa en el miedo que generan los brazos abiertos y en la seguridad que producen los brazos cerrados. Se asume que, en los brazos abiertos del laberinto, el miedo viene motivado por la exposición a un ambiente no familiar, a un espacio abierto intensamente brillante y a una situación de equilibrio en una superficie relativamente angosta y situada a una considerable altura.

El *hot plate* se utiliza comúnmente para evaluar la sensibilidad al dolor térmico, empleándose como una prueba sencilla y fácil de analgesia. Así, se mide el tiempo que el animal tarda en percibir el estímulo térmico, en este caso, la temperatura elevada en sus patas

#### **9.4. ESTUDIOS REALIZADOS**

Los estudios 1 y 2 evaluaron los efectos de un grado intermedio de CSDS sobre la memoria emocional en ratones postpuberales y en ratones adultos respectivamente. El estudio 3 analizó los efectos de un grado intermedio y alto de CSDS sobre la memoria emocional en ratones postpuberales. Los estudios 4 y 5 compararon los efectos de dos grados, bajo y alto, de CSDS sobre la memoria emocional y sobre la memoria espacial respectivamente en ratones postpuberales. En el estudio 6, el principal objetivo fue determinar si los efectos deteriorantes producidos por el grado alto de CSDS sobre la memoria emocional podían verse revertidos por la administración crónica de clomipramina. Por último, el estudio 7 midió los efectos del grado alto de estrés sobre la memoria emocional y de reconocimiento en función de la susceptibilidad-resiliencia al CSDS. Asimismo, se evaluó

si los efectos deteriorantes producidos por el CSDS sobre la memoria podían verse revertidos por la administración crónica de indometacina. A continuación, se presentan con más detalle cada uno de los experimentos.

### ✓ **Experimento 1**

Se evaluaron los efectos del CSDS sobre la memoria emocional en *ratones machos CD1 postpuberales* mediante la prueba de evitación inhibitoria. El protocolo de CSDS consistió en someter a los ratones a encuentros agonísticos diarios de 5 minutos durante 21 días consecutivos. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora y emocionalidad a través del laberinto en cruz elevado.

### ✓ **Experimento 2**

Se evaluaron los efectos del CSDS sobre la memoria emocional en *ratones machos CD1 adultos* mediante la prueba de evitación inhibitoria. El protocolo de CSDS consistió en someter a los ratones a encuentros agonísticos diarios de 5 minutos durante 21 días consecutivos. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora y emocionalidad a través del laberinto en cruz elevado.

### ✓ **Experimento 3**

Se evaluaron los efectos del CSDS sobre la memoria emocional en ratones machos CD1 postpuberales mediante la prueba de

evitación inhibitoria. El protocolo de CSDS consistió en someter a los ratones a *encuentros agonísticos diarios de 10 minutos* durante 21 días consecutivos. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora y emocionalidad a través del laberinto en cruz elevado.

#### ✓ **Experimento 4**

Se evaluaron los efectos de *varios grados de CSDS* sobre la *memoria emocional* en ratones machos CD1 postpuberales mediante la prueba de evitación inhibitoria. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos experimentales: No estresados, Estrés 5, Estrés 10 y Estrés 20 (5, 10 y 20 sesiones de CSDS, respectivamente). Los animales de los grupos Estrés fueron sometidos al número correspondiente de encuentros agonísticos de 10 minutos de duración cada uno durante un período de 20 días. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora y emocionalidad a través del laberinto en cruz elevado.

#### ✓ **Experimento 5**

Se evaluaron los efectos de *varios grados de CSDS* sobre la *memoria espacial* en ratones machos CD1 postpuberales mediante el laberinto acuático de Morris. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos experimentales: No estresados, Estrés 5, Estrés 10 y Estrés 20 (5, 10 y 20 sesiones de CSDS, respectivamente). Los animales de los grupos Estrés fueron

sometidos al número correspondiente de encuentros agonísticos de 10 minutos de duración cada uno durante un período de 20 días. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora y emocionalidad a través del laberinto en cruz elevado.

### ✓ **Experimento 6**

Se evaluaron los efectos del CSDS sobre la memoria emocional en ratones machos CD1 postpuberales mediante la prueba de evitación inhibitoria. El protocolo de CSDS consistió en someter a los ratones a encuentros agonísticos diarios de 10 minutos durante 20 días consecutivos. Todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal diaria durante los 20 días de suero fisiológico salino o de *clomipramina* (10 mg/kg) según su condición experimental. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la prueba de evitación inhibitoria. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora, emocionalidad y de percepción de dolor a través del laberinto en cruz elevado y de la prueba de analgesia *hot plate*.

### ✓ **Experimento 7**

Se evaluaron los efectos del CSDS sobre la memoria emocional y de reconocimiento en ratones machos CD1 postpuberales mediante las pruebas de evitación inhibitoria y de reconocimiento de objetos respectivamente. El protocolo de CSDS consistió en someter a los ratones a encuentros agonísticos diarios de 10 minutos durante 20 días consecutivos. Todos los animales recibieron una inyección

intraperitoneal diaria durante los 20 días de suero fisiológico salino o de *indometacina* (10 mg/kg) según su condición experimental. 24 h después de la última sesión de CSDS, todos los animales pasaron por la *prueba de interacción social* con el fin de poder distinguir los animales resilientes de los susceptibles. Posteriormente, todos los animales pasaron por las pruebas de evitación inhibitoria y de *reconocimientos de objetos*. Asimismo, se tomaron medidas complementarias de actividad locomotora, emocionalidad y de percepción de dolor a través del laberinto en cruz elevado y de la prueba de analgesia *hot plate*.

## **9.5. PRINCIPALES HALLAZGOS**

### **✓ Experimento 1**

El protocolo de CSDS aplicado no deterioró la memoria emocional en ratones postpuberales, mostrando éstos incluso una mejor ejecución en la prueba de evitación inhibitoria que los ratones no estresados. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la emocionalidad ni sobre la actividad locomotora.

### **✓ Experimento 2**

El protocolo de CSDS aplicado no tuvo efectos sobre la memoria emocional de los ratones adultos, mostrando éstos aprendizaje en la prueba de evitación inhibitoria, al igual que los animales no estresados. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la emocionalidad ni sobre la actividad locomotora.

### ✓ **Experimento 3**

El protocolo de CSDS aplicado tuvo efectos sobre la memoria emocional de los ratones postpuberales, no mostrando éstos aprendizaje en la prueba de evitación inhibitoria, a diferencia de los animales no estresados. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la actividad locomotora pero sí que tuvo un efecto ansiogénico como reveló la ejecución de los animales en el laberinto en cruz elevado.

### ✓ **Experimento 4**

De los tres grados de CSDS implementados, únicamente el grado más alto tuvo efectos sobre la memoria emocional de los ratones estresados, no mostrando éstos aprendizaje en la prueba de evitación inhibitoria, a diferencia de los animales no estresados. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la actividad locomotora pero sí que tuvo un efecto ansiogénico como reveló la ejecución de los animales en el laberinto en cruz elevado.

De los resultados obtenidos en los estudios 1-4 se derivan dos hallazgos fundamentales. Por un lado, se observa la modulación ejercida por la variable edad de tal forma que los ratones que fueron estresados en su etapa adulta (a partir de los 70 días de edad) no vieron afectada su memoria emocional, mientras que los ratones que fueron estresados en la etapa postpubertal o adolescencia tardía (a partir de los 42 días de edad), sí que experimentaron las consecuencias del CSDS en su memoria emocional. Por otro lado, se observa la influencia de la variable intensidad de la experiencia estresante en el caso de los ratones postpuberales, existiendo una



relación en forma de U invertida entre el grado de CSDS aplicado y la memoria emocional en el caso de los ratones post-puberales, de tal forma que un nivel bajo de CSDS no tiene efectos, un nivel intermedio mejora y un nivel alto deteriora la memoria emocional de los animales sometidos CSDS.

#### ✓ **Experimento 5**

No hubo efectos de ninguno de los 3 grados de CSDS implementados sobre la memoria emocional de los ratones estresados, mostrando éstos una curva de adquisición y una retención adecuadas, al igual que los animales no estresados. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la actividad locomotora pero sí que tuvo un efecto ansiogénico como reveló la ejecución de los animales en el laberinto en cruz elevado.

#### ✓ **Experimento 6**

El protocolo de CSDS aplicado tuvo un efecto deteriorante sobre la memoria emocional de los ratones estresados, no mostrando éstos aprendizaje en la prueba de evitación inhibitoria, a diferencia de los animales no estresados. Además, el fármaco clomipramina revirtió estos efectos negativos del CSDS sobre la memoria emocional. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la actividad locomotora ni sobre la percepción de dolor, pero sí que tuvo un efecto ansiogénico, el cual no pudo ser revertido por la administración crónica de clomipramina.

## ✓ Experimento 7

La prueba de interacción social reveló dos subgrupos diferenciados entre los ratones estresados, resilientes y susceptibles al CSDS. El protocolo de CSDS aplicado tuvo un efecto deteriorante sobre la memoria emocional y de reconocimiento de los ratones susceptibles, a diferencia de los animales no estresados y resilientes. Además, el fármaco indometacina revirtió estos efectos negativos del CSDS sobre la memoria emocional pero no sobre la de reconocimiento. Por otro lado, no hubo efectos del CSDS sobre la actividad locomotora ni sobre la percepción de dolor, pero sí que tuvo un efecto ansiogénico, el cual no pudo ser revertido por la administración crónica de indometacina.

Los principales resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas internacionales de impacto, contribuyendo a la literatura científica existente sobre el modelo de CSDS y sus efectos sobre la memoria, así como su posible modulación farmacológica. En general, estos resultados reflejan la validez del modelo de CSDS en ratones como un paradigma capaz de generar alteraciones conductuales incapacitantes para el sujeto víctima de este tipo de estrés social. Además, se han evaluado las consecuencias de este tipo de experiencia estresante en función de la susceptibilidad-resiliencia de los sujetos, difiriendo ambos fenotipos en medidas de aprendizaje y memoria. Asimismo, se ve plasmada la utilidad de tratamientos farmacológicos específicos, como antidepresivos o antiinflamatorios, para poder hacer frente a los

efectos nocivos del CSDS y, más concretamente, a las alteraciones producidas sobre la memoria emocional.

## **9.6. CONCLUSIONES**

De los estudios y resultados contenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden derivar las conclusiones presentadas a continuación.

1. Un grado intermedio de CSDS mejora la memoria emocional de evitación inhibitoria en ratones postpuberales pero no en adultos.
2. Un grado bajo de CSDS no afecta a la memoria emocional de evitación inhibitoria ni a la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en ratones postpuberales.
3. Un grado alto de CSDS impide la formación de la memoria emocional de evitación inhibitoria y de la memoria de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de objetos, pero no afecta a la memoria espacial en ratones postpuberales.
4. Un grado bajo de estrés no afecta de forma significativa sobre la respuesta de ansiedad en ratones postpuberales.
5. Un grado intermedio de estrés no afecta de forma significativa sobre la respuesta de ansiedad en ratones postpuberales.
6. Un grado alto de CSDS incrementa la respuesta de ansiedad en el laberinto en cruz elevado en ratones postpuberales.

7. Ninguno de los grados de CSDS afecta de forma significativa sobre la actividad locomotora espontánea en ratones postpuberales.
8. Un grado alto de CSDS no afecta de forma significativa a la percepción del dolor en ratones postpuberales.
9. Los efectos negativos del CSDS no parecen ser secundarios a los efectos del estrés sobre la emocionalidad, la actividad locomotora o la sensibilidad al dolor.
10. La prueba de interacción social es una herramienta válida para diferenciar dos fenotipos, uno susceptible y otro resiliente, al alto grado de CSDS.
11. El uso de la cepa CD1 como animales estresados es adecuado para el protocolo de CSDS.
12. El tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico clomipramina revierte los efectos deteriorantes del CSDS sobre la memoria emocional de evitación inhibitoria pero no sus efectos ansiógenos en el laberinto en cruz elevado.
13. El tratamiento crónico con indometacina revierte los efectos deteriorantes del CSDS sobre la memoria emocional de evitación inhibitoria. Sin embargo, no tiene efectos sobre la memoria de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de objetos ni sobre la respuesta de ansiedad en el laberinto en cruz elevado.

En general, se puede decir que la exposición al CSDS puede tener diferentes efectos conductuales. Diversos factores como la edad en la que se inicia la experiencia estresante, la frecuencia y la duración de exposición o la administración de fármacos pueden

modificar dichos efectos del CSDS. Así, iniciado en la etapa postpubertal, el CSDS tiene unos efectos cognitivos en la etapa adulta que no se dan cuando éste se empieza a administrar una vez que el sujeto se encuentra en la etapa adulta. Por otro lado, cuando el CSDS se empieza a suministrar en la etapa postpubertal, la duración y la frecuencia de la experiencia estresante da lugar a efectos diferenciados sobre la memoria emocional, deteriorándola o potenciándola. Por último, la administración de fármacos, antidepresivos y antiinflamatorios, pueden modular algunos de los efectos conductuales producidos por el CSDS, pero no otros.



# **CAPÍTULO X.**

## **REFERENCIAS**

---





- Adamcio B, Havemann-Reinecke U, Ehrenreich H (2009). Chronic psychosocial stress in the absence of social support induces pathological pre-pulse inhibition in mice. *Behavioural Brain Research*, 204: 246-249.
- Aggleton J, Brown M (1999). Episodic memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioural Brain Science*, 22: 425-444.
- Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, Wright P, de Hoz L, Wood ER (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research*, 167: 183-195.
- Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas RG, Thal LJ; Alzheimer's Disease Cooperative Study (2003). Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 289: 2819-2826.
- Akhondzadeh S, Jafari S, Raisi F, Nasehi AA, Ghoreishi A, Salehi B, Mohebbi-Rasa S, Raznahan M, Kamalipour A (2009). Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depression and Anxiety*, 26: 607-611.
- Alkadhi K (2013). Brain physiology and pathophysiology in mental stress. *ISRN physiology*, 2013: 806104.
- Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71: 1-18.
- Anderson JR (2000). *Learning and memory: an integrated approach*. Wiley, New York.
- Anisman H, Matheson K (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 525-546.

- Arnsten AF (1998). Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends in Cognitive Sciences*, 2: 436-447.
- Avgustinovich D, Lipina T, Alekseyenko O, Kudryavtseva N (1999). Changes in brain serotonergic activity in anxious losers. *Biogenic Amines*, 15: 395-404.
- Avitsur R, Padgett DA, Sheridan JF (2006). Social interactions, stress, and immunity. *Neurologic Clinics*, 24: 483-491.
- Baddeley G (1994). Las memorias humanas. *Mundo Científico*, 150: 802-807.
- Bammer G (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 6: 247-296.
- Barden N (2004). Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 29: 185-193.
- Barnes PJ, Adcock IM (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 373: 1905-1917.
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S (2005). Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 67-81.
- Beeler JA, Daw N, Frazier CR, Zhuang X (2010). Tonic dopamine modulates exploitation of reward learning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4: 170.
- Beitia G (2007). *Estrés social y estrés medio crónico: cambios conductuales, neuroendocrinos e inmunitarios. Efectos del tratamiento con fluoxetina*. Tesis doctoral, Universidad País Vasco.
- Belmonte C (2007). Emociones y cerebro. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101: 59-68.
- Berkers RM, Klumpers F, Fernández G (2016). Medial prefrontal-hippocampal connectivity during emotional memory encoding predicts individual differences in the loss of associative memory

- specificity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 134 Pt A: 44-54.
- Berton O, Aguerre S, Sarrieau A, Mormede P, Chaouloff F (1998). Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 82: 147-159.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 311: 864-868.
- Bhatnagar S, Vining C, Iyer V, Kinni V (2006). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 13-24.
- Biondi M, Zannino LG (1997). Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 66: 3-26.
- Björkqvist K (2001). Social defeat as a stressor in humans. *Physiology & Behavior*, 73: 435-442.
- Björkqvist K, Ekman K, Lagerspetz KMJ (1982). Bullies and victims: their ego picture, ideal ego and normative ego picture. *Scandinavian Journal of Psychology*, 23: 307-313.
- Blanchard DC, Cholvanich P, Blanchard RJ, Clow DW, Hammer RP, Rowlett JK, Bardo MT (1991). Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Research*, 568: 61-66.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC (2001). Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, 73: 261-271.
- Blanchard DC, Mckittrick CR, Hardy MP, Blanchard RJ (2002). Effects of social stress on hormones, brain and behavior. En: Pfaff DW,

- Aranold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT. (Eds.): *Hormones, brain and behavior*. Academic Press, San Diego.
- Bohus B, Koolhaas JM, Korte SM (1990). Psychosocial stress, anxiety and depression: Physiological and neuroendocrine correlated in animal models. En: Genazzani AR, Nappi G, Petraglia F, Martignoni E (Eds.): *Stress and Related Disorders From Adaptation to Dysfunction*. The Parthenon Publishing Group Pearl City, New York.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14515-14520.
- Bures J, Buresová C, Huston JP (1983). *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. Elsevier, Amsterdam.
- Burghardt NS, Bauer EP (2013). Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: implications for underlying fear circuits. *Neuroscience*, 247: 253-272.
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G (1995). Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychological Bulletin*, 117: 285-305.
- Buwalda B, Kole M, Veenema A, Huininga M, de Boer S, Korte S, Koolhaas J (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 83-97.
- Calegari L, Gorenstein C, Gentil V, Planeta CS, Nunes-de-Souza RL (2007). Effect of chronic treatment with clomipramine on food intake, macronutrient selection and body weight gain in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30: 1541-1546.
- Camacho A, Dimsdale JE (2000). Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosomatic Medicine*, 62: 326-336.

- Campeau S, Liberzon I, Morilak D, Ressler K (2011). Stress modulation of cognitive and affective processes. *Stress*, 14: 503-519.
- Cannon WB (1929). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. Appleton, New York.
- Cannon WB (1932). *The Wisdom of the Body*. Norton, New York.
- Cannon WB (1934). A consideration of possible toxic and nervous factors in the production of traumatic shock. *Annals of Surgery*, 100: 704-713.
- Carlson NR (2014). Emoción. En: Carlson NR. (Ed.): *Fisiología de la conducta*. Pearson Educación SA, Madrid.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301: 386-389.
- Cassaday H, Rawlins J (1997). The hippocampus, objects, and their contexts. *Behavioural Neuroscience*, 111: 1228-1244.
- Chattarji S, Tomar A, Suvrathan A, Ghosh S, Rahman MM (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nature Neuroscience*, 18: 1364-1375.
- Cockerham WC (2001). *Handbook of medical sociology*. Prentice-Hall, New York.
- Cohen S, Herbert TB (1996). Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annual Review of Psychology*, 47: 113-142.
- Corcoran KA, Quirk GJ (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *Journal of Neuroscience*, 27: 840-844.
- Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ (2009). Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Neuroscience*, 29: 11451-11460.

- Croft AP, Brooks SP, Cole J, Little HJ (2005). Social defeat increases alcohol preference of C57BL/10 strain mice; effect prevented by a CCKB antagonist. *Psychopharmacology*, 183: 163-170.
- Cudkowicz ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, Drachman DB (2006). Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 60: 22-31.
- Curtis CE, D'Esposito M (2003). Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 7: 415-423.
- Eichenbaum H, Schoenbaum G, Young B, Bunsey M (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13500-13507.
- D'Amato FR, Pavone F (1992). Role of anxiety in subordinate male mice sexual behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43: 181-185.
- Dadomo H, Sanghez V, Di Cristo L, Lori A, Ceresini G, Malinge I, Bartolomucci A (2011). Vulnerability to chronic subordination stress-induced depression-like disorders in adult 129SvEv male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35: 1461-1471.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Jöels M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19: 269-301.
- Del Abril A, Ambrosio E, De Blas MR, Caminero AA, García C, Higuera A, De Pablo JM (2016). *Fundamentos de Psicobiología*. Sanz y Torres, Madrid.
- Dere E, Kart-Teke E, Huston J, De Souza Silva M (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioural Reviews*, 30: 1206-1224.
- Deutch A, Roth R (1990). The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. *Progress in Brain Research*, 85: 367-402.

- Devoino L, Alperina E, Podgornaya E, Polyakov O, Idova G, Li'uchenok R (2003). Nature of the distribution of serotonin and serotonin metabolite in brain structures and development of immunosuppression in submissive mice. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33: 473-477.
- Dezazzo J, Tully T (1995). Dissection of memory formation: from behavioural pharmacology to molecular genetics. *Trends in Neuroscience*, 18: 212-218.
- Dimitroglou E, Zafiropoulou M, Messini-Nikolaki N, Doudounakis S, Tsilimigaki S, Piperakis SM (2003). DNA damage in a human population affected by chronic psychogenic stress. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206: 39-44.
- Ding L, Zhang X, Guo H, Yuan J, Li S, Hu W, Golden T, Wu N (2015). The Functional Study of a Chinese Herbal Compounded Antidepressant Medicine-Jie Yu Chu Fan Capsule on Chronic Unpredictable Mild Stress Mouse Model. *PLoS One*, 10: e0133405.
- Domjam M (2007). *Principios de aprendizaje y conducta*. Paraninfo, Madrid.
- Drea CM, Wallen K (1999). Low-status monkeys "play dumb" when learning in mixed social groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 12965-12969.
- Duka T, Curran HV, Rusted JM, Weingartner HJ (1996). Perspectives on cognitive psychopharmacology research. *Behavioural Pharmacology*, 7: 401-410.
- Eichenbaum H (1997). Declarative memory: Insights from cognitive neurobiology. *Annual Review of Psychology*, 48: 547-572.
- Ennaceur A (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215: 244-254.
- Eriksson TM, Delagrance P, Spedding M, Popoli M, Mathé AA, Ögren SO, Svenningsson P (2012). Emotional memory impairments in a genetic rat model of depression: involvement of 5-HT/MEK/Arc signaling in restoration. *Molecular Psychiatry*, 17: 173-184.

- Escobar A, Gómez González B. (2006) Estrés y memoria. *Revista Mexicana de Neurociencia*; 7: 8-14.
- Etchepareborda MC, Abad-Mas L (2005). Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Revista de Neurología*, 40: 579-583.
- Ferrer A (2008). *Estudio de la mediación del sistema histaminérgico en el efecto producido por la amitriptilina sobre la evitación inhibitoria en ratones*. Tesis Doctoral, Universitat de València.
- Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *Journal of Neuroscience*, 19: 5119-5123.
- Fernández I, Martín E (2005). *Escuela sin violencia*. Alfaomega, Méjico.
- Finnell JE, Wood SK. (2016). Neuroinflammation at the interface of depression and cardiovascular disease: Evidence from rodent models of social stress. *Neurobiology of Stress*, 4: 1-14.
- Flugge G (1996). Alterations in the central nervous alpha2-adrenoceptor system under chronic psicosocial stress. *Neuroscience*, 75: 187-196.
- Foster MT, Solomon MB, Huhman KL, Bartness TJ (2006). Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290: R1284-R1293.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304: 881-883.
- Frimerman A, Miller HI, Laniado S, Keren G (1997). Changes in hemostatic function at times of cyclic variation in occupational stress. *American Journal of Cardiology*, 79: 72-75.
- Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports*, 65: 1655-1662.



- García-Pardo MP, Roger-Sánchez C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA (2016). Cognitive and behavioural effects induced by social stress plus MDMA administration in mice. *Behavioural Brain Research*, 319: 63-72.
- García-Sevilla JA, Escribá PV, Ozaita A, La Harpe R, Walzer C, Eytan A, Guimón J (1999). Up-regulation of immunolabeled alpha2A-adrenoceptors, Gi coupling proteins, and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides. *Journal of Neurochemistry*, 72: 282-291.
- Gold PE (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, 46: 87-98.
- Gold PW (2015). The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Molecular Psychiatry*, 20: 32-47.
- Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols*, 6: 1183-11291.
- Gómez-Chacón B (2014). *Mecanismos cerebrales de la memoria de reconocimiento en ratas: papel de la corteza perirrinal*. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Gómez-Lázaro E (2011). *Diferencias individuales en ratones derrotados crónicamente: cambios conductuales, neuroendocrinos, inmunitarios y neurotróficos como marcadores de vulnerabilidad a los efectos del estrés*. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco.
- Grafman J, Holyoak K, Boller F (1995). *Structure and functions of the human prefrontal cortex*. New York Academy Sciences, New York.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM (2000). El comportamiento sumiso: una estrategia conductual defensiva en los animales y en el humano. *Psicología y Salud*, 10: 201-213.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez S, García-Barradas O, Rodríguez-Landa JF, Bernal-

- Morales B (2006). A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 67: 30-35.
- Haenisch B, Bönisch H (2011). Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacology & Therapeutics*, 129: 352-368.
- Hammels C, Pishva E, De Vry J, van den Hove DL, Prickaerts J, van Winkel R, Selten JP, Lesch KP, Daskalakis NP, Steinbusch HW, van Os J, Kenis G, Rutten BP (2015). Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 59: 111-140.
- Hashimoto K (2015). Inflammatory biomarkers as differential predictors of antidepressant response. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 7796-7801.
- Hatfield T, McGaugh JL (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71: 232-239.
- Hawker DSJ, Boulton MJ (2000). Twenty years' research on peer victimization and psychological maladjustment: a meta-analytical review of cross-sectional studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 41: 441-455.
- Henry JP, Liu YY, Nadra WE, Qian CG, Mormede P, Lemaire V, Ely D, Hendley ED (1993). Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension*, 21: 714-723.
- Hermans EJ, Battaglia FP, Atsak P, de Voogd LD, Fernández G, Roozendaal B (2014). How the amygdala affects emotional memory by altering brain network properties. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112: 2-16.
- Holahan MR, White NM (2002). Conditioned memory modulation, freezing, and avoidance as measures of amygdala-mediated conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77: 250-275.

- Hollis F, Wang H, Dietz D, Gunjan A, Kabbaj M (2010). The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague–Dawley rats. *Psychopharmacology*, 211: 69-77.
- Holloway CM, McIntyre CK (2011). Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95: 425-432.
- Hoozemans JJ, O'Banion MK (2005). The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders*, 4: 307-315.
- Huang GB, Zhao T, Muna SS, Bagalkot TR, Jin HM, Chae HJ, Chung YC (2013). Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16: 1635-1647.
- Huber MHR, Bronson FH (1980). Social modulation of spontaneous ejaculation in the mouse. *Behavioral and Neural Biology*, 29: 390-393.
- Hucklebridge FH, Gamal-El-Din L, Brain PF (1981). Social status and the adrenal medulla in the house mouse (*Mus musculus*, L.). *Behavioral and Neural Biology*, 33: 345-363.
- Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E (2006). Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Frontiers in Bioscience*, 11: 2179-2192.
- Imperato A, Cabib S, Puglisi-Allegra S (1993). Repeated stressful experiences differently affect the time-dependent responses of the mesolimbic dopamine system to the stressor. *Brain Research*, 601: 333-336.
- Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL (2014). Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*, 17: 247-255.

- Iordanova MD, Burnett DJ, Aggleton JP, Good M, Honey RC (2009). The role of the hippocampus in mnemonic integration and retrieval: complementary evidence from lesion and inactivation studies. *European Journal of Neuroscience*, 30: 2177-2189.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neuroscience*, 29: 496-505.
- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96: 695-750.
- Izquierdo I, Medina JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68: 285-316.
- Jacotte-Simancas A (2013). *La citicolina y el ejercicio físico revierten el déficit en la memoria de reconocimiento de objetos en ratas con daño cerebral traumático*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Jianhua F, Wei W, Xiaomei L, Shao-Hui W (2017). Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. *Behavioural Brain Research*, 316: 136-144.
- Jin HM, Shrestha Muna S, Bagalkot TR, Cui Y, Yadav BK, Chung YC (2015). The effects of social defeat on behavior and dopaminergic markers in mice. *Neuroscience*, 288: 167-177.
- Joëls M, Baram TZ (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 459-466.
- Joëls M, Fernandez G, Roozendaal B (2011). Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*, 15: 280-288.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16: 115-130.

- Joseph-Bravo P, De Gortari P (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*, 14: 65-76.
- Kalat JW (2014). *Biological Psychology*. CENGAGE learning, Boston (USA).
- Kandel ER, Hawkins RD (1992). Bases biológicas del aprendizaje y de la individualidad. *Investigación y Ciencia*, 194: 49-57.
- Kandel ER, Jessell TM, Schwartz JH (1997). *Neurociencia y conducta*. Prentice Hall, Madrid.
- Kaur I, Simons ER, Castro VA, Mark Ott C, Pierson DL (2004). Changes in neutrophil functions in astronauts. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18: 443-450.
- Keeney A, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S, Blackburn-Munro RE (2006). Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 330-338.
- Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ, Postma A (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*, 35: 295-303.
- Kempainen H, Raivio N, Nurmi H, Kiianmaa K (2010). GABA and glutamate overflow in the VTA and ventral pallidum of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats after ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 45: 111-118.
- Kiaei M, Kipiani K, Petri S, Choi DK, Chen J, Calingasan NY, Beal MF (2005). Integrative role of cPLA with COX-2 and the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 93: 403-411.
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R (1999). Psychoneuroimmunology and cancer: fact or fiction? *European Journal of Cancer*, 35: 1603-1607.
- Kinn AM, Gronli J, Fiske E, Kuipers S, Ursin R, Murison R, Portas CM (2008). A double exposure to social defeat induces sub-chronic

- effects on sleep and open field behaviour in rats. *Physiology & Behavior*, 95: 553-561.
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R (2007). Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21: 458-466.
- Klein SB (1994). *Aprendizaje. Principios y aplicaciones*. McGraw-Hill, Madrid.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJH, Meerlo P, Sgoifo A (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161: 69-72.
- Koolhaas JM, Hermann PM, Kemperman C, Bohus B, Van de Hoofdakker RH, Beersma DGM (1990). Single social defeat in male rats induces a gradual but long lasting behavioural change: A model of depression? *Neuroscience Research Communications*, 7: 35-41.
- Koolhaas JM, Meerlo P, De Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. (1995) Social stress in rats: An animal model of depression? *Acta Neuropsychiatrica*, 7: 27-29.
- Kop WJ (1997). Acute and chronic psychological risk factors for coronary syndromes: moderating effects of coronary artery disease severity. *Journal of Psychosomatic Research*, 43: 167-181.
- Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131: 391-404.
- Kudryavtseva NN (2000). Agonistic Behavior: A Model, Experimental Studies, and Perspectives. *Neuroscience & Behavioral Physiology*, 30: 293-305.

- Kudryavtseva NN, Avgustinovich DF (1998). Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC). *Aggressive behavior*, 24: 271-286.
- Kudryavtseva NN, Bakshantovskaya IV, Koryakina LA (1991). Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38: 315-320.
- Lagerspetz KMJ, Björkqvist K, Berts M, King E (1982). Group aggression among school children in three schools. *Scandinavian Journal of Psychology*, 23: 45-52.
- Laroche S (1999). Los mecanismos de memoria. *Investigación y Ciencia*, 3: 42-49.
- LeDoux JE (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology*, 46: 209-235.
- Lemos-Giráldez S (2003). La psicopatología de la infancia y la adolescencia: consideraciones básicas para su estudio. *Papeles del Psicólogo*, 85: 19-28.
- Leonard BE (1997). The role of noradrenaline in depression: a review. *Journal of Psychopharmacology*, 11: S39-S47.
- Lieberman JA, Greenhouse J, Hamer RM, Krishnan KR, Nemeroff CB, Sheehan DV, Thase ME, Keller MB (2005). Comparing the effects of antidepressants: consensus guidelines for evaluating quantitative reviews of antidepressant efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 30: 445-460.
- Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lörscher P, Holsboer F (1999). Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *Journal of Psychiatric Research*, 33: 153-163.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, 1: 69-73.
- Luria AR (1977). *Las funciones corticales superiores del hombre*. Orbe, La Habana.

- Martin A, Chao LL (2001). Semantic memory and the brain: structure and processes. *Current Opinion in Neurobiology*, 11: 194-201.
- Martinez M, Calvo-Torrent A, Pico-Alfonso MA (1998). Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggressive behavior*, 24: 241-256.
- Martínez M, Irurtia MJ, Camino C, Torres H, Queipo D (2012). El acoso psicológico en el trabajo o mobbing: patología emergente. *Gaceta internacional de ciencias forenses*, 3: 5-12.
- Matousek SB, Hein AM, Shaftel SS, Olschowka JA, Kyrkanides S, O'Banion MK (2011). Cyclooxygenase-1 mediates prostaglandin E2 elevation and contextual memory impairment in a model of sustained hippocampal interleukin-1 $\beta$  expression. *Journal of Neurochemistry*, 114: 247-258.
- McEwen BS (2005). Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 30: 315-318.
- McEwen BS (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87: 873-904.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5: 205-216.
- McEwen BS, Wingfield JC (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43: 2-15.
- McGaugh JL (2000). Memory: A century of consolidation. *Science*, 287: 248-251.
- McGaugh JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, 27: 1-28.
- McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 93: 13508-13514.
- McGeer PL, McGeer EG (2007). NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiology of Aging*, 28: 639-647.



- McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *European Journal of Neuroscience*, 16: 1223-1226.
- Mechanic D (1976). Stress, illness and illness behavior. *Journal of Human Stress*, 2: 2-6.
- Meerlo P, Overkamp G, Daan S, van den Hoofdakker R, Koolhaas J (1996). Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats. *Stress*, 1: 21-32.
- Méndez-López, M (2015). *Bases neuronales del recuerdo y la extinción de la memoria especial*. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo.
- Mendlewicz J, Kriwin P, Oswald P, Souery D, Alboni S, Brunello N (2006). Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. *International Clinical Psychopharmacology*, 21: 227-231.
- Meneses A, Liy-Salmeron G (2012). Serotonin and emotion, learning and memory. *Reviews in the Neurosciences*, 23: 543-553.
- Miczek KA, de Wit H (2008). Challenges for translational psychopharmacology research-some basic principles. *Psychopharmacology*, 199: 291-301.
- Miczek KA, Thompson ML, Shuster L (1982). Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*, 215: 1520-1522.
- Milad MR, Quirk GJ (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annual Review of Psychology*, 63: 129-151.
- Molina-Jiménez T, Gutiérrez-García A, Hernández-Domínguez L, Contreras CM (2008). Estrés psicosocial: Algunos aspectos clínicos y experimentales. *Anales de Psicología*, 24: 353-360.
- Moreau JL (1997). Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*, 23: 280-289.
- Moret C, Briley M (2011). The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 7: 9-13.

- Morgado I (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40: 289-297.
- Morici JF, Bekinschtein P, Weisstaub NV (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research*, 292: 241-251.
- Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11: 47-60.
- Moscoso MS (1998). Estrés, salud y emociones: estudio de la ansiedad, cólera y hostilidad. *Revista de Psicología*, 3: 9-17.
- Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Müller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Möller HJ, Arolt V, Riedel M (2006). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Molecular Psychiatry*, 11: 680-684.
- Mumby D (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: Lessons from studies in rats. *Behavioural Brain Research*, 127: 159-181.
- Muñoz M (2007). De la neuropsicología a la neuroanatomía de la memoria declarativa. *EduPsykhé: Revista de psicología y psicopedagogía*, 6: 223-244.
- Muscat R, Willner P (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mildunpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16: 507-517.
- Na KS, Lee KJ, Lee JS, Cho YS, Jung HY (2014). Efficacy of adjunctive celecoxib treatment for patients with major depressive disorder: A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48: 79-85.
- Nadal R, Armario A (2010). Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertensión y riesgo vascular*, 27:117-124.
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Femenía MS, García-Gutiérrez MS, García-Payá ME, Leiva-Santana C, Manzanares J (2008). Métodos

- de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología*, 3: 137-145.
- Neisser U (1967). *Cognitive Psychology*. Meredith Publishing Company, New York.
- Novick AM, Mears M, Forster GL, Lei Y, Tejani-Butt SM, Watt MJ (2016). Adolescent social defeat alters N-methyl-D-aspartic acid receptor expression and impairs fear learning in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 304: 51-59.
- Nyberg L, Tulving E (1996). Classifying human long-term memory: evidence from converging dissociations. *European Journal of Cognitive Psychology*, 8: 163-183.
- Olweus D (1978). *Aggression in the schools: bullies and whipping boys*. Hemispheres Publishing Corporation, Washington.
- Ordway GA, Schenk J, Stockmeier CA, May W, Klimek V (2003). Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. *Biological Psychiatry*, 53: 315-323.
- Ortiz V (2001). Reacciones hormonales e inmunológicas agudas en situaciones de estrés. Estudio experimental sobre el papel moderador de la experiencia de control. *Revista latinoamericana de psicología*, 33: 72-96.
- Palmero F (1996). Aproximación biológica al estudio de la emoción. *Anales de Psicología*, 12: 61-86.
- Passig C (1994). Los sistemas de memoria. *Revista de Psicología de la Universidad de Chile*, 5: 27-34.
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S (2013). Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Research*, 1539: 73-86.
- Pells SM, Pells VC, McKenna MM (1993). Some subordinates are more equal than others: Play fighting amongst adult subordinate male rats. *Aggressive Behavior*, 19: 385-393.

- Perry VH (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 90: 113-121.
- Prados J, Trobalon JB (1998). Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology*, 26: 42-48.
- Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM (2016). Dendritic spines in depression: what we learned from animal models. *Neural Plasticity*, 2016: 8056370.
- Quirk GJ, Garcia R, González-Lima F (2006). Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biological Psychiatry*, 60: 337-343.
- Quirk GJ, Mueller D (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33: 56-72.
- Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Ballottari A, Arban R (2011). Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behavioural Brain Research*, 216: 100-108.
- Reader BF, Jarrett BL, McKim DB, Wohleb ES, Godbout JP, Sheridan JF (2015). Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience*, 289: 429-442.
- Retamal CP (2001). Psicofarmacoterapia antidepresiva. *Revista médica de Chile*, 129: 813-818.
- Ribot T (1882). *Diseases of the Memory: An Essay in the Positive Psychology*. D. Appleton and Company, New York.
- Richter-Levin G, Akirav I (2003). Emotional tagging of memory formation--in the search for neural mechanisms. *Brain Research Reviews*, 43: 247-256.
- Riekkinen P Jr, Riekkinen M, Sirviö J (1993). Cholinergic drugs regulate passive avoidance performance via the amygdala. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267: 1484-1492.
- Rivest S (2002). Are glucocorticoids good or bad for brain development and plasticity? *Endocrinology*, 143: 1157-1158.

- Rodgers RJ, Randall JI (1986). Acute non-opioid analgesia in defeated male mice. *Physiology & Behavior*, 36: 947-950.
- Rohde P (2001). The relevance of hierarchies, territories, defeat for depression in humans: hypotheses and clinical predictions. *Journal of Affective Disorders*, 65: 221-230.
- Roosendaal B (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25: 213-238.
- Roosendaal B, Koolhaas JM, Bohus B (1991). Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiology & Behavior*, 50: 777-781.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 423-433.
- Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M (2001). New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex. *Behavioural Brain Research*, 127: 183-197.
- Ruiz-Sánchez JM, Fernández S, González J (2006). Aspectos teóricos actuales de la memoria a largo plazo: De las dicotomías a los continuos. *Anales de Psicología*, 22: 290-297.
- Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, 162: 127-134.
- Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83: 803-834.
- Sakami S, Nakata A, Yamamura T, Kawamura N (2002-2003). Psychological stress increases human T cell apoptosis in vitro. *Neuroimmunomodulation*, 10: 224-231.
- Sandi C, Venero C, Cordero I (2001). Fisiología y patología del estrés. En: Sandi C, Venero C, Cordero I. (Eds.): *Estrés. Memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento* (pp. 39-73). Editorial Ariel SA, Barcelona.

- Sandín B (2003). Un análisis basado en el papel de los factores sociales. *Revista Internacional de Psicología Clínica y de la Salud*, 3: 141-157.
- Santamaría C (2001). *Historia de la Psicología. El Nacimiento de una Ciencia*. Ariel, Barcelona.
- Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 24: 5704-5710.
- Sapolsky RM (1992). Neuroendocrinology of the stress-response. En: Becker J, Breedlove M, Crews D. (Eds.): *Behavioral endocrinology* (pp. 287-324). Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.
- Sapolsky RM. (2000) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological Psychiatry*, 48: 755-765.
- Schaub H (1995). Dominance fades with distance: an experiment on food competition in long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of Comparative Psychology*, 109:196-202.
- Schmitt JA, Wingen M, Ramaekers JG, Evers EA, Riedel WJ (2006). Serotonin and human cognitive performance. *Current Pharmaceutical Design*, 12: 2473-2486.
- Selye H (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138: 32.
- Selye H (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1: 1383-1392.
- Selye H (1973). The evolution of the stress concept, *American Scientist*, 61: 692-699.
- Selye H (1974). *Stress without distress*. New America Library, New York.
- Sgoifo A, Costoli T, Meerlo P, Buwalda B, Pico'-Alfonso MA, De Boer S, Koolhaas J (2005). Individual differences in cardiovascular response to social challenge. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29: 59-66.

- Sgoifo A, de Boer SF, Haller J, Koolhaas JM (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: Relationships with aggression. *Physiology & Behavior*, 60: 1403-1407.
- Sgoifo A, Pozzato C, Meerlo P, Costoli T, Manghi M, Stilli D, Musso E (2002). Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity. *Stress*, 5: 23-35.
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *Journal of Neuroscience*, 19: 5034-5043.
- Silverman MN, Sternberg EM (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1261: 55-63.
- Silvers JA, Lumian DS, Gabard-Durnam L, Gee DG, Goff B, Fareri DS, Caldera C, Flannery J, Telzer EH, Humphreys KL, Tottenham N (2016). Previous institutionalization is followed by broader amygdala-hippocampal-pfc network connectivity during aversive learning in human development. *Journal of Neuroscience*, 36: 6420-6430.
- Smith PK (2000). Bullying in schools: Lessons from two decades of research. *Aggressive Behavior*, 26: 1-9.
- Solís-Vivanco R (2012). Modulación emocional de la memoria: aspectos neurobiológicos. *Archivos de Neurociencias*, 17: 119-128.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current Opinion in Neurobiology*, 20: 231-235.
- Squire LR (1987). *Memory and brain*. Oxford University Press, New York.
- Squire LR (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychological Review*, 99: 195-231.

- Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993). The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology*, 44: 453-495.
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 872-883.
- Squire LR, Zola SM (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13515-13522.
- Steptoe A, Marmot M (2002). The role of psychobiological pathways in socio-economic inequalities in cardiovascular disease risk. *European Heart Journal*, 23: 13-25.
- Stiedl O, Pappa E, Konradsson-Geuken Å, Ögren SO (2015). The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6:162.
- Sullivan K (2000). *The anti-bullying handbook*. Oxford University Press, Oxford.
- Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, Senzai Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Deguchi Y, Breyer RM, Breyer MD, Narumiya S (2012). Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *Journal of Neuroscience*, 32: 4319-4329.
- Tarpy RM (1986). *Aprendizaje y motivación animal*. Debate, Madrid.
- Tellez Vargas J (2000). La Noradrenalina. Su rol en la depresión. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 29: 59-73.
- Thierry A, Pirot S, Gioanni Y, Glowinski J (1998). Dopamine function in the prefrontal cortex. *Advances in Pharmacology*, 42: 717-720.
- Thomas BC, Pandey M, Ramdas K, Nair MK (2002). Psychological distress in cancer patients: hypothesis of a distress model. *European Journal of Cancer Prevention*, 11: 179-185.



- 
- Thompson PJ (1991). Antidepressants and memory: A review. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 6: 79-90.
- Thompson RF, Kim JJ (1996). Memory system in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13438-13444.
- Tidey JW, Miczek KA (1996). Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 721: 140-149.
- Torrás M, Portell I, Morgado I (2001). The amigdaloid body: functional implications. *Revista de Neurología*, 3: 471-476.
- Trucco M (2002). Estrés y trastornos mentales: aspectos neurobiológicos y psicosociales. *Revista Chilena de Neuro-psiquiatría*, 40: 8-19.
- Turner-Cobb J, Sephton S, Spiege D (2001). Psychosocial effects on immune function and disease progression in cancer: human studies. En: Ader R (Ed.), *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 397-409.
- Van Kampen M, Schmitt U, Hiemke C, Fuchs E (2000). Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioural and endocrine changes in male tree shrews. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65: 539-46.
- Van Praag H (2004). Can stress cause depression? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28: 891-907.
- Varela-Ruiz M, Ávila-Acosta R, Fortoul TI (2005). *La memoria: definición, función y juego para la enseñanza de la medicina*. Médica Panamericana, México.
- Vázquez C, Hervás G, Hernangómez L, Romero N (2010). Modelos cognitivos de la depresión: una síntesis y nueva propuesta basada en 30 años de investigación. *Psicología Conductual*, 1: 139-165.

- Vicens P, Redolat R, Carrasco MC (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15: 539-544.
- Vogel S, Schwabe L (2016). Stress in the zoo: Tracking the impact of stress on memory formation over time. *Psychoneuroendocrinology*, 71: 64-72.
- Von Frijtag JC, Van den Bos R, Spruijt BM (2002). Imipramine restores the long-term impairment of appetitive behavior in socially stressed rats. *Psychopharmacology*, 162: 232-238.
- Wadee A, Kuschke R, Kometz S, Berk M (2001). Personality factors, stress and immunity. *Stress and Health*, 17: 25-40.
- Wagner KV, Hartmann J, Mangold K, Wang XD, Labermaier C, Liebl C, Wolf M, Gassen NC, Holsboer F, Rein T, Müller MB, Schmidt MV (2013). Homer1 mediates acute stress-induced cognitive deficits in the dorsal hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 33: 3857-3864.
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 7563-7568.
- Warrington EK, McCarthy RA (1994). Multiple meaning systems in the brain: a case for visual semantics. *Neuropsychologia*, 32: 1465-1473.
- Watanabe Y, McKittrick C, Blanchard D, Blanchard R, McEwen B, Sakai R (1995). Effects of chronic social stress on tyroxine hydroxylase mRNA and protein levels. *Molecular Brain Research*, 32: 176-180.
- Watanabe Y, McKittrick C, Blanchard D, Blanchard R, McEwen B, Sakai R (1995). Effects of chronic social stress on tyroxine hydroxylase mRNA and protein levels. *Molecular Brain Research*, 32: 176-180.
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL (2009). Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and

- limbic monoamines as adults. *Behavioral Neuroscience*, 123: 564-576.
- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 20: 7059-7066.
- Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 70: 1672-1677.
- Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H (2000). Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron*, 27: 623-633.
- Wood JN, Grafman J (2003). Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 139-147
- Yehuda R, Southwick SM, Mason JW, Giller EL (1990). Interactions of the hypothalamic-pituitary adrenal axis and the catecholaminergic system of the stress disorder. En: Guiller EL. (Ed): *Biological Assessment and Treatment of PTSD*. American Psychiatric Press, Washington.
- Yerkes RM, Dodson JD (1908). The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *Journal of Comparative Neurology and Psychology*, 18: 459-482.
- Yoshimura H, Kimura N (1991). Ethopharmacology of copulatory disorder induced by chronic social conflict in male mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15: 497-500.
- Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, Lu XY (2011). Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14: 303-317.
- Zhang G, Ásgeirsdóttir HN, Cohen SJ, Munchow AH, Barrera MP, Stackman RW Jr (2013). Stimulation of serotonin 2A receptors

facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*, 64: 403-413.

Zhang Y, Fukushima H, Kida S (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Molecular Brain*, 4: 4.

Zhao T, Huang GB, Muna SS, Bagalkot TR, Jin HM, Chae HJ, Chung YC (2013). Effects of chronic social defeat stress on behavior and choline acetyltransferase, 78-kDa glucose-regulated protein, and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein in adult mice. *Psychopharmacology*, 228: 217-230.

Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M (2005). Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, 47: 859-872.

Zola SM, Squire LR, Teng E, Stefanacci L, Buffalo EA, Clark RE (2000). Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *Journal of Neuroscience*, 20: 451-463.

## **FUENTES DE FINANCIACIÓN**

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de un proyecto de investigación denominado "Consecuencias del consumo de alcohol tipo Binge Drinking y del estrés social crónico sobre la memoria durante la adolescencia" llevado a cabo gracias a la financiación obtenida del Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2013-44491-P). Otra fuente de financiación que ha contribuido a la realización de los estudios de esta Tesis Doctoral ha provenido del proyecto "Impacto del estrés social sobre la salud: factores de vulnerabilidad y de resistencia" subvencionado por la Generalitat Valenciana que se enmarca en las ayudas para grupos de excelencia (PROMETEO/2011/048). Por último, la obtención de la ayuda para la formación de profesorado universitario (FPU12/06716) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte ha posibilitado la dedicación completa de la doctoranda a sus estudios de Tesis Doctoral.



## **ANEXO I: ARTÍCULO I**

**Monleón S, Duque A, & Vinader-Caerols C.  
(2015).**

**Effects of chronic social defeat stress on  
memory in post-pubertal and adult CD1 mice.**





## **ANEXO II: ARTÍCULO II**

**Artículo II. Monleón S, Duque A, & Vinader-Caerols C. (2016).**

**Effects of several degrees of chronic social defeat stress on emotional and spatial memory in CD1 mice.**





## **ANEXO III: ARTÍCULO III**

**Artículo II. Duque A, Vinader-Caerols C, & Monleón S. (2016).**

**Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice.**





## **ANEXO IV: ARTÍCULO IV**

**Artículo II. Duque A, Vinader-Caerols C, & Monleón S. (2017).**

**Indomethacin counteracts the effects of chronic social defeat stress on emotional but not recognition memory in mice**

