

Tesis Doctoral
2014

Neurociencias

Especificidad de las
poblaciones neuronales
activadas en respuesta
a distintos estímulos
estresantes emocionales

Ignacio Marín Blasco



UAB



director

Antonio Armario García

Dept. Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Instituto de Neurociencias

UAB

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas y becas:

Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-0LL 75 y SAF2011-28313)

Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/0015 y RD12/008/0014, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo)

Plan Nacional sobre Drogas

Generalitat de Catalunya (SGR2009-16)

Durante el desarrollo de este trabajo, Ignacio Javier Marín Blasco disfrutó de una beca del **Programa de Ayudas de Formación y Perfeccionamiento de Personal Investigador** del Gobierno Vasco. Convocatoria 2008-2009.

resumen abstract

Resumen

La exposición a estímulos estresantes de tipo emocional induce activación neuronal en muchas regiones del SNC que cursa en paralelo con una estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA). La activación neuronal suele valorarse mediante la inducción de genes de expresión temprana como *c-fos*, mientras que la activación del eje HPA se basa en la expresión del factor liberador de corticotropina (CRF) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y en la liberación de hormonas como la ACTH y los glucocorticoides. Numerosos estudios sugieren que la expresión de *c-fos* y CRF alcanza un máximo alrededor de los 15-30 min de iniciada la exposición al estrés, para disminuir posteriormente a pesar de la persistencia del estímulo estresante. Esta disminución de la respuesta podría obedecer a cambios en las señales estimuladoras y/o inhibitoras que llegan a la neurona como consecuencia de la exposición prolongada al mismo estímulo estresante, o bien a mecanismos de represión intracelular. Razonamos que si la hipótesis de los cambios en las señales es correcta, la expresión de dichos genes se restablecería en gran medida en respuesta a un nuevo estímulo estresante, en tanto que si la segunda hipótesis es la válida, la expresión debería estar bloqueada.

Utilizando la rata como modelo, hemos estudiado en un primer experimento mediante hibridación *in situ* (ISH), los cambios en la expresión de *c-fos* y CRF, y los cambios en los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona tras la exposición prolongada (unas 4 h) a una inmovilización en plancha (IMO) y cómo esta exposición a la IMO afecta a la respuesta a un nuevo estímulo estresante (nado forzado). Los resultados de expresión de *c-fos* indicaron que en la corteza prefrontal medial (mPFC), el septum lateral ventral (LSv) y la amígdala medial (MeA) la respuesta al nado tras la IMO prolongada es capaz de restablecerse en gran medida, dando validez a la hipótesis de una reducción de las señales que llegan a las neuronas. Sin embargo, en el PVN la expresión de *c-fos* en respuesta al nado tras la IMO prolongada se encuentra en su mayor parte bloqueada, sugiriendo un bloqueo intracelular. En consonancia con los resultados de expresión de *c-fos* en el PVN, tanto la expresión de CRF como la secreción de ACTH en respuesta al nado se encuentran totalmente bloqueadas tras la IMO prolongada.

Una interpretación correcta de estos primeros resultados, precisa conocer si las poblaciones neuronales activadas durante la IMO prolongada coinciden o no con las que responden al nado tras esta IMO. Al objetivo de identificar estas neuronas hemos realizado un nuevo experimento similar al anterior pero incluyendo un grupo de animales que fue liberado de la IMO prolongada y re-expuesto a una nueva IMO. La finalidad de este grupo era diferenciar la activación debida exclusivamente al nado de la que pudiera producirse por otros procesos como la simple manipulación del animal o la propia liberación de la IMO. Para identificar las poblaciones neuronales que responden a la IMO prolongada y al nado, hemos realizado un doble marcaje de la proteína c-Fos y el mRNA que codifica para esta proteína mediante inmunofluorescencia e ISH fluorescente (IF-FISH). Basándonos en la dinámica de ambos marcadores, las neuronas que responden a la IMO prolongada mostrarían fundamentalmente proteína y poco o nulo mRNA, mientras que las que responden al nado aplicado tras esta IMO mostrarían fundamentalmente mRNA y nula proteína. Tras este análisis hemos observado que en regiones como el mPFC, el LSV y la MeA, la exposición al nado tras la IMO prolongada provocó la activación de nuevas neuronas sugiriendo cierta especificidad en la respuesta a ambos estímulos estresantes. Sin embargo, en el PVN con la exposición al nado tras la IMO prolongada no provocó activación de nuevas neuronas, confirmando la existencia de una sola población neuronal que responde indis-

tintamente frente a estímulos estresantes de distinta naturaleza que es bloqueada tras una estimulación prolongada.

Una gran parte de la activación neuronal observada en términos de expresión de *c-fos* en respuesta a los distintos estímulos estresantes podría deberse a procesos de activación generalizada o de *arousal* que enmascararía aquellas neuronas que son realmente importantes en la respuesta al estrés. En un último experimento hemos pretendido disminuir la aportación del *arousal*, administrando a nivel sistémico DSP-4, una neurotoxina altamente selectiva para las terminales noradrenérgicas provenientes del LC. Una semana después de la administración de DSP-4, expusimos a los animales a estímulos estresantes de diferente intensidad (ambiente nuevo, olor al depredador e IMO) para posteriormente analizar la expresión de *c-fos* mediante FISH en el mPFC, el LSv, la MeA y el PVN. El alcance de la lesión sobre las terminales noradrenérgicas del LC se valoró mediante inmunofluorescencia de la dopamina beta-hidroxilasa (D β H). En concordancia con datos de la literatura, sólo en el mPFC y la MeA se pudo apreciar una disminución en las terminales noradrenérgicas. La lesión con el DSP-4 no tuvo un impacto sobre la expresión de *c-fos* en respuesta a los distintos estímulos estresantes, salvo en la respuesta del LSv a la IMO donde se observó una disminución.

En conjunto, los resultados sugieren que en la reducción de la expresión de *c-fos* observada tras la exposición prolongada a un estímulo emocional pueden intervenir tanto la familiarización con el estímulo y la consiguiente reducción de las señales estimuladoras como la represión intracelular de la expresión del gen. La contribución de cada uno de los mecanismos es marcadamente dependiente del área estudiada. Por otro lado, parecen existir poblaciones de neuronas que responden específicamente a la IMO y al nado, aunque muchas de ellas pueden ser comunes a ambos. En la respuesta del eje HPA podrían añadirse bloqueos adicionales que probablemente contribuyen a reducir el posible impacto negativo de una liberación excesiva de glucocorticoides. El escaso impacto de la administración de DSP-4 podría explicarse por la existencia de mecanismos compensatorios y por lo tanto sería necesario valorar otras alternativas para disminuir la aportación del *arousal* a la respuesta de estrés.

Abstract

Exposition to emotional stressful stimuli leads to neuronal activation of several regions of the Central Nervous System (CNS) that converge into the stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). This neuronal activation can be measured by the induction of early expression genes (IEG) such as *c-fos*, while the activation of the HPA axis can be measured by the expression of the corticotrophin-releasing-factor (CRF) in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and also by the release of hormones such as ACTH and glucocorticoids. There are several studies that suggest the expression of *c-fos* and CRF to reach its maximum around 15-30 min after initiation of the exposition to stress. A decline in these parameters is observed even with the persistence of the stressful stimuli. This decline could be due to changes in the stimulatory/inhibitory signals arriving to the neurons as a consequence of a prolonged exposition to the same stressful stimuli, or it could also be due to intracellular repression mechanisms. If the former hypothesis is correct, the expression of such genes would be mostly reestablished in response to new stressful stimuli, however, if the second hypothesis is valid, the expression should be blocked.

In a first experiment we studied changes in the expression of *c-fos* and CRF in the rat CNS and changes in plasma levels of ACTH and corticosterone after a prolonged exposure (4 h approx.) to immobilization (IMO). We then assessed how this exposure could affect the response to a new stressor (forced swim). The results of expression of *c-fos* indicated that in the medial prefrontal cortex (mPFC), the ventral lateral septum (LSv) and the medial amygdala (MeA) the response after prolonged IMO can be greatly restored, validating the hypothesis of a reduction of signals arriving to the neurons. However, in the PVN, the *c-fos* expression in response to forced swimming after prolonged IMO is largely blocked, suggesting an intracellular repression. Corroborating the results of *c-fos* expression in the PVN, the expression of CRF and ACTH secretion in response to forced swim are completely blocked after prolonged IMO.

A correct interpretation of these first results requires knowing whether the neuronal populations activated during prolonged IMO are the same as those responding to the forced swim applied after the prolonged IMO. In order to identify these neurons we performed a new experiment which was similar to the previous one but including a new group of animals that was re-exposed to a second IMO instead of the forced swim. The purpose of this group was to differentiate activation due exclusively to forced swim from the one that could be produced by other processes such as the simple manipulation of the animal or the release of IMO. To identify the neuronal populations that respond to prolonged IMO and forced swim, we have performed a double labeling of c-Fos protein and its mRNA. Given the dynamics of both markers, the neurons which respond to the prolonged IMO would show essentially protein and little or no mRNA, while those responding to forced swim applied after this IMO would show essentially mRNA and no protein. After this analysis we found that in regions such as the mPFC, LSV and MeA, exposure to forced swim after prolonged IMO triggered activation of new neurons suggesting some specificity in the response to both stressors. However, in the PVN exposure to forced swim after the prolonged IMO did not cause activation of new neurons, confirming the existence of a single neuronal population that responds similarly to different stressful stimuli, by which activation is inhibited after prolonged stimulation.

A great part of the neuronal activation observed in terms of expression of *c-fos* in response to various stressful stimuli could be due to generalized activation or *arousal* processes. This activa-

tion could mask those neurons that are really important in the stress response. In a final experiment we tried to decrease the contribution of *arousal* administrating DSP-4, a neurotoxin that is highly selective for LC noradrenergic terminals. One week after the administration of DSP-4, we exposed the animals to stressful stimuli differing in intensity (new environment, predator odor and IMO) and then we analyzed the expression of *c-fos* in the mPFC, LSV, MeA and PVN. The extent of the lesion on the noradrenergic terminals of LC was assessed by immunofluorescence of dopamine beta-hydroxylase (D β H). We observed only a decrease in noradrenergic terminals in the mPFC and MeA supporting data found in the bibliography. The DSP-4 lesion had no effect on the expression of *c-fos* in response to various stressors, except in the LSV in animals exposed to IMO where a decrease was observed.

The results of this work suggest that the reduction of *c-fos* expression observed after prolonged exposure to an emotional stimulus may involve both familiarization with the stimulus, with the consequent reduction of stimulatory signals, as well as an intracellular repression of this gene. The contribution of each mechanism seems to be markedly dependent of each region concerned. On the other hand, it seems to exist neuronal populations that respond specifically to IMO and forced swim, although many of them may be common to both. The HPA axis response could probably include additional blockages that may help to reduce the negative impact of an excessive glucocorticoid release. The limited impact of the DSP-4 administration could be explained by the existence of compensatory mechanisms, therefore other alternatives to reduce the contribution of arousal to stress response should be considered.

índice

Introducción [15]

Concepto de estrés [17]

- El Síndrome de Adaptación General [17]
- El peso del contexto y las diferencias individuales [18]
- Estímulos estresantes sistémicos, emocionales y mixtos [18]

Respuesta al estrés y eje HPA [19]

- El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal [20]
- Hormonas periféricas: ACTH y corticosterona [23]
- Respuesta del eje HPA como marcador de estrés [25]

Mecanismos de integración del estrés [27]

- Procesamiento de los estímulos estresantes [27]
- Proyecciones directas al PVN [28]
- Proyecciones indirectas al PVN [30]
- Vías centrales de integración del estrés [33]

Genes de expresión temprana: *c-fos* [33]

- c-fos* como marcador de activación neuronal [36]
- Aplicación de *c-fos* en el estudio del estrés [37]
- Dinámica temporal de la expresión de *c-fos* [39]

Arousal, LC y estrés [40]

- Implicación del sistema LC-NA y el arousal en la respuesta de estrés [42]
- Papel del sistema LC-NA en la inducción de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes [44]

Materiales y métodos [47]

Capítulo 1. Caracterización de la respuesta a una nueva situación estresante tras una exposición prolongada a la IMO [59]

Capítulo 2. ¿Se activan las mismas poblaciones neuronales en respuesta a la IMO y el nado? [69]

Capítulo 3. Influencia de la activación del locus coeruleus en la inducción de *c-fos* por el estrés emocional [81]

Discusión [89]

Caracterización de la respuesta a una nueva situación estresante ¿Se activan las mismas poblaciones neuronales en respuesta a la IMO y el nado? [95]

Influencia del arousal en la inducción de *c-fos* en respuesta a estrés emocional [108]

Conclusiones [113]

Bibliografía [117]

Abreviaturas

5-HT: Serotonina	GAS: Síndrome de adaptación general	ON: overnight
6-OHDA: 6-hidroxidopamina	GR: Receptor de glucocorticoides	OX: Oxitocina
AC: Núcleo anterior comisural del hipotálamo	GzLM: Modelo lineal generalizado	PAG: Sustancia gris periacueductal
Acb: Núcleo accumbens	hnRNA: RNA heteronuclear	p-CREB: proteína de unión a CRE fosforilada
ACTH: Hormona adrenocorticotropa	HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal	pemPVN: Grupo periventricular magnocelular
AngII: Angiotensina II	ICER: represor temprano inducible por AMPc	pePVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, periventricular parvocelular
AMPc: AMP cíclico	ICV: Intracerebroventricular	PFA: Paraformaldehído
ANOVA: Análisis de la varianza	IEG: Genes de expresión temprana	PFC: Corteza prefrontal
AP-1: Proteína activadora 1	IF: inmunofluorescencia	PH: Área hipotalámica posterior
apPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, anterior parvocelular	IL: Corteza infralímbica	Pir: Corteza piriforme
Arc: Núcleo arqueado del hipotálamo	IL-1β: Interleuquina-1-beta	POA: Área preóptica del hipotálamo
AVP: arginina-vasopresina	IMO: Inmovilización en plancha	POD: Peroxidasa
Bar: Núcleo de Barrington	IP: Administración intraperitoneal	POMC: Proopiomelanocortina
BLA: Amígdala, subdivisión basolateral	ISH: Hibridación in situ	poPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, posterior parvocelular
BSA: Seroalbúmina bovina	ITF: Factores de transcripción inducibles	pPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, parvocelular
BST: Núcleo del lecho de la estría terminal	KPBS: Tampón fosfato potásico	PrL: Corteza prelímbica
Ca²⁺/CRE: Elemento de respuesta a Ca ²⁺ /cAMP	LC: Locus coeruleus	PRL: Prolactina
catFISH: FISH de localización subcelular el mRNA	LH: Hipotálamo lateral	PVA: Núcleo paraventricular del tálamo
cDNA: DNA copia	LPS: Lipopolisacárido bacteriano	PVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo
CeA: Amígdala, subdivisión central	LS: Septum lateral	RIA: Radioinmunoanálisis
Cg1: Corteza cingulada 1	LSv: Septum lateral, ventral	SCN: Núcleo supraquiasmático
CRF: Factor liberador de corticotropina	MC2-R: Receptor de melanocortina	SEM: Error estándar
CRFR₁: Receptor de CRF tipo 1	MeA: Amígdala, subdivisión medial	SMA: Eje simpático-médulo-adrenal
CRFR₂: Receptor de CRF tipo 2	MFB: Haz noradrenérgico telencefálico medial	smPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, submagnocelular parvocelular
DB: Haz noradrenérgico dorsal	MnR: Rafe medial	SNC: Sistema nervioso central
DEPC: Dietilpirocarbonato	mpdPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, medial parvocelular dorsal	SRE: Elemento de respuesta al suero
DIG: Digoxigenina	mPFC: Corteza prefrontal medial	SSC: Citrato de sodio salino
DM: Núcleo dorsomedial del hipotálamo	mPOA: Área preóptica medial del hipotálamo	TEA: Trietanolamina
DNAsa I: Desoxirribonucleasa I	mpPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, medial parvocelular	TH: Tirosina hidroxilasa
DOI: Densidad óptica integrada	mPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, lateral magnocelular	tRNA: RNA transferente
dpPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, dorsal parvocelular	mpvPVN: Núcleo paraventricular del hipotálamo, medial parvocelular ventral	UA: Unidades arbitrarias
DR: Rafe dorsal	MR: Receptor de mineralocorticoides	UTP: uracilo trifosfato
DSP-4: N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina	mRNA: RNA mensajero	VB: Haz noradrenérgico ventral
DTT: Ditioneitol	NA: Noradrenalina	VLM: Médula ventral lateral
DβH: Dopamina beta-hidroxilasa	NE: Ambiente nuevo	VM: Núcleo ventromedial del hipotálamo
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético	NGF: Factor de crecimiento nervioso	vmPFC: Corteza prefrontal ventro-medial
EEG: Electroencefalografía	NPY: Neuropeptido Y	vSUB: Subiculum ventral
FH: Formación hipocampal	NTS: Núcleo del tracto solitario	VTA: Área tegmental ventral
FISH: Hibridación in situ fluorescente		
GABA: Ácido gamma-aminobutírico		
GAD: Glutamato descarboxilasa		

introducción

Concepto de estrés

El Síndrome de Adaptación General

En el año 1929, **Walter Cannon** acuñó el término **homeostasis** (del griego “*homeo*” igual y “*stasis*” posición) para referirse al *complejo conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten a los organismos adaptarse a los cambios físicos o biológicos del entorno y mantener ciertos parámetros fisiológicos críticos dentro de un rango operacional limitado* (v.g. glicemia, osmolaridad o temperatura corporal). Además, destacó la participación del sistema **simpático-médulo-adrenal** (SMA) como componente esencial del mantenimiento de la homeostasis y describió la respuesta de **lucha o huida** (“*fight or flight*”) como la *respuesta conductual frente a situaciones amenazantes*. Cannon dio especial relevancia a los estímulos psicológicos, aspecto muy importante en el desarrollo de las posteriores definiciones de estrés (Goldstein y McEwen, 2002)

Poco después, el endocrinólogo canadiense **Hans Selye** creyó haber descubierto una nueva hormona al observar una serie de síntomas comunes tras inyectar diversos extractos ováricos a las ratas de laboratorio. Estos síntomas incluían crecimiento de la corteza adrenal, atrofia de bazo y nódulos linfáticos, y alteraciones gastrointestinales con pérdida de peso. Su hipótesis comenzó a desvanecerse cuando inyectando extractos de diferentes órganos e incluso formalina, obtuvo los mismos resultados. Posteriormente, Selye recordó que sus pacientes con enfermedades graves examinados durante su introducción a la medicina clínica desarrollaban a menudo síntomas similares a los observados en las ratas y acabó concluyendo que existía algún mecanismo interno común que combatía a los agentes nocivos. Fue así como concibió el concepto del **Síndrome de Adaptación General** (General Adaptation Syndrome, GAS), al cual describió como la *respuesta usual del organismo ante diferentes situaciones de estrés ambiental*.

El GAS comprende tres etapas fundamentales: una etapa de **alarma**, durante la cual el cuerpo se prepara para la defensa o la huida ante un estímulo determinado; una segunda etapa de **resistencia** que permite al mismo sobrevivir frente a la situación; y finalmente, si la duración de la situación es suficientemente prolongada y ésta es demasiado intensa, una etapa de **agotamiento** que conlleva el deterioro del organismo (Selye, 1936). En estudios posteriores Selye destacó que los cambios fisiológicos observados estaban asociados a la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal, convirtiendo así la activación del eje **hipotálamo-hipofisario-adrenal** (HPA) en el aspecto fisiológico más relevante del estrés (ver Goldstein y Kopin, 2007).

El término “**stress**” fue acuñado por Selye partiendo del término “**strain**”, utilizado en física para describir procesos de fatiga y deformación de materiales. El estrés o respuesta de estrés en el léxico de Selye comprendería la *respuesta común no específica frente a cualquier demanda que aleje a los organismos de su equilibrio homeostático*. De esta manera, un **estímulo estresante** o “**stressor**” podría ser cualquier estímulo capaz de alterar la homeostasis, desde la privación prolongada de alimento hasta la inyección de una sustancia extraña al cuerpo o un trabajo muscular intenso.

Es importante destacar que además de la respuesta común e inespecífica, existe una respuesta homeostática característica de cada estímulo estresante (Romero y Sapolsky, 1996; Pacak *et al.*, 1998; Pacak y Palkovits, 2001). Es posible que la respuesta típica de estrés a nivel hormonal (activación de los ejes SMA y HPA) apareciera originariamente en respuesta a estímulos de tipo físico, como una hemorragia, y sólo posteriormente en respuesta a estímulos psicológicos, en

cuanto éstos tienen en la naturaleza una alta probabilidad de desembocar en un daño físico. Los diferentes tipos de estímulos estresantes se discutirán más adelante.

La **homeostasis** se centra en un número de variables que son realmente esenciales para la vida y es, por lo tanto, necesario mantener bajo un rango estrecho de variabilidad, como el pH, la temperatura corporal y los niveles de oxígeno (revisión en McEwen, 2000). Por el contrario, existen sistemas que varían dentro de un rango muy amplio y constituyen la base de la adaptación frente a cambios reales, como por ejemplo las fluctuaciones hormonales, la frecuencia cardíaca y presión sanguínea o ciertos parámetros del sistema inmune. Son los cambios en estas variables los que permiten que los sistemas esenciales se mantengan dentro de unos rangos estables.

Sterling y Eyer a finales de los 80 introdujeron el término **alostasis** para definir algunos de estos cambios al caracterizar cómo muchas variables como la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca varían a lo largo del día o en diferentes situaciones como mecanismo de adaptación a distintas condiciones ambientales (revisión en McEwen, 1998). Más tarde, McEwen y Stellar (1993) redefinieron la alostasis como el proceso activo de mantenimiento de la homeostasis y la adaptación al ambiente. De este modo, la **carga alostática**, sería el precio que pagaría el organismo por verse forzado a adaptarse a situaciones psicosociales o físicas adversas y la **sobrecarga alostática** representaría tanto el exceso como la respuesta ineficiente de los sistemas alostáticos, relacionándose con las consecuencias negativas del estrés (revisión en McEwen, 2003; 2004).

El peso del contexto y las diferencias individuales

Como hemos visto, en la respuesta de estrés existe una componente inespecífica común y otra específica propia de cada estímulo estresante. Sin embargo, la respuesta de estrés viene influida por factores individuales entre los que podemos destacar, en humanos, el estado de salud, las habilidades psico-sociales o el control que podemos ejercer sobre nosotros mismos y sobre el medio.

A finales de los años 60, Richard Lazarus planteó que la respuesta de estrés aparecía cuando los sucesos sobrepasaban las **estrategias de afrontamiento** (“*coping styles*”) de los individuos, es decir, las situaciones resultan estresantes sólo si se perciben como amenazadoras, peligrosas e incontrolables. Según Lazarus, los individuos no pueden reaccionar efectivamente a una situación sin antes realizar una evaluación cognitiva de ésta, que puede ser consciente o no (revisión en Lazarus, 1993). Así, el modo particular en que se evalúa y afronta una situación estresante modifica las consecuencias de la misma, no existiendo, por lo tanto, una respuesta estereotipada igual para todos los individuos (revisión en Korte *et al.*, 2005).

La respuesta a una situación en particular estaría influida por el **procesamiento cognitivo de la situación** (“*appraisal*”) y por las **estrategias de afrontamiento**, es decir, por el repertorio conductual utilizado por el individuo para escapar de la fuente de experiencias aversivas o para reducir el impacto de la situación (revisión en Koolhaas *et al.*, 1999). En función de las conductas desarrolladas frente a cada situación particular, tradicionalmente se han definido dos tipos de estrategias de afrontamiento: las **proactivas** (o activas) y las **reactivas** (o pasivas).

Estímulos estresantes sistémicos, emocionales y mixtos

De la revisión de la literatura se deduce que no existe una definición clara y aceptada del término estrés. Una definición que consideramos útil podría ser la propuesta por Vigos (1984), que bajo el **concepto de estrés** (o más apropiadamente, de respuesta al estrés) incluye una amplia

gama de *cambios fisiológicos y conductuales, desarrollados a lo largo de la filogenia, que tienen lugar en los organismos cuando se enfrentan a situaciones que ponen en peligro, de manera real, anticipada o simbólica, su integridad, y a las cuales no pueden hacer frente satisfactoriamente mediante los mecanismos homeostáticos normales.* Llegados a este punto y para ser precisos, también debemos diferenciar los conceptos de **estímulo estresante**, **estrés** y **respuesta al estrés** (Armario, 2006b), términos que usaremos de ahora en adelante. De esta manera, el estrés sería un estado del organismo, intermediario entre el estímulo estresante y la respuesta desencadenada por dicho estímulo.

En la definición de Vigas se indica que las situaciones estresantes pueden ser el resultado de la exposición tanto a estímulos **físicos** como puramente **psicológicos**, en tanto que éstos constituyan una amenaza potencial para el organismo. Actualmente se defiende la existencia de dos grandes grupos de estímulos (Kovács *et al.*, 2005): **sistémicos** y **emocionales**. Un estímulo estresante del tipo sistémico (también denominados **físicos** o **reactivos**) representa una amenaza real a la homeostasis que es reconocida a través de vías sensoriales somáticas o viscerales. Estos estímulos incluyen cambios pronunciados en el tono cardiovascular, alteraciones respiratorias, hipoxia, hipovolemia, alteraciones metabólicas u osmóticas, daño tisular y señales químicas y humorales indicadoras de infección o inflamación. Los estímulos estresantes de tipo emocional (también denominados **anticipatorios** o **psicológicos**) son capaces de desencadenar una respuesta de estrés de manera anticipatoria a una posible alteración homeostática. Estas respuestas son generadas por la predisposición innata de cada especie (reconocimiento de un depredador, reconocimiento del peligro asociado a las alturas o los espacios abiertos) como por condicionamiento clásico (mediante aprendizajes basados en la asociación entre estímulos). Como ejemplos tenemos los estímulos estresantes de tipo social (derrota social, aislamiento o privación materna) y el miedo a una situación nueva y desconocida o a un peligro inminente (presencia de un depredador).

Si bien esta clasificación es la más aceptada, existen estímulos que comparten características de las dos clasificaciones anteriores y son denominados **estímulos de tipo mixto**. A este grupo pertenecen la mayoría de estímulos estresantes utilizados en el laboratorio, como por ejemplo el choque eléctrico, la inmovilización en plancha (IMO) o el nado forzado, que aunque son de naturaleza fundamentalmente emocional también tienen una componente de tipo físico. Así mismo y de manera compatible con estas definiciones, los factores **incontrolabilidad** e **impredecibilidad** deberían ser considerados como críticos para que una situación sea considerada como estresante (Koolhaas *et al.*, 2011).

Respuesta al estrés y eje HPA

La respuesta al estrés comprende una amplia gama de modificaciones fisiológicas, habiendo sido especialmente estudiadas las metabólicas y neuroendocrinas. Entre ellas, dos de las respuestas fisiológicas mejor caracterizadas y comunes a todos los tipos de estímulos estresantes son la activación de los ejes **SMA** y **HPA**. Ambos tienen como objetivo facilitar una respuesta activa adecuada frente a situaciones adversas, así como inhibir procesos fundamentalmente anabólicos (ingesta, crecimiento y reproducción).

La activación del eje SMA da lugar a los cambios más inmediatos que son resultado de la liberación de **catecolaminas**: incremento en la frecuencia e intensidad de contracción del corazón, incremento de la presión arterial, hiperglucemia y lipólisis. La activación del eje HPA es respon-

sable de cambios a más largo plazo, resultado de la liberación de **glucocorticoides** al torrente sanguíneo.

Las respuestas del eje SMA y del eje HPA pueden dissociarse en función de las características diferenciales de los estímulos (Armario, 1998). Así, la respuesta del eje SMA sería más evidente frente a situaciones en las que se requiere una conducta activa, mientras que el eje HPA se activaría en mayor medida frente a situaciones que generan incertidumbre (por la novedad, por falta de control sobre ellas o por el no cumplimiento de las expectativas). Al estudiar la respuesta inicial al estímulo estresante es lógico observar activación de ambos ejes, probablemente debido a que una primera exposición aguda no permite al animal evaluar suficientemente la situación para poder separar ambas respuestas.

La activación del eje HPA se ha relacionado directamente con la génesis de **fisiopatologías** y **psicopatologías** asociadas a la exposición a estímulos estresantes (Michelson *et al*, 1995) y por este motivo ha sido uno de los ejes neuroendocrinos mejor caracterizados (Armario, 2006b). En el presente trabajo nos centraremos fundamentalmente en este eje y su regulación por el SNC.

El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal

El eje HPA (**Fig. 1**) está conformado por distintos niveles anatómicos y su activación supone en último término la liberación de **glucocorticoides**. Independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, la información es procesada en diferentes áreas del SNC para acabar convergiendo en el **núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)** donde se localizan neuronas neurosecretoras que envían sus axones al sistema portal-hipofisario de la eminencia media.

En base tipo de neuronas predominantes, el PVN puede dividirse en distintos subnúcleos (Herman *et al*, 2003), distinguiéndose principalmente las regiones **magnocelular (mpVN)** y **parvocelular (ppVN)**. Las neuronas magnocelulares sintetizan fundamentalmente **arginina-vasopresina (AVP)** y **oxitocina (OX)** que son liberados en la neurohipófisis en respuesta a estímulos como la lactancia, la náusea/distensión gástrica (selectivos para la OX), las perturbaciones del equilibrio hídrico e iónico y los descensos de la presión sanguínea (revisión en Engelmann *et al.*, 2004).

Las neuronas parvocelulares se agrupan en tres áreas: anterior parvocelular (apPVN), medial parvocelular (mpPVN) y periventricular parvocelular (pePVN). El área medial parvocelular a su vez se divide en porción dorsal (mpdPVN) y ventral (mpvPVN) (**Fig. 2**). Existen además dos áreas neurosecretoras asociadas al PVN, aunque estrictamente no forman parte de él, son los denominados núcleos neurosecretorios auxiliares: el grupo periventricular magnocelular (pemPVN) y el núcleo anterior comisural (AC) compuestos por neuronas magnocelulares que producen OX y envían axones a la neurohipófisis.

A diferencia de las neuronas magnocelulares, los axones de las **neuronas parvocelulares** proyectan a la capa externa de la eminencia media donde, mediante la liberación de factores estimuladores o inhibidores, regulan la secreción de determinadas hormonas desde la adenohipófisis. Aparte de las proyecciones a la eminencia media, existen otras neuronas en la región ventral (submagnocelular, smPVN), posterior (poPVN) y dorsal (dorsal cap, dpPVN) que proyectan hacia un gran número de núcleos, como el órgano subfornical, la glándula pineal, la amígdala, el mismo hipotálamo, el arqueado, el tronco encefálico y la médula espinal (Armstrong, 1995).

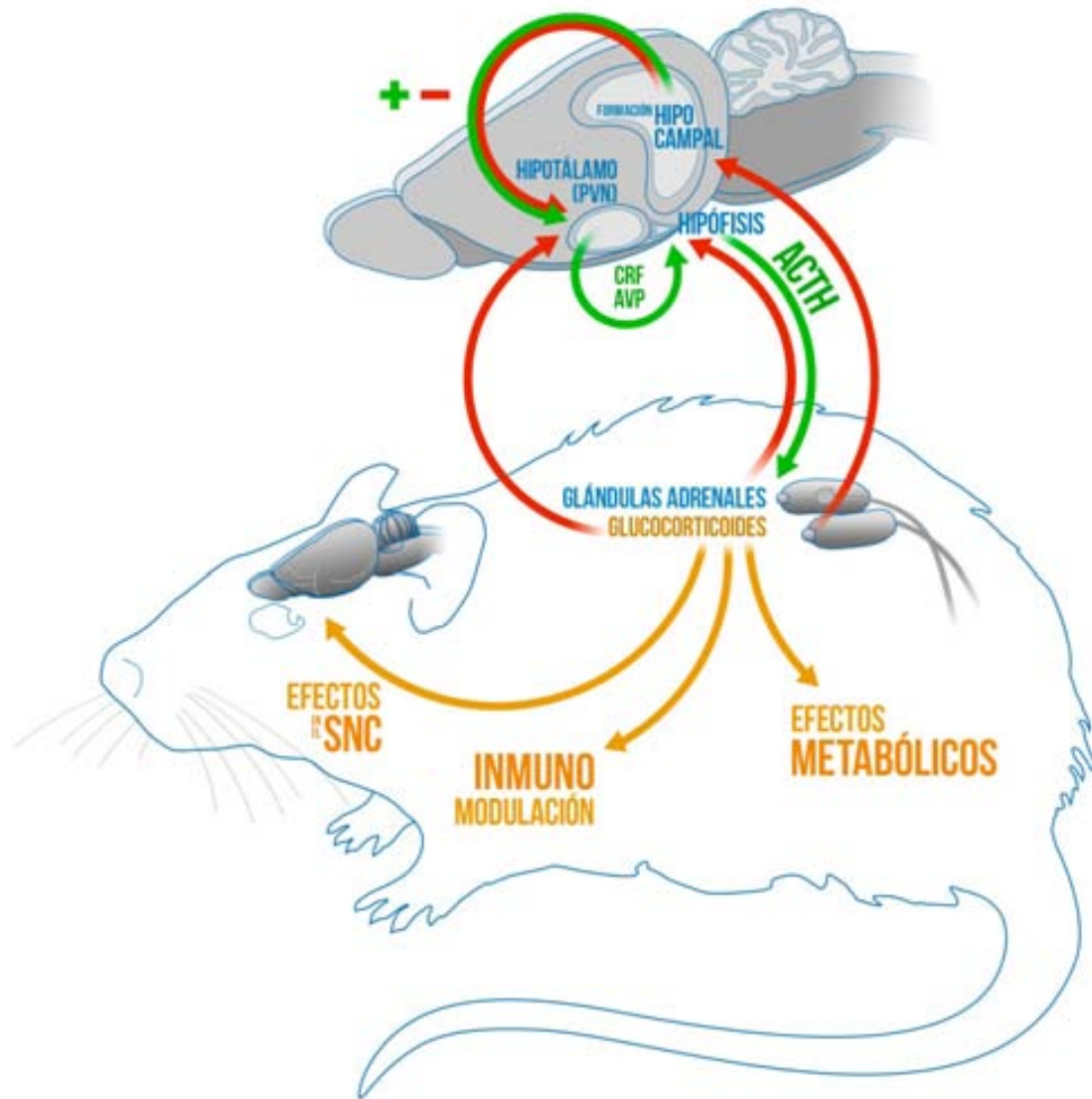


Figura 1. **Esquema del funcionamiento general del eje HPA.**

ACTH: Hormona adrenocorticotropa; *AVP*: arginina-vasopresina; *CRF*: factor liberador de corticotropina; *PVN*: núcleo paraventricular del hipotálamo.

En respuesta al estrés se activan dentro del PVN un número discreto de neuronas localizadas sobretodo en la **subdivisión mpPVN** (Johnson *et al*, 1992; Cullinan *et al*, 1995; Herman *et al*, 2002). Muchas de estas neuronas parvocelulares expresan el **factor liberador de corticotropina (CRF)** y, algunas de ellas también AVP (Whitnall, 1993). CRF y AVP son transportados axonalmente y liberados en la zona externa de la eminencia media, donde se incorporan a la circulación portal para alcanzar la adenohipófisis. Allí el CRF induce la síntesis de proopiomelanocortina (POMC) y la liberación a la circulación de los diversos péptidos derivados de la POMC, entre ellos la **hormona adrenocorticotropa** o **ACTH**. La AVP no estimula por sí misma la síntesis de ACTH pero sí que ejerce un papel en su liberación, potenciando el efecto del CRF (Rivier y Vale, 1983; Makara *et al*, 2004; Engelmann *et al.*, 2004) a través del receptor V1a (también denominado V3). En la respuesta de la ACTH a las situaciones de estrés intervienen, ade-

más del CRF y de la AVP, otros factores entre los que destacan la OX, angiotensina II (AII) y las catecolaminas. Así, la respuesta de la ACTH a cada estímulo estresante, podría ser el resultado de un cóctel especial de factores secretagogos liberados en la eminencia media (ver Antoni, 1986), aunque éste es un tema difícil de demostrar experimentalmente por las dificultades técnicas para obtener muestras del sistema portal hipofisario en animales pequeños.

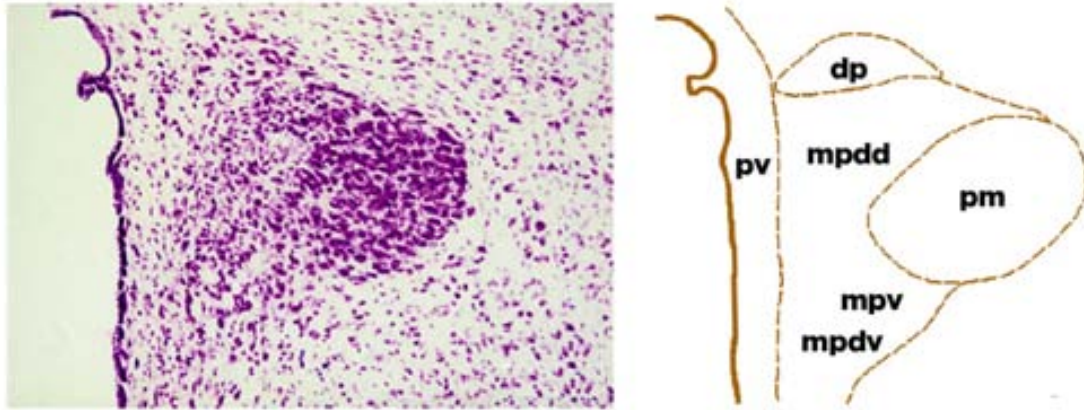


Figura 2. **Organización de la región medial del PVN.**

Izquierda: tinción de Nissl. *Derecha:* esquema de las distintas regiones. *Abreviaturas:* 3V: tercer ventrículo; **dp**: dorsal cap; **mpv**: región medial parvocelular; **mpdd**: subdivisión medial parvocelular dorsal; **mpdv**: región medial parvocelular ventral; **pm**: región magnocelular posterior.

Adaptado de Viau y Sawchenko, 2002.

Hay que destacar que también existen neuronas secretoras de CRF en varias zonas como el núcleo del lecho de la estría terminal (BST), la amígdala central (CeA), el Rafe y núcleo de Barrington (Bar), que podrían estar también implicadas en la regulación de las respuestas conductuales y autonómicas al estrés (Swanson *et al.*, 1983; Champagne *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999). También se han encontrado neuronas de CRF dispersas en diferentes áreas de la corteza cerebral y en la formación hipocampal (FH), cuya función es aún poco conocida (George *et al.*, 2012).

El CRF ejerce sus efectos mediante dos tipos de receptores, **CRFR₁** y **CRFR₂** (con dos subtipos **CRFR_{2α}** y **CRFR_{2β}**) que presentan una distribución diferencial en el SNC (revisión en Aguilera *et al.*, 2004; Bale y Vale, 2004). Los receptores de tipo **CRFR₁** son los principales responsables de la síntesis y liberación de ACTH y tienen una distribución más ubicua que los **CRFR₂**. Estos receptores también presentan afinidad por otras proteínas como las **urocortinas**, las cuales están codificadas por genes de la familia del CRF y presentan alta afinidad por el receptor **CRFR₂** (revisión en Zorrilla y Koob, 2005). Su distribución es fundamentalmente sub-cortical y tienen propiedades anorexigénicas cuando son administradas centralmente. Existen tres tipos de urocortina, las cuales difieren en su distribución y en sus efectos farmacológicos. La urocortina I también presenta afinidad por el receptor **CRFR₁** y su distribución es principalmente telencefálica. Las urocortinas II y III sólo presentan afinidad por los receptores **CRFR₂**. La urocortina II es sintetizada en el tallo cerebral y en regiones hipotalámicas diferentes a las otras urocortinas. Aunque sus funciones no son del todo conocidas, las urocortinas podrían estar implicadas en diversas funciones relacionadas con el estrés como la actividad HPA, la ansiedad, el aprendizaje y la memoria y la regulación del balance energético. Los receptores **CRFR₂** estarían implicados

en funciones más básicas como la ingesta, la reproducción o las conductas defensivas (Smagin y Dunn, 2000).

La distribución de neuronas, proyecciones y receptores de CRF, así como los numerosos datos experimentales con antagonistas de sus receptores, claramente demuestran que su papel no se limita a una acción hipofisiotrófica, sino que está implicado en multitud de procesos, tanto autonómicos como conductuales, incluyendo la conducta emocional, la ingesta de comida y otros procesos motivacionales, *arousal*, aprendizaje y memoria (ver Owens y Nemeroff, 1991; Croiset *et al.*, 2000; Lowry y Moore, 2006). Estas implicaciones sugieren que el CRF, sobre todo a través de los receptores de tipo CRFR₁, podría ser un factor importante en alteraciones cognitivas y psicopatologías como la ansiedad, la depresión o el abuso de drogas. Diversos estudios han identificado el receptor CRFR₁ como una posible diana para el tratamiento farmacológico de la depresión (Kehne, 2007). Antagonistas de este mismo receptor son capaces de reducir la activación del eje HPA inducida por estrés ejerciendo un bloqueo de los receptores de la adenohipófisis aunque seguramente también sobre los receptores cerebrales. Por consiguiente, los antagonistas del CRFR₁ podrían reducir la sintomatología de diversas patologías inducidas por el estrés (Kehne y Cain, 2010).

Hormonas periféricas: ACTH y corticosterona

Está bien establecido que el CRF y la AVP juegan un papel crucial como secretagogos de la ACTH, pero otros factores, como las **catecolaminas** y diversos **neuropéptidos**, pueden estimular también su secreción (revisión en Antoni, 1986). La **ACTH** es un péptido de 30 aminoácidos de liberación muy rápida, alcanzando su máximo a los 10-15 min. Actúa principalmente en la zona fasciculada de la **corteza de la glándula adrenal** donde se une a los receptores transmembrana MC2-R (receptor de melanocortina 2) (Adan y Gipsen, 2000) estimulando la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en ratas) así como la actividad transcripcional de estas células (revisión en Gallo-Payet y Payet, 2003; Sewer y Waterman, 2003), provocando cambios complejos y duraderos, entre ellos cambios tróficos.

Aunque la ACTH es el estimulador principal de la liberación de glucocorticoides, existen evidencias que apuntan a la existencia de otros factores reguladores. En concreto, se han observado niveles altos de glucocorticoides tras sesiones de estrés prolongado (entre 8 y 48 horas) a pesar de detectarse niveles de ACTH aproximadamente basales (Rivier y Vale, 1987; Hauger *et al.*, 1988). Para explicar esta disociación entre los niveles de ACTH y glucocorticoides se han sugerido otros factores reguladores como la angiotensina II, que causa incrementos dosis-dependientes de los glucocorticoides sin afectar a la ACTH (Keller-Wood *et al.*, 1986) y algunas citoquinas como la interleuquina-1 que podrían ejercer un efecto directo, fisiológicamente relevante, sobre la glándula adrenal (revisión en Vinson *et al.*, 1994). De todos los factores, probablemente el más importante es el control neural de la secreción de glucocorticoides, pues existen terminaciones nerviosas del nervio esplénico en la glándula adrenal (revisión en Engeland y Arnhold, 2005).

Los **glucocorticoides**, principales moléculas efectoras del eje HPA, ejercen múltiples acciones metabólicas en el organismo que contribuyen a una más adecuada respuesta a las amenazas del entorno. Sin embargo, los glucocorticoides son también responsables de la mayoría de consecuencias negativas asociadas al estrés (por ejemplo inmunosupresión, infertilidad y psicopatologías). Debido a la gran importancia de los efectos que ejercen los glucocorticoides en el organismo y en la regulación del eje HPA, es necesario desgranar las funciones de los glucocorticoi-

des y diferenciarlas en dos categorías principales: **moduladoras** y **preparatorias** (revisión en Salposky *et al.*, 2000). Las **funciones moduladoras** alteran la respuesta del organismo ante el estrés. Estas se dividen en 3 subtipos: **permissivas**, **supresoras** y **estimuladoras**. Las **acciones permissivas**, sientan las bases para una respuesta adecuada e inmediata al estrés. En esta categoría se incluyen los efectos sobre el metabolismo, como la lipólisis, proceso que aumenta la disponibilidad de glucosa por parte del SNC, y el incremento del ritmo cardíaco y de la presión arterial. También favorecen el incremento de la actividad de un amplio abanico de enzimas y proteínas no enzimáticas. Estas acciones se dan independientemente de la magnitud del incremento en los glucocorticoides en respuesta al estrés.

Las **acciones supresoras** aparecen tras una hora o más desde el inicio del estrés, y dependen de la magnitud del incremento en la liberación de glucocorticoides. Su función es prevenir las posibles consecuencias negativas de una respuesta excesiva al estrés, inhibiendo las respuestas inmune e inflamatoria y la actividad del propio eje HPA mediante mecanismos de **retroinhibición negativa** a nivel de la hipófisis anterior, el PVN y estructuras extrahipotalámicas como la FH y la corteza prefrontal medial (mPFC) (Armario, 2006). La retroinhibición ejercida por los glucocorticoides es de fundamental importancia para frenar la activación del eje HPA inducida por el estrés y volver con rapidez a la situación de reposo. Las **acciones estimuladoras** siguen el mismo patrón temporal que las acciones supresoras y también dependen de la magnitud de respuesta de los glucocorticoides, pero, a diferencia de las acciones supresoras, estas últimas potencian los efectos de otras hormonas liberadas durante la respuesta al estrés, por ejemplo manteniendo unos niveles altos de glucosa en plasma a medida que disminuyen los efectos más rápidos, mediados por la liberación de adrenalina. Finalmente las **funciones preparatorias** son aquellas que no afectan directamente a la respuesta inmediata a la situación estresante sino que modulan la futura respuesta a otra situación estresante, aspecto muy importante cuando se estudian situaciones de estrés crónico.

En función de los mecanismos subyacentes, los efectos de los glucocorticoides los podemos clasificar en dos grandes categorías: **genómicos** y **no genómicos**. Existen dos receptores intracelulares implicados en los cambios genómicos mediados por los glucocorticoides, del **tipo I** o de **mineralocorticoides (MR)** y del **tipo II** o de **glucocorticoides (GR)** (De Kloet, 2005), ambos se encuentran en el citosol asociados a otras proteínas (revisión en Pratt *et al.*, 2006), presentando un dominio de unión a esteroides y otro al DNA. Al interactuar con su ligando son translocados al núcleo, donde regulan la actividad trascricional de los genes con elementos de respuesta a glucocorticoides en su promotor. Dado que los efectos rápidos producidos por los glucocorticoides no son compatibles con el tiempo requerido para la transcripción génica, se hace evidente la existencia de mecanismos no genómicos (Makara y Haller, 2001). Se ha postulado que estos efectos no genómicos de los glucocorticoides estarían vinculados a receptores de membrana y en muchos casos relacionados con la modulación de otros sistemas de neurotransmisores (Groeneweg *et al.*, 2012).

Los MR y GR se diferencian, en primera instancia, por su afinidad por los glucocorticoides. Los MR tienen mayor afinidad por la corticosterona (en rata) y suelen estar ocupados a nivel basal en un 80%. Los GR muestran una ocupación progresiva dependiente del incremento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, ya sean debidos a los cambios en la concentración producidos por el ritmo circadiano o como respuesta a una situación estresante (Reul y de Kloet, 1985). Otra característica diferencial entre ambos es la distribución dentro del SNC (de Kloet *et al.*, 1990). Mientras que los MR tienen una localización muy específica, estando básicamente ubica-

dos en la FH, CeA y la amígdala medial (MeA), los GR muestran una distribución más amplia, incluyendo zonas claves para el control de la retroinhibición negativa del eje HPA, como el mPFC, la FH y el PVN (Armario, 2006b). Estas diferencias en afinidad y localización ponen de manifiesto la diferenciación funcional de los dos tipos de receptores. En resumen, mientras los MR ejercen un control sobre los efectos tónicos de los glucocorticoides, los GR estarían implicados en el control y el retorno a condiciones basales del eje HPA después de la activación producida como respuesta a una situación estresante (Ratka *et al*, 1989). Se considera que una ocupación excesiva de los GR o el desequilibrio en el balance entre los 2 tipos de receptores tendría una gran importancia en las consecuencias negativas asociadas al estrés (De Kloet, 2003). Otro factor a tener en cuenta, al evaluar los efectos de los glucocorticoides, es la transcortina (*corticosteroid-binding globulin*, CBG), proteína plasmática a la cual se unen gran parte de los glucocorticoides circulantes (revisión en Breuner y Orchinik, 2002). Se considera que sólo los glucocorticoides libres son capaces de unirse al receptor, de tal modo que son éstos los que pueden ejercer su actividad biológica en la célula.

Uno de los efectos más importantes de los glucocorticoides es su capacidad para regular la actividad del eje HPA, modulando la respuesta de estrés mediante **mecanismos de retroinhibición** (ver Herman *et al*, 2012). Dependiendo de su velocidad de acción, clasificamos estos mecanismos en tres categorías: **rápido**, **intermedio** y **lento** (ver Keller-Wood y Dallman, 1984). Existen evidencias de la existencia de mecanismos rápidos de los glucocorticoides, incompatibles con los efectos genómicos clásicos mediados por los receptores MR y GR (ver Makara y Haller, 2001). Se postula que los glucocorticoides podrían actuar a través de un receptor de membrana (aún por caracterizar) en las neuronas parvocelulares del PVN, activando la liberación local de endocannabinoides, que a su vez, inhibirían la liberación de glutamato en las sinapsis excitadoras que contactan con las neuronas parvocelulares del PVN (Di *et al.*, 2003). Los mecanismos intermedios aparecen a los 30-60 minutos del inicio de la respuesta, involucrando procesos de transcripción mediados por GR y MR. Finalmente, los mecanismos de acción lenta también pueden aparecer a partir de los 30-60 minutos pero, a diferencia de los mecanismos intermedios, pueden prolongarse muchas horas e incluyen el bloqueo de la transcripción de los genes de CRF, AVP y POMC inducido por estrés.

Por otro lado, los glucocorticoides ejercen efectos muy amplios sobre el SNC y juegan un papel esencial en el procesamiento cognitivo frente a estímulos aversivos (De Kloet *et al*, 1999). Evidencias recientes han mostrado que los glucocorticoides son potentes moduladores de los procesos de aprendizaje y memoria. En particular, la respuesta de estrés inducida por el aprendizaje de tareas con un componente emocional, y la consiguiente liberación de glucocorticoides asociada a la misma, se ha asociado a los procesos de consolidación de la memoria. En términos generales, los glucocorticoides ejercen efectos facilitadores del almacenamiento de la información recientemente adquirida en una memoria a largo plazo fundamentalmente a través de la activación de receptores GR y la regulación de la transcripción de diversos genes y la síntesis de un amplio número de proteínas necesarias para la formación de memorias a largo plazo (ver Sandi, 2003).

Respuesta del eje HPA como marcador de estrés

Dejando de lado la naturaleza y características de los estímulos estresantes, uno de los aspectos básicos en los estudios del estrés es poder valorar el grado de severidad o **intensidad** del estímulo, dado que este factor es presumiblemente muy relevante para determinar las consecuencias

conductuales y fisiológicas de la exposición a un estímulo estresante. Aunque existen un gran número de variables fisiológicas que se modifican en situaciones de estrés, solo unas pocas responden en función de la intensidad del mismo. Por este motivo es necesario distinguir entre variables que son marcadores de estrés, y nos indican simplemente que podemos estar en una situación de estrés, y los **marcadores de la intensidad del estrés**, cuyo rango de respuesta es proporcional a la intensidad del estímulo estresante administrado. Dentro de esta última categoría se incluyen un número reducido de variables: los **niveles plasmáticos de catecolaminas** (especialmente la adrenalina), **prolactina**, **hormonas del eje HPA** (ACTH y corticosterona), y **glucosa**, así como, la **reducción de la ingesta** en los días posteriores al estrés (Martí y Armario, 1998; Márquez *et al.*, 2002; Armario *et al.*, 2012).

Deben tenerse en cuenta diferentes factores cuando quiere escogerse un marcador de intensidad de estrés. Por ejemplo, el rango de sensibilidad de la variable a la intensidad del estímulo. Adrenalina, ACTH y prolactina, son variables muy sensibles puesto que con perturbaciones mínimas podemos observar grandes variaciones en sus niveles. Por el contrario, necesitamos una cierta intensidad mínima para observar cambios en la glucosa (Armario, 2006b). Un ejemplo opuesto es la corticosterona. Debido a que la glándula adrenal se satura con niveles medios de ACTH, como los que se pueden producir tras la exposición a un ambiente nuevo (Keller-Woods *et al.*, 1983), en situaciones de mayor intensidad, los niveles de corticosterona no estarían reflejando adecuadamente los niveles de ACTH circulantes (Kant *et al.*, 1983). Por este motivo, aunque la corticosterona representa una de las medidas más utilizadas en el estudio de respuesta endocrina al estrés, sólo sería adecuada para el estudio de estímulos de intensidad baja-moderada.

En paralelo a la rápida liberación de la reserva disponible de CRF y otros factores en la eminencia media, y la consecuente liberación de ACTH por parte de la adenohipófisis, se da una **activación transcripcional** dirigida a la restauración de la reserva de CRF. En el caso de la exposición a un estímulo estresante de intensidad moderada como la inmovilización en tubo o la inyección intra-peritoneal de vehículo, se observa inicialmente un incremento en los niveles del transcrito primario (**RNA heteronuclear, hnRNA**) del gen de CRF con un máximo a los 15-30 min del inicio del estrés (Herman, 1992; Kovács y Sawchenko, 1996; Ma y Aguilera, 1999). Con estímulos predominantemente emocionales como la inmovilización, los niveles del hnRNA para CRF van disminuyendo progresivamente a pesar de la persistencia del estímulo (Shepard *et al.*, 2005; Trnecková *et al.*, 2007). Sin embargo, la exposición a la hipovolemia inducida por coloides es capaz de mantener niveles elevados de transcripción de CRF incluso a las 6 horas (Tanimura *et al.*, 1998). De manera análoga a lo que como ocurre con el hnRNA de CRF, la liberación de ACTH en respuesta al estrés sostenido alcanza un máximo entre los 10-30 min, para ir disminuyendo progresivamente hasta alcanzar niveles próximos a los basales a pesar de la persistencia del estímulo (Hauger *et al.*, 1988; Rivier y Vale, 1987).

Los mecanismos que median en la disminución progresiva de la respuesta del eje HPA frente a algunos estímulos estresantes sostenidos no están bien establecidos. En el caso del hnRNA de CRF, numerosos estudios han apuntado como posible responsable a la retro-inhibición por glucocorticoides (Yao y Denver, 2007). No obstante, el conjunto de datos parece indicar que el incremento puntual en los niveles de glucocorticoides posterior al inicio del estímulo estresante no juega un papel crucial en el descenso de la tasa transcripcional del gen de CRF (Ma y Aguilera, 1999). Debido a que los glucocorticoides no pueden explicar por sí solos este descenso, otros trabajos han propuesto la existencia de un mecanismo de retro-alimentación intracelular donde el represor temprano inducible por cAMP (ICER) podría jugar un papel relevante (Shepard *et*

al., 2005; Yao y Denver, 2007; Liu y Aguilera, 2009). ICER es una proteína que parece mediar en la represión transcripcional de numerosos sistemas neuroendocrinos, actuando como inhibidor competitivo de la transcripción dependiente del elemento de respuesta a AMPc (CRE) cuyo modulador positivo es la proteína de unión a CRE fosforilada (p-CREB) (Foulkes *et al.*, 1996; Monaco *et al.*, 1997).

En lo que respecta a la disminución paulatina en los niveles plasmáticos de ACTH, no parece que la disminución de la expresión de CRF tenga una importancia crucial, ya que existe una cantidad notable de mRNA que varía poco tras la exposición al estímulo estresante (Watts, 2005; Kovács y Sawchenko, 1996). Por lo tanto, esta disminución podría deberse en parte a la retroinhibición mediada por glucocorticoides y también a una incapacidad de la adenohipófisis de mantener la secreción sostenida de ACTH (Rivier y Vale, 1987; Martí *et al.*, 1999), ya sea por una limitación en la capacidad de respuesta al CRF en situaciones estresantes de elevada intensidad o por una disminución temporal de la reserva disponible de ACTH.

Así como la liberación de CRF y la consecuente elevación de los niveles plasmáticos de ACTH y glucocorticoides son eventos cruciales de la respuesta de estrés necesarios para el mantenimiento de la homeostasis, de igual relevancia son los mecanismos que limitan esta respuesta sobre todo en una situación de estrés crónico, ya que una elevación sostenida de glucocorticoides, o una liberación excesiva de CRF en el SNC, puede favorecer la aparición de depresión, inmunosupresión o síndrome metabólico.

Mecanismos de integración del estrés

Procesamiento de los estímulos estresantes

Los **estímulos sistémicos** representan una amenaza real para la homeostasis del organismo y requieren una activación rápida y directa del PVN. Por esto, las áreas relacionadas con la respuesta a estímulos sistémicos están en su mayoría directamente conectadas con el PVN. En general, la mayoría de neuronas que proyectan directamente al PVN se localizan en regiones que reciben proyección de primer o segundo orden desde nociceptores somáticos, aferencias viscerales o vías humorales mediante aferencias predominantemente noradrenérgicas y adrenérgicas. Además el PVN recibe proyecciones directas de los órganos circunventriculares, caracterizados por carecer de barrera hematoencefálica, que se encargan de proporcionar la información sobre la presión osmótica, el balance de electrolitos y los niveles circulantes de algunas hormonas (Herman *et al.*, 2003; Jankord y Herman, 2008). Estas neuronas representan la vía excitadora principal, directa del eje HPA. Sin embargo, esta respuesta tiene un coste energético y no puede usarse en vano sin consecuencias nocivas (revisión en McEwen, 1998). Por este motivo, el SNC tiene mecanismos de regulación que adecuan la respuesta del eje HPA.

Esta modulación de la respuesta, por estructuras superiores del SNC es muy evidente cuando el organismo se enfrenta a estímulos de tipo emocional. En este caso, se generan patrones excitadores o inhibidores dependientes de procesos de aprendizaje y memoria que son capaces de modular la respuesta al estrés. Por ejemplo, se puede disminuir la respuesta a un ambiente nuevo con una exposición repetida (habituaación), o se puede activar la respuesta frente a estímulos inocuos si han sido previamente asociados a estímulos estresantes (condicionamiento clásico).

El control sobre este espectro de respuestas lo tiene el **sistema límbico**, principalmente mPFC, la FH, la amígdala y el septum lateral (LS) (revisión en Herman *et al.*, 2003, 2005; Jankord y Her-

man, 2008). Estas estructuras no proyectan directamente al PVN, sino que requieren de núcleos intermedios en muchos casos constituidos por neuronas GABAérgicas.

Proyecciones directas al PVN

De entre todas las proyecciones directas al PVN (**Fig. 3**), las provenientes del **núcleo del tracto solitario (NTS)**, que inervan preferentemente el mpdPVN, están relacionadas con información somatosensorial, visceral o humoral y representan la vía excitadora principal y directa del eje HPA mediante aferencias predominantemente noradrenérgicas y adrenérgicas. El NTS, también resulta activado por estímulos de naturaleza mixta como la restricción de movimientos, el nado forzado o la inmovilización (Cullinan *et al.*, 1995; revisión en Sawchenko *et al.*, 2000), lo que sugiere que también podría participar en la integración de la respuesta a los estímulos emocionales, aunque jugando un papel secundario en lo referente a la activación del eje HPA.

Aunque en menor número, el PVN también recibe proyecciones serotoninérgicas en su mayoría procedentes del **rafe dorsal y medial (DR, MnR)**; Sawchenko *et al.*, 1983). La mayoría de estudios apuntan a un papel estimulador de la serotonina (5-HT) en la secreción de ACTH y corticosterona probablemente debido a una interacción con neuronas GABAérgicas presentes en regiones adyacentes al PVN. Además de sus acciones directas sobre el PVN, la 5-HT inerva estructuras como la FH, el PFC, el LS, amígdala y el hipotálamo (revisión en Lowry, 2002), razón por la cual la 5-HT podría modular la actividad del eje HPA a través de estas áreas de integración de la respuesta al estrés. La información asociada a funciones autónomas llega al PVN desde otras áreas mesencefálicas no serotoninérgicas, incluyendo el núcleo parabraquial y la sustancia gris periacueductal (PAG) (Saper, 1995).

Numerosas **regiones hipotalámicas cercanas al PVN** emiten proyecciones de tipo mayoritariamente GABAérgico a este núcleo (Boudaba *et al.*, 1996; Roland y Sawchenko, 1993) de modo que su activación puede traducirse en inhibición del eje HPA (Cole y Sawchenko, 2002). La región mpPVN también está inervada por neuronas GABAérgicas situadas en el **núcleo dorso-medial del hipotálamo (DM)**, aunque este núcleo también dispone de poblaciones glutamatérgicas (Ziegler *et al.*, 2002), de modo que podría estar implicado tanto en la inhibición como en la activación de las neuronas parvocelulares del PVN, dependiendo del estímulo concreto y del tipo neuronal activado. Otra región que inerva directamente el PVN es el **área preóptica medial (mPOA)** que, al igual que el DM, también dispone de poblaciones GABAérgicas y glutamatérgicas. Esta área podría actuar como intermediaria en los efectos que los esteroides gonadales ejercen sobre el eje HPA.

La información relativa al balance energético puede transmitirse directamente al PVN a través del **núcleo arqueado (Arc)** y del **hipotálamo lateral (LH)**. Las neuronas del arqueado son sensibles a los niveles circulantes de glucosa, leptina e insulina (revisión en Woods *et al.*, 1998). Los distintos neuropéptidos residentes en el núcleo arqueado tienen papeles complementarios en la ingesta de comida: el neuropéptido Y (NPY) promueve la ingesta mientras que los péptidos de la familia de la POMC tienen efectos anoréxicos. Existen otras regiones hipotalámicas capaces de interactuar con el PVN. De entre estas, destacaremos el **núcleo supraquiasmático (SCN)**, principal regulador del ritmo circadiano del eje HPA (Moore y Speh, 1993), que proyecta a regiones hipotalámicas GABAérgicas como la región peri-PVN o el DM, que a su vez, inervan directamente el PVN (Armstrong, 1995).

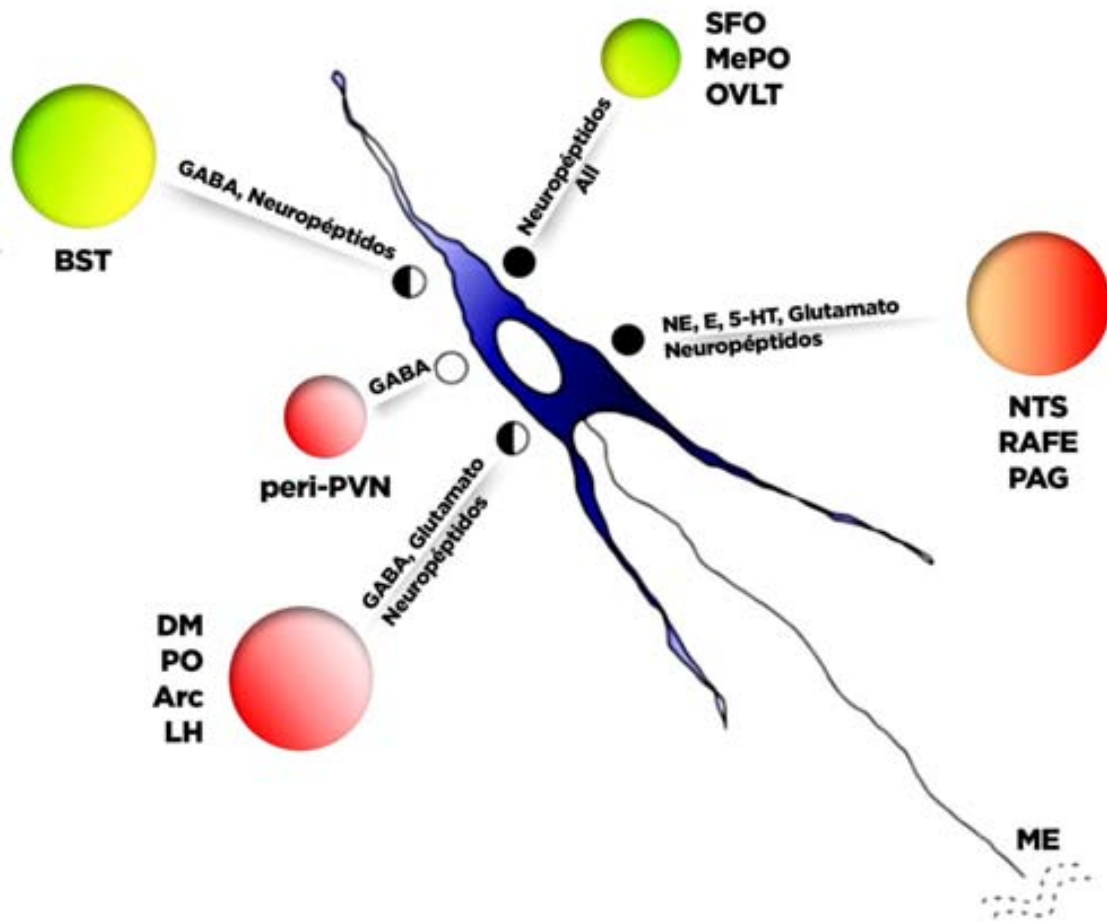


Figura 3. Principales proyecciones directas hacia las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo.

Los círculos *negros* indican la naturaleza *activadora* de las proyecciones, los círculos *blancos* indican la naturaleza *inhibidora* de las proyecciones. *ME*: eminencia media.

Adaptado de Herman et al., 2003.

La mayoría de proyecciones telencefálicas directas al PVN proceden del **BST** (Cullinan *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 2003), concretamente de los subnúcleos intrafascicular, transversal y anterodorsal, los cuales contienen principalmente neuronas GABAérgicas, y también de la región ventrolateral y el núcleo fusiforme. Los efectos del BST sobre el PVN parecen ser fundamentalmente inhibitorios, actuando como vía de relevo de la información proveniente de la CeA hacia el PVN. Sin embargo la actividad del eje HPA parece depender del área concreta estimulada dentro del BST (Choi *et al.*, 2007; Herman *et al.*, 1994). De esta manera, lesiones en la región posterior del BST, incluyendo los subnúcleos intrafascicular y transversal, incrementan la expresión del mRNA de CRF en el PVN concordando con un papel inhibitorio sobre la regulación del eje HPA (Herman *et al.*, 1994). En contraste, lesiones del BST anterior, incluyendo los subnúcleos anterodorsal y fusiforme, provocan un descenso en la expresión del mRNA de CRF apoyando un papel excitatorio de estas regiones sobre la actividad HPA (Gray *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 1994). Cabe destacar la presencia de neuronas de CRF en algunas subdivisiones del BST (Ju *et al.*, 1989). Se ha sugerido que estas neuronas podrían tener un papel en la modulación

positiva de la respuesta del PVN al estrés (Parkes *et al.*, 1993), aunque el conjunto de datos disponibles sugieren más bien un papel inhibitorio para el CRF. El resto de proyecciones de CRF que inervan el PVN, pueden proceder de otras áreas hipotalámicas (Champagne *et al.*, 1998), sin descartar conexiones axo-dendríticas entre neuronas de CRF dentro del mismo PVN (revisión en Liposits *et al.*, 1985).

Finalmente, también proyectan directamente al PVN algunas regiones del tálamo, como las regiones **subparafascicular** e **intralaminar posterior**, que están implicadas en la activación del eje HPA por estímulos estresantes auditivos (Campeau y Watson, 2000) o la **zona incerta del hipotálamo**, un área rica en neuronas dopaminérgicas (Wagner *et al.*, 1995; Cheung *et al.*, 1998). Diversos trabajos sugieren que la dopamina activa el eje HPA (Borowsky y Kuhn, 1992; 1993; Fuertes *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la dopamina ejerce un papel estimulador en la activación del eje HPA en respuesta a la IMO al haber observado una reducción de la respuesta tras el bloqueo de los receptores D1 y D2 (Belda y Armario, 2009). Sin embargo, se desconoce si la dopamina ejerce sus efectos por acción directa en el PVN (posiblemente por proyecciones desde la zona incerta) o actúa indirectamente a través de su acción sobre vías superiores.

Proyecciones indirectas al PVN

El PVN está indirectamente interconectado con diversas estructuras (**Fig. 4**). Entre ellas, las relacionadas con el sistema límbico son de crucial importancia para la regulación de la respuesta emocional y la memoria. El **mPFC**, la **FH**, la **amígdala** y el **LS** son las principales estructuras relacionadas con el control del eje HPA frente a estímulos emocionales (revisión en Herman *et al.*, 2005; Jankord y Herman, 2008). Estas estructuras no proyectan directamente al PVN, sino que requieren de núcleos intermedios en muchos casos constituidos por neuronas GABAérgicas. Los principales núcleos de relevo de la información son el BST, el área preóptica (POA), el DM, el Arc, el LH y la zona peri-PVN.

La **FH** es una estructura que ejerce un efecto principalmente inhibitorio sobre el PVN. Por su gran densidad de receptores de glucocorticoides (Herman, 1989; Reul y De Kloet, 1986) se le ha relacionado con la retroinhibición de la respuesta del eje HPA mediada por los glucocorticoides (revisiones en Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman y Cullinan, 1997). Varios laboratorios han constatado que lesiones en la FH prolongan la secreción de ACTH y/o corticosterona tras la exposición a estímulos estresantes como la restricción de movimientos, el paradigma del condicionamiento del miedo a un contexto (medido mediante *freezing*), la estimulación acústica o la exposición a un ambiente nuevo como el campo abierto (revisión en Herman *et al.*, 2005). Por otro lado, las mismas lesiones no tienen efecto sobre la respuesta del eje HPA tras la exposición a éter o a hipoxia, indicando que la implicación de la FH en la modulación de la actividad del eje HPA depende del estímulo estresante.

La regulación por la FH de la respuesta del eje HPA está controlada en gran parte por el **subículo ventral (vSUB)**. La estimulación del vSUB produce inhibición de la actividad HPA (Casady y Taylor, 1976) y una lesión en esta área incrementa la respuesta del eje HPA frente a estímulos emocionales como el campo abierto, sin afectar ni a los niveles basales del eje ni a la respuesta delante de estímulos puramente físicos como la inhalación de éter (Herman *et al.*, 1998). El vSUB es la vía de salida de la información de la FH hacia el hipotálamo y utiliza señales estimuladoras (glutamatérgicas) que hacen sinapsis en neuronas GABAérgicas del BST, el POA (subdivisión medial) y otras estructuras hipotalámicas como la región peri-PVN, donde predominan las neu-

ronas GABAérgicas. En conjunto, todos los datos son consistentes con un papel inhibitor del vSUB en las respuestas de estrés anticipatorias. La FH podría ejercer su control sobre el PVN también a través de conexiones multi-sinápticas. Por ejemplo, el LS recibe mucha inervación procedente de la FH, mientras que él mismo proyecta a la región peri-PVN y otros núcleos hipotalámicos conectados directamente con el PVN (revisión en Herman *et al.*, 2003). Numerosos estudios usando lesiones y trazadores muestran que el efecto inhibitor de la FH sobre el PVN es ejercida fundamentalmente a través del BST (Forray y Gysling, 2004).

Otra estructura a la que también se le ha adjudicado un papel inhibitor sobre el PVN es el **mPFC**, especialmente la región ventromedial (vmPFC) que incluye las subdivisiones **prelímica (PrL)** e **infralímica (IL)**. Como la FH, al mPFC se le ha relacionado con la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides en respuesta a estrés emocional. La implantación de corticosterona en el mPFC de ratas adrenalectomizadas es capaz de reducir los niveles de ACTH en respuesta a la inmovilización en tubo (“*restraint*”) (Akana *et al.*, 2001). Así mismo, la infusión de dexametasona en esta región es capaz de reducir la actividad del eje HPA (Mizoguchi *et al.*, 2003). Del mismo modo que el vSUB, el papel de la subdivisión PrL parece ser específica de estímulo. La lesión de la corteza PrL produce un aumento de la respuesta del eje HPA a los estímulos emocionales, sin afectar a los sistémicos (Diorio *et al.* 1993; Figueiredo *et al.*, 2003; McDougall, 2004; Radley *et al.*, 2009). El papel del IL parece más complejo. La lesión electrolítica del IL provoca un incremento en la secreción de ACTH y de la activación del PVN (medida mediante *c-Fos*) tras la administración de interleuquina-1 β pero no tras la exposición al *restraint*, sugiriendo un papel en la inhibición de la respuesta frente a estímulos sistémicos (Crane *et al.*, 2003). Sin embargo, la lesión del IL mediante la infusión de ácido iboténico reduce la expresión de *c-fos* en el PVN, sugiriendo que esta región podría jugar un papel potenciador de la respuesta del eje HPA frente a estímulos emocionales (Radley *et al.*, 2006). La lesión de la mPFC no afecta nunca a los niveles basales del eje HPA (Diorio *et al.* 1993; Figueiredo *et al.*, 2003), indicando que el mPFC modula selectivamente la actividad del eje HPA en respuesta a estímulos estresantes.

La mPFC no tiene sinapsis directas con el PVN sino que interactúa con numerosas áreas para ejercer su control inhibitor sobre el PVN. Así, la PrL envía sus proyecciones glutamatérgicas al BST, que a su vez, mediante proyecciones GABAérgicas inhibirá al PVN (Radley *et al.*, 2009), al complejo basolateral de la amígdala (BLA) y el núcleo paraventricular del tálamo (PVA). Esta vía de procesamiento con origen en la PrL se ha visto especialmente activada delante de estímulos estresantes de tipo emocional. La IL también proyecta directamente al BST, a la CeA y al NTS, a través de las cuales ejerce seguramente su papel inhibitor (Herman *et al.*, 2005; revisión en Jankord y Herman, 2008). A su vez, el mPFC recibe aferencias procedentes de otras áreas que participan en el control de la respuesta al estrés, como el locus coeruleus (LC) o la FH con efectos sobre procesos como la atención y la memoria explícita.

A diferencia de lo que ocurre con la FH y el PFC, la **amígdala** parece activar el eje HPA (revisión en Herman *et al.*, 2005). La amígdala está compuesta por distintos subnúcleos, entre ellos la **CeA**, la **MeA** y la **BLA**. Aunque todos ellos pueden participar en la activación del eje HPA hay especificidades en función del estímulo presentado. La CeA está relacionada con la respuesta a estímulos sistémicos (revisión en Herman y Cullinan, 1997; Sawchenko *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001) y presenta conexiones con estructuras del tronco que proyectan directamente al PVN, como el NTS y el núcleo parabraquial (revisión en Alheid, 2003; McDonald, 2003). También hay pruebas de su conexión con el BST donde, mediante proyecciones de tipo GABAérgico, activa-

ría, por desinhibición, el eje HPA, al inhibir las neuronas GABAérgicas del BST que proyectan al PVN (revisión en Herman *et al.*, 2003).

Por otro lado, la MeA estaría implicada en la integración de los estímulos de tipo emocional (Cullinan *et al.*, 1995; Dayas *et al.*, 1999; 2001; 2002), con una extensa red de conexiones con áreas de proyección directa al PVN como el BST, el área preóptica medial (MePO), el hipotálamo anterior y la zona peri-PVN (revisión en Alheid, 2003; McDonald, 2003). Las proyecciones hacia estas áreas son de tipo GABAérgico, de tal modo que la activación de la MeA daría lugar también a una activación del PVN por desinhibición, como ocurre con la CeA, aunque por distintos circuitos (revisión en Herman *et al.*, 2003). Por último, la BLA se activa frente a estímulos de tipo emocional (Cullinan *et al.*, 1995) aunque proyecta principalmente a otros núcleos de la amígdala como la CeA y la MeA (Jankord y Herman, 2008). Por este motivo, se especula sobre un papel complejo de la BLA en la regulación de la actividad del eje HPA, ejerciendo sus efectos a través de otros núcleos de la amígdala (Jankord y Herman, 2008). Aunque no tenga un papel claro en el control de la actividad del eje HPA, el complejo BLA juega un papel clave en los efectos de los glucocorticoides sobre la memoria, especialmente la de tipo emocional (Rozenaal, 2000), así como en la adquisición del condicionamiento al miedo frente a estímulos auditivos y

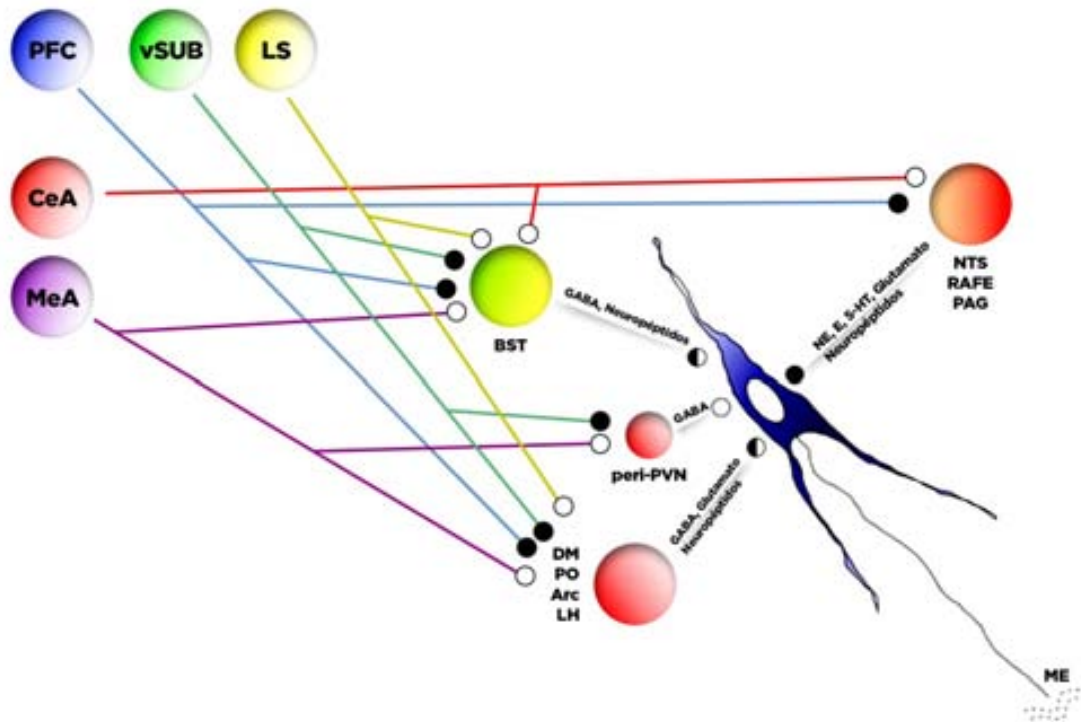


Figura 4. **Principales proyecciones indirectas hacia las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo.**

Los círculos *negros* indican la naturaleza *activadora* de las proyecciones, los círculos *blancos* indican la naturaleza *inhibidora* de las proyecciones.

Adaptado de Herman et al., 2003.

al contexto (LeDoux *et al.*, 1990; Phillips and LeDoux, 1992; Wilensky *et al.*, 1999).

Las neuronas del LS resultan claramente activadas por estímulos estresantes emocionales, como los ambientes nuevos, la exposición a un depredador o la interacción social, mostrando una

menor activación con estímulos de tipo sistémico (revisiones en Herman *et al.*, 2003; Armario 2006). La mayoría de estas neuronas son GABAérgicas (revisión en Risold y Swanson, 1997b) y proyectan a la región peri-PVN, al hipotálamo anterior, PO y el LH (revisión en Risold y Swanson, 1997a), regiones que proyectan directamente al PVN (revisión en Herman *et al.*, 2003). El LS ejerce una influencia inhibitoria sobre estas áreas y queda en una posición excelente para regular tanto la activación como la inhibición del PVN. De hecho, los datos experimentales apoyan un papel más bien inhibitorio dado que tanto la lesión electrolítica como excitocitotóxica del LS potencia la respuesta neuroendocrina del eje HPA en respuesta a estrés moderado sin afectar los niveles basales hormonales (revisión en Herman *et al.*, 2003; Singewald *et al.*, 2011).

Estudios más recientes, sugieren que el LS estaría implicado en un mecanismo de inhibición del eje HPA mediado en parte por receptores septales 5-HT_{1A} sin participación del *feedback* negativo mediado por glucocorticoides (Singewald *et al.*, 2011). Este hecho viene corroborado por la densa inervación del LS desde el DR y por la elevada expresión de receptores 5-HT_{1A} (Köhler *et al.*, 1982; Lanfumey and Hamon, 2000). El propio CRF podría modular la liberación de 5-HT en las regiones terminales a través de sus efectos a nivel del DR, apoyando una potencial interacción entre el CRF y la 5-HT en las patologías asociadas al estrés, en las cuales ambos sistemas estarían implicados (Price y Lucki, 2001).

Estudios recientes han relacionado diversos **núcleos del tálamo** con la regulación del eje HPA. En varios núcleos de la línea media del tálamo se observa una fuerte inducción de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes de tipo emocional (Cullinan *et al.*, 1995; Emmert y Herman, 1999; Bubser y Deutch, 1999). De entre estas regiones cabe destacar el **PVA** que podría jugar un papel importante en la integración de la respuesta del eje HPA a estímulos repetidos diariamente. Tras dicha exposición, se ha observado un fenómeno conocido como facilitación, en el que la respuesta a un estímulo estresante nuevo (heterotípico) se ve potenciada en aquellos animales que han sido estresados previamente (Bhatnagar y Dallman, 1998). Tras un régimen de estrés repetido, el PVA se encuentra entre las pocas áreas que se activan selectivamente por estímulos heterotípicos, por lo que podría estar implicado en la facilitación del eje HPA. El PVA recibe numerosas proyecciones desde áreas sensibles al estrés como el vSUB, mPFC, BST, NTS, Rafe, núcleo parabraquial y LC y, a su vez, inerva regiones como el mPFC, la BLA y la CeA, capaces de modular la actividad del eje HPA (revisión en Herman *et al.*, 2003).

Vías centrales de integración del estrés

Los datos disponibles en la literatura nos sugieren que los circuitos nerviosos que se activan frente a un estímulo dependen de las características concretas de este estímulo. Como ya comentamos anteriormente, la idea más extendida propone una dicotomía entre la respuesta a estímulos emocionales y la respuesta a estímulos sistémicos (Kovács *et al.*, 2005). Mientras que todos los estímulos comparten la habilidad para activar ciertas poblaciones neuronales efectoras en el PVN y en los núcleos catecolaminérgicos del tronco, **los circuitos donde se procesan los estímulos sistémicos y emocionales son muy distintos**. Aunque cada estímulo presenta un patrón de respuesta particular, tienen características comunes de las que nos valemos para dividir los estímulos según encajen mejor en una categoría u otra.

En general, las vías límbicas serían más sensibles a los estímulos emocionales, que requieren un procesamiento en estructuras superiores del SNC (revisión en Herman y Cullinan, 1997). En cambio, estímulos estresantes sistémicos como los originados por alteraciones respiratorias, cardiovasculares e inmunes pueden estimular directamente el PVN a través del tronco encefálico, sin nece-

sidad de un procesamiento cognitivo superior (revisión en Sawchenko *et al.*, 1996). Un estudio realizado por Sawchenko y colaboradores (Li *et al.*, 1996) es el que mejor ilustra esta idea, demostrando que las vías ascendentes del tronco son necesarias para la activación del PVN por interleuquina-1-beta (IL-1 β), pero no afectan a la inducción de *c-fos* en este núcleo tras el choque eléctrico en las patas. Por el contrario, la activación del PVN por estímulos de tipo emocional no requiere señales procedentes del tronco encefálico y la activación del NTS parece ser secundaria a la activación de áreas superiores del SNC.

Los efectos de los estímulos sistémicos sobre el PVN se pueden concebir esencialmente como simples reflejos, mediados a nivel subcortical a través del sistema de procesamiento de la información sensorial visceral. La respuesta a los estímulos sistémicos viene mediada por áreas bien definidas, con activación de circuitos diencefálicos y del tronco encefálico y acción directa sobre las neuronas efectoras de la respuesta al estrés, sin una contribución cortical o límbica significativa (revisión en Sawchenko *et al.*, 1996, Kovács *et al.*, 2005). Los **órganos circunventriculares**, que se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica, proyectan directamente al PVN transmitiendo información de señales o cambios presentes en el plasma sanguíneo, como la osmolaridad, mediadores inmunitarios o la presencia de determinadas hormonas como la angiotensina II o la insulina. La información referente a la presión y el volumen sanguíneo llega al NTS a través de las vías vegetativas y desde allí, proyecciones catecolaminérgicas la transmiten a las neuronas neurosecretoras del hipotálamo.

Cualquier alteración de estos sistemas homeostáticos básicos genera reflejos neuroendocrinos relativamente simples, con activación directa de las neuronas neurosecretoras del PVN iniciando la respuesta hormonal al estrés. Además de la respuesta neuroendocrina, también se pone en marcha una respuesta adaptativa del SNA, con cambios cardiovasculares y respiratorios y activación simpático-adrenal. Por sus características particulares, los estímulos de tipo sistémico activan un número restringido de poblaciones y circuitos neuronales, resultando en un perfil más o menos singular (revisión en Kovacs, 1998; Pacak y Palkovits, 2001). Por ejemplo, se activan neuronas medulares catecolaminérgicas en respuesta a la hemorragia (Chan y Sawchenko, 1994), el lipopolisacárido bacteriano (LPS, Wan *et al.*, 1993), la IL-1 β (Ericsson *et al.*, 1994) y el dolor (Palkovits *et al.*, 1995), y neuronas osmosensibles de la lamina terminalis tras la administración de soluciones hipertónicas (Kovács y Sawchenko, 1993).

Los estímulos emocionales son registrados e iniciados mediante mecanismos somatosensoriales complejos y procesados a través de circuitos cerebrales superiores (revisión en Herman y Cullinan, 1997; Kovács *et al.*, 2005). La información somatosensorial no activa directamente las neuronas neurosecretoras del PVN, sino que requiere un procesamiento en áreas extra-hipotalámicas, que modulan la respuesta al estrés a través de las poblaciones GABAérgicas y glutamatérgicas en la región peri-PVN y en otras áreas con proyección directa al PVN. La mayoría de estímulos emocionales presentan un patrón común, que incluye las neuronas efectoras en el PVN y aquellas áreas implicadas en el control de la actividad del eje HPA como la PFC, el LS, el BST, la amígdala, el DR y el LC (revisión en Cullinan *et al.*, 1995; Larsen y Mikkelsen, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Campeau y Watson, 1997; Kollack-Walker *et al.*, 1997).

Además de la respuesta neuroendocrina, los estímulos emocionales también generan respuestas mediadas por el SNA con cambios cardiovasculares, respiratorios y gastrointestinales. Estas dos categorías de estímulos estresantes no se excluyen mutuamente y cada estímulo en particular debe analizarse en toda su complejidad. Por ejemplo, estímulos emocionales como la inmovilización o el choque eléctrico en las patas, pueden causar dolor e iniciar determinadas respuestas

reflejas, típicas de los estímulos sistémicos. Por otro lado, estímulos sistémicos como los de tipo inmune pueden venir acompañados de malestar que afectarían al comportamiento del animal, implicando áreas corticales y límbicas (Armario *et al.*, 2006).

Genes de expresión temprana: *c-fos*

Los **genes de expresión temprana (IEG)** son genes que se activan rápida y temporalmente sin necesidad de síntesis previa de proteínas. Codifican para muchos productos funcionalmente distintos (Nedivi *et al.*, 1993), de manera que podríamos clasificarlos fundamentalmente en dos grupos; (1) **genes que codifican para factores de transcripción** (ITF de sus siglas en inglés “inducible transcription factors”), que influirían indirectamente en la fisiología celular activando o reprimiendo la expresión de otros genes, como por ejemplo: *c-fos*, *c-jun* y *zif268*, y (2) **genes que codifican para proteínas efectoras**, como proteínas de secreción, proteínas de citoesqueleto y subunidades de receptores, que cumplen un papel directo en los cambios en la eficacia o en la conectividad sináptica, como por ejemplo: *Arc*, *Cox-2* y *Rheb*.

El gen *Arc* codifica para una proteína de distribución fundamentalmente telencefálica que está asociada a la actina y que está involucrada en procesos de plasticidad sináptica. El gen *Cox-2* codifica para la ciclooxigenasa, que es la enzima que permite al organismo producir las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico y está involucrada en procesos inflamatorios. *Rheb* es un gen de la superfamilia Ras que codifica para una proteína implicada en plasticidad neuronal. La rápida inducción de los IEG se explica por la presencia de factores de transcripción constitutivos preexistentes en la célula quiescente o no estimulada que se activan en respuesta a determinadas señales (revisión en Herdegen y Leah, 1998).

Uno de los ITF mejor caracterizados es el **proto-oncogen viral *c-fos*** (Sheng y Greenberg, 1990) que, por sus características, resulta una herramienta muy valiosa en el estudio de la activación del SNC frente a diferentes estímulos. El gen viral “*fos*” fue aislado en 1982 como el oncogen del virus del osteosarcoma de ratón Finkel-Biskis-Jiskins (FBJ-MSV) y poco después se describió su homólogo celular, *c-fos* (revisión en Herdegen y Leah, 1998). La proteína codificada por este gen dimeriza con proteínas de la familia **c-Jun**, formando el complejo de transcripción de la **proteína activadora 1 (AP-1)**, el cual participa en la regulación de la expresión de multitud de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos que cuentan con un sitio de unión AP-1 en su promotor (revisión en Herdegen y Leah, 1998). Su expresión puede inducirse por multitud de factores, entre ellos, factores neurotróficos, neurotransmisores, despolarización e incrementos de Ca²⁺ intracelular (Herrera y Robertson, 1996; Herdegen y Leah, 1998).

El gen de *c-fos* tiene un promotor complejo, sensible a la acción de diferentes cascadas de segundos mensajeros, que terminan convergiendo y regulando su expresión (Ginty *et al.*, 1994). La regulación fisiológica de este gen requiere del funcionamiento interdependiente de varios elementos presentes en su región reguladora, como son el elemento de respuesta al suero (SRE), el sitio de unión a AP-1 (AP-1RE), y el elemento de respuesta a Ca²⁺/cAMP (Ca²⁺/CRE) (Kovács *et al.*, 1998). Su actividad también está regulada a nivel post-transcripcional mediante la degradación del mRNA, cuya vida media se sitúa entre los 10 y los 15 min (Shyu *et al.*, 1989; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002). La deacetilación de histonas asociadas al gen parece tener un papel principal en este proceso (Greenberg *et al.*, 1990).

Aunque algunos trabajos han detectado incrementos significativos en los niveles del mRNA a los 5-10 min de iniciada la inmovilización en el mpPVN (Imaki *et al.*, 1996; Umemoto *et al.*,

1997), incrementos más consistentes se han observado a los 30 min de la aplicación del estímulo estresante cuando éste persiste durante este tiempo (Imaki *et al.*, 1992, 1995b, 1996; Cullinan *et al.*, 1995; Kovács y Sawchenko, 1996; Umemoto *et al.*, 1997; Armario, 2006a; Trnecková *et al.*, 2007). Así mismo, la vida media de la proteína es muy corta, situándose el nivel máximo entre 90 y 120 minutos (revisión en Jariel-Encontre *et al.*, 1997), para desaparecer gradualmente del núcleo neuronal entre las 4 y 6 horas después de una estimulación puntual en el tiempo (Kovács, 1998). Esta degradación parece depender del área particular del SNC que se observe (Chowdhury *et al.*, 2000) y ocurre cuando la síntesis ha terminado y la mayoría de moléculas de c-Fos (el 90%) están asociadas a proteínas Jun (Kovary y Bravo, 1991a, 1991b) pues la formación de los dímeros c-Jun:c-Fos promueve la degradación de c-Fos (Papavassiliou *et al.*, 1992). La ruta de degradación de c-fos más importante está mediada por el proteasoma y es dependiente de ubiquitinación, aunque recientemente se ha demostrado que también existen procesos de degradación que no requieren este paso (Gomard *et al.*, 2008).

Debido a la rápida síntesis de c-Fos y al retraso en el incremento de c-Jun, existe una ventana libre de c-Jun tras la estimulación durante la cual c-Fos puede formar heterodímeros con GR y otros factores de transcripción (ATF-4, ATF-2, CBP, p65) influenciando la expresión génica en el periodo inmediatamente posterior a la activación celular (revisión en Herdegen y Leah, 1998). Además existen varias combinaciones entre las familias fos y jun, de tal modo que los complejos c-Fos/c-Jun activarían la expresión génica mientras que el complejo c-Fos/Jun B parece ser inhibidor (Sheng y Greenberg, 1990). Estas interacciones reflejan los cambios transcripcionales complejos que tienen lugar en la neurona una vez activada.

c-fos como marcador de activación neuronal

La rápida inducción de c-fos tras la exposición a diferentes estímulos, junto con su débil expresión en condiciones basales (Kovács, 1998; Armario, 2006a), lo convierte en una herramienta muy valiosa en el estudio de la activación del SNC frente a estímulos estresantes, habiendo contribuido enormemente a nuestro conocimiento de cómo el SNC responde y procesa la información concerniente a estos estímulos (Imaki *et al.*, 1995a; Kovács, 1998; Sawchenko *et al.*, 2000; Hoffman y Lyo, 2002). No obstante, debe tenerse en cuenta que c-fos no puede considerarse como un marcador universal de activación neuronal. Por ejemplo, Luckman *et al.* (1994), han descrito que un agonista colinérgico (carbacol) induce la expresión de c-fos en neuronas magnocelulares del núcleo supra-óptico, mientras que la activación electrofisiológica antidrómica de las mismas neuronas no provoca un incremento en los niveles de expresión, lo que sugiere que la inducción de c-fos precisa de la acción conjunta de cambios en las vías de transducción de señales y de procesos de despolarización. Por otro lado, neuronas tónicamente activas, como las que regulan la secreción de prolactina desde el área tuberoinfundibular del hipotálamo, no muestran inducción de c-fos, quizá porque la activación tónica no supone expresión de este gen. Por consiguiente, no podemos descartar o tener la seguridad de la participación de un área en concreto en un proceso determinado por la ausencia o presencia de expresión de c-fos, respectivamente.

Aunque no se han encontrado alternativas, una posible solución es usar otros IEG con patrones de expresión que podrían ser complementarios (Chan *et al.*, 1993; Herdegen y Zimmermann, 1995; revisión en Senba y Ueyama, 1997). Otra limitación es consecuencia de la dinámica de expresión de c-fos, que si bien es ideal para estudiar la activación por estímulos agudos de corta duración (de minutos a pocas horas), resulta un inconveniente con estímulos prolongados. Esto

se debe a que tras un periodo limitado de tiempo, que depende del tipo de estímulo, tanto el mRNA como la proteína vuelven progresivamente a sus niveles basales. Este fenómeno es muy común con estímulos emocionales de elevada intensidad como la IMO o la restricción de movimientos (Imaki *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1994; Umemoto *et al.*, 1997; Trneckova *et al.*, 2007), pero con estímulos de tipo sistémico como la administración de endotoxina (Rivest y Laflamme, 1995) o la hipovolemia inducida por coloides (Tanimura y Watts, 2000), se pueden observar niveles sostenidos (3 a 6 h) de expresión de *c-fos* en el PVN. Debido a la corta vida media de *c-fos*, se empiezan a usar otros IEG con una vida media más larga, como Δ -FosB, el cual se mantiene estable en el rango de días. Esta estabilidad contribuye a la acumulación potencial de esta isoforma tras la estimulación repetida y puede servir para identificar neuronas que sufren cambios tardíos y a largo plazo, lo que resulta de gran interés en el estudio de los efectos del estrés crónico (Perotti *et al.*, 2004). Así mismo, este IEG puede controlar la transcripción de diferentes grupos de proteínas reguladoras, diferentes en parte de los controlados por *c-fos* (Al-Noori *et al.*, 2008).

Otra limitación de la utilización de *c-fos* como marcador de activación neuronal es que no es posible identificar la naturaleza de las neuronas activadas. De manera que, cuestiones básicas como el hecho de determinar si se trata de neuronas glutamatérgicas activadoras o GABAérgicas inhibitoras quedan sin responder. La combinación de la detección de *c-fos* con otros marcadores puede aportar información adicional, como determinar el neurotransmisor que expresan las neuronas activadas (Ceccatelli *et al.*, 1989). Así mismo, la detección de *c-fos* junto con el uso de retro-trazadores, puede ayudar a identificar las vías implicadas en la activación de un determinado grupo neuronal (Menetrey *et al.*, 1989).

A pesar de la gran cantidad de información acumulada en estudios cartográficos funcionales empleando *c-fos* como marcador de activación, aún falta mucha información sobre qué genes se ven afectados en las neuronas que presentan inducción de *c-fos* in vivo. Estudios in vitro e in vivo muestran la participación de *c-fos* en la regulación de la expresión de distintos neuropéptidos, como la proencefalina, la prodinorfina, factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y enzimas de síntesis de neurotransmisores como la glutamato descarboxilasa (GAD) y la tirosina hidroxilasa (TH). Estudios in vivo donde se inhibe la expresión de *c-fos* administrando oligonucleótidos antisentido en distintas áreas del SNC, como el estriado o la amígdala central, han permitido relacionar la inducción de *c-fos* con procesos de plasticidad neuronal que tienen lugar en estos núcleos tras la administración de amfetamina o la exposición a estímulos estresantes, respectivamente (revisión en Chiasson *et al.*, 1997).

Aplicación de *c-fos* en el estudio del estrés

Durante la última década se ha utilizado ampliamente la inducción de *c-fos* para comprender mejor cómo el SNC responde y procesa los estímulos estresantes (revisión en Imaki *et al.*, 1995, Herman y Cullinan, 1997; Kovacs, 1998; Sawchenko *et al.*, 2000; Pacak y Palkovits, 2001; Herman *et al.*, 2003). El análisis de todos los datos de expresión de *c-fos* obtenidos mediante hibridación “in situ”, inmunohistoquímica y otras aproximaciones experimentales, ha sido una herramienta fundamental para clasificar los distintos estímulos estresantes en sistémicos y emocionales (revisión en Sawchenko *et al.*, 2000, Herman *et al.*, 2003).

Sin embargo, se ha de tener en cuenta la dificultad de clasificar un estímulo como puramente sistémico o puramente emocional basándonos en el patrón general de activación, ya que sus efectos pueden ser complejos. Por poner un ejemplo, un estímulo considerado sistémico como

la endotoxina, también conlleva una sensación de malestar en animales no anestesiados que podría activar circuitos emocionales (Armario, 2006a).

A diferencia de lo que ocurre con los estímulos estresantes de naturaleza sistémica, la exposición a diferentes tipos de estímulos estresantes pura o predominantemente emocionales parece desencadenar un patrón en gran parte común de expresión de *c-fos*, incluso cuando estos estímulos difieren enormemente en sus características (Cullinan *et al.*, 1995; Kovács, 1998; Ons *et al.*, 2004). Algunas áreas muestran activación tras la manipulación del animal (“*handling*”) o la exposición a ambientes nuevos implícita en algunos estímulos estresantes (v.g. caja donde aplica el choque eléctrico). No obstante, en el caso del *handling*, esta activación es generalmente baja si los animales están habituados y se confunde fácilmente con la leve expresión constitutiva de *c-fos* (revisión en Kovács, 1998).

Dentro de este grupo de áreas se incluirían algunos núcleos talámicos y de la amígdala, áreas corticales y subcorticales, el LS, el BST anterior, el FH y la sustancia gris peri-acueductal (PAG). Se considera que estas áreas, o al menos parte de ellas, podrían estar relacionadas con un estado de activación general o de **arousal** (revisión en Cullinan *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Campeau y Watson, 1997; Kollack-Walker *et al.*, 1997). El *arousal* podría ser un factor común a la mayoría de estímulos emocionales por lo que podría explicar, al menos en parte, las coincidencias en el patrón de activación. Seguramente se trata de áreas con un umbral de inducción de *c-fos* bajo.

Se ha descrito una marcada expresión de *c-fos* en todas las áreas alo-corticales e isocorticales y especialmente en la **mPFC** tras la exposición a diferentes estímulos de carácter emocional como el **nado forzado**, el **ambiente nuevo** o la **exposición a un olor aversivo** (Day *et al.*, 2004; Ons *et al.*, 2004). Como hemos comentado anteriormente, el mPFC y más concretamente la subdivisión PrL, podría ejercer un papel inhibitorio sobre algunas de las respuestas fisiológicas y conductuales asociadas al estímulo estresante (Diorio *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 2003; Radley *et al.*, 2006). Dentro de las áreas límbicas subcorticales, se ha observado una consistente activación en el LS y más concretamente en la **subdivisión ventral (LSv)**, en respuesta a numerosos estímulos estresantes (Campeau *et al.*, 1997; Stamp y Herbert, 1999; Armario, 2006b). Así mismo, también se ha descrito una inducción de *c-fos* en el **BST** y en la **amígdala**.

En el caso del BST, existe cierta controversia respecto a qué subregiones se activan en respuesta al estrés (Cullinan *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1993; Bonaz y Rivest, 1998; Campeau y Watson, 1997; Li y Sawchenko, 1998; Choi *et al.*, 2007), posiblemente debido a la complejidad anatómica de este núcleo que dificulta la interpretación de la señal en los films autorradiográficos. Respecto a la amígdala, diversos estudios sugieren que la **MeA** podría tener una participación más relevante en la respuesta a estímulos estresantes de carácter emocional, mientras que la **CeA** participaría principalmente en la respuesta frente a estímulos sistémicos (Cullinan *et al.*, 1995; Dayas *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Ons *et al.*, 2004).

Pocos trabajos han abordado directamente el estudio de la respuesta de *c-fos* frente a estímulos de diferente intensidad. Campeau y colaboradores han estudiado la respuesta al ruido, (Campeau y Watson, 1997; Campeau *et al.*, 1997) encontrando tres patrones distintos de inducción de *c-fos*: **(a) áreas que responden a la caja experimental (ambiente nuevo) con la misma intensidad que a los diferentes niveles de ruido; (b) áreas relacionadas con el sistema auditivo, que responden de forma proporcional a la intensidad del ruido; y, finalmente, (c) áreas en las que se encuentra inducción de *c-fos* sólo con los ruidos de más elevada intensidad (90 y 105 dBA): BST, LS, FH**

(giro dentado), varios núcleos hipotalámicos (destacando el PVN) y núcleos del tronco como la PAG y el DR.

En un diseño diferente, Pace y colaboradores (2005) han utilizado tres ambientes nuevos (una caja de estabulación distinta a la habitual, un campo abierto circular y un pedestal elevado del suelo) y la inmovilización en tubo, como estímulos estresantes que difieren en intensidad a juzgar por la liberación de ACTH y corticosterona. Observan que la inducción de *c-fos* en el PVN sigue el mismo patrón de proporcionalidad con la intensidad del estímulo que la liberación de ACTH y corticosterona. Por el contrario, la inducción de *c-fos* en el hipocampo y la corteza parece estar más relacionada con el potencial de exploración que tiene la situación nueva, que con la intensidad del estímulo, pues es más elevada en el pedestal y el campo abierto que con la inmovilización.

Al revisar la literatura referente a distintos estímulos emocionales (Armario 2006a), encontramos zonas como la **corteza** y el **tálamo** con niveles similares de inducción de *c-fos*, independientemente de la intensidad del estímulo presentado. En cambio, la inducción de *c-fos* en áreas como el **LS**, **MeA**, algunas regiones del **BST**, el **PVN** y el **LC** sí parecen discriminar entre distintas intensidades de estrés. En nuestro laboratorio hemos comparado la expresión de *c-fos* tras la exposición a estímulos estresantes emocionales de distinta intensidad (Ons *et al.*, 2004): ambiente nuevo, natación forzada e inmovilización. En estos experimentos hemos encontrado áreas, como el **mPFC**, que responden igual a los tres estímulos presentados, mientras que el **LS**, **MeA**, **PVN** y **LC** presentan por norma general una inducción de *c-fos* proporcional a la intensidad del estímulo.

Esta aparente insensibilidad de determinadas áreas del SNC a la intensidad del estímulo como el mPFC sugiere que (Armario, 2006a): **(1) existe un número limitado de neuronas que responden al estímulo y la inducción de *c-fos* en neuronas discretas podría ser un fenómeno de todo o nada y (2) las neuronas son tan sensibles que responden al más mínimo estímulo.** Por otro lado, la existencia de áreas que responden de manera proporcional a la intensidad de los estímulos emocionales sugiere que, en estas áreas, se reclutan un número mayor de neuronas con los estímulos más severos, existiendo posiblemente neuronas con distintos umbrales de activación.

Para explicar cómo estímulos emocionales de naturaleza claramente distinta terminan por activar las mismas áreas del SNC tenemos **dos hipótesis alternativas** (Armario, 2006a). La primera, y más probable, supone que *se activa la misma población neuronal independientemente del estímulo presentado*. Esta hipótesis encaja con los conceptos de *arousal* y de la activación inespecífica de la corteza a través de proyecciones monoaminérgicas procedentes del tronco encefálico y de las señales procedentes de los núcleos de proyección inespecífica del tálamo. La segunda posibilidad contempla un cierto nivel de selectividad, con *activación de circuitos anatómicamente próximos pero funcionalmente separados*. Es decir, en una misma área del SNC podrían coexistir poblaciones neuronales con distinto fenotipo neuroquímico (especialmente respecto al neuropéptido utilizado como cotransmisor), cada uno de los cuales se activaría al mismo nivel frente a un estímulo concreto.

Dinámica temporal de la expresión de *c-fos*

El estudio de la **dinámica temporal de la expresión de *c-fos*** en respuesta a estímulos estresantes mayoritariamente emocionales tiene una gran relevancia, especialmente si consideramos que muchos estudios se han centrado solamente en un punto temporal determinado. Un aspecto

relevante de la expresión de *c-fos* es que tras alcanzar un máximo, **los niveles del mRNA de *c-fos* disminuyen progresivamente hasta niveles equivalentes a los basales, incluso aunque la exposición al estímulo estresante persista** (Imaki *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1994; Trnecková *et al.*, 2007).

Los mecanismos implicados en la regulación de este gen a nivel transcripcional no están aclarados. Debido a la presencia de un sitio de unión AP-1 en el mismo promotor de *c-fos*, se ha propuesto un mecanismo de auto-inhibición mediado por este mismo complejo proteico (Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Schonthal *et al.*, 1989). Así mismo, dos de las 4 variantes de corte y empalme conocidas de ICER podrían estar implicadas en la represión del gen que codifica para *c-fos* (Spencer y Houpt, 2001; Steigedal *et al.*, 2007; Misund *et al.*, 2007). Sin embargo, la acción de este represor en su máximo de expresión no es suficiente para inhibir la re-estimulación de la expresión de *c-fos* con una segunda inyección de LiCl aplicada a las 3 horas, sugiriendo la participación de otros moduladores transcripcionales (Spencer y Houpt, 2001).

Alternativamente, esta disminución progresiva de *c-fos* frente a un estímulo estresante sostenido podría deberse a procesos de inhibición diferentes o a la incapacidad de la neurona para mantener una expresión de *c-fos* intensa y prolongada, aunque eso no explica por qué con determinados estímulos la expresión temporal alcanza máximos a las 3-5 h. Por lo tanto, esta disminución a lo largo del tiempo frente a algunos estímulos estresantes aplicados de manera prolongada podría no ser tan sólo debida a cierta incapacidad de las neuronas de mantener una expresión continuada de *c-fos*, sino probablemente a otros mecanismos donde los cambios en las señales que llegan a la neurona podrían jugar un papel crucial.

Arousal, LC y estrés

El término ***arousal*** se refiere al nivel de actividad cortical que puede oscilar enormemente entre el estado de sueño y de vigilia (Aston-Jones *et al.*, 1998; Davis, 1997). Se trataría básicamente del *estado fisiológico y psicológico de estar despierto o reactivo a los estímulos*. Las alteraciones en el estado de *arousal* se reflejan en cambios en la actividad neuronal telencefálica, que se traducen en señales electroencefalográficas (EEG, Vanderwolf y Robinson, 1981). Estas fluctuaciones en el *arousal*, pueden tener un impacto sustancial en gran número de procesos cognitivos y perceptuales (Berridge, 2008).

El estado de arousal depende de la activación del sistema de activación reticular en el tronco encefálico y puede reflejarse en cambios en el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino, así como en una condición de alerta sensorial, movilidad y disposición para la respuesta inmediata. Existen varios neurotransmisores implicados en lo que se conoce colectivamente como sistema de *arousal* como la **acetilcolina**, la **noradrenalina (NA)**, la **dopamina**, la **5-HT** y la **histamina**. Cuando estos sistemas están activados, las áreas que reciben dichas proyecciones se vuelven más sensibles y receptivas a las señales entrantes. El conjunto de datos disponibles sugieren que la NA liberada desde las neuronas del locus coeruleus (**sistema LC-NA** en adelante) podría mediar, o al menos modular, la respuesta de *arousal* y de estrés en regiones telencefálicas (Berridge, 2008).

El **sistema LC-NA** fue el primer sistema neuromodulador delimitado anatómicamente y caracterizado neuroquímicamente (revisión en Sara, 2009). El LC es el principal núcleo para la síntesis de NA y está localizado bilateralmente en el puente. Se compone de neuronas de tamaño mediano ricas en gránulos de neuromelanina que se forman por la polimerización de la NA.

Esta neuromelanina es análoga a la neuromelanina negra rica en dopamina de la sustancia nigra (Foote *et al.*, 1983). Un dato a destacar es que una sola neurona puede inervar diversas regiones, incluyendo el telencéfalo, tallo cerebral y cerebelo (Jones *et al.*, 1977).

El sistema noradrenérgico está compuesto por distintos **grupos celulares** situados en el puente y en la médula: **A1, A2, A4, A5 y A6 (Fig. 5)**. Los grupos A1 y A2 emiten proyecciones a la médula espinal donde forman sinapsis con terminales de aferencias primarias. El resto de grupos, emiten sus proyecciones formando dos haces: el **haz noradrenérgico ventral (VB)** y el **haz noradrenérgico dorsal (DB)** que acaban confluyendo en el **haz telencefálico medial (MFB)**. El VB se origina en el NTS y en la médula ventral lateral (VLM) y es el mayor responsable de la inervación del hipotálamo. El DB proviene mayoritariamente del LC (grupo celular A6) y envía proyecciones al cerebelo, neocórtex, núcleos talámicos y estructuras límbicas como la amígdala,

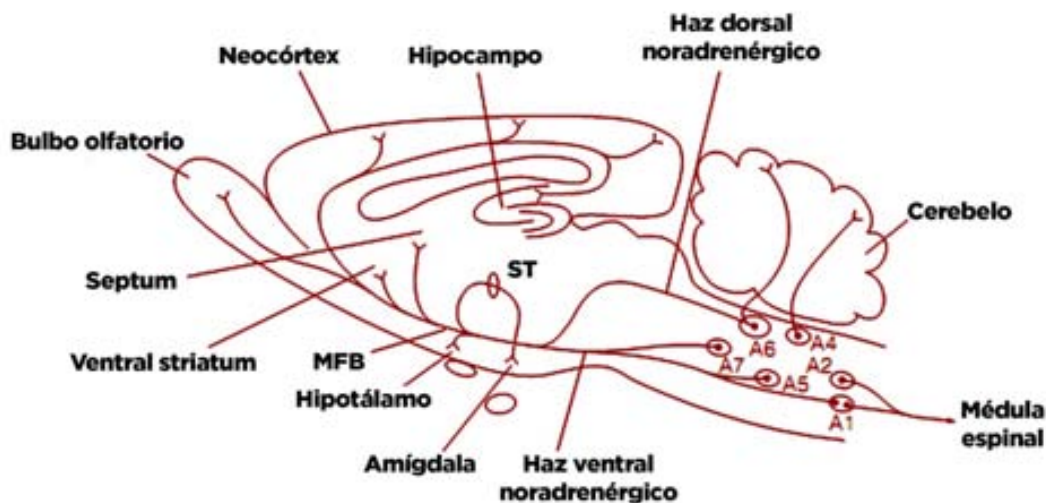


Figura 5. **Haces noradrenérgicos en corte sagital de cerebro de rata.**

MFB: haz telencefálico medial; ST: estría terminal; grupo celular A6: LC.

hipocampo y el septum (Sara, 2009).

El LC es la fuente primaria de NA a nivel telencefálico y la única fuente en el cerebelo, el córtex y el hipocampo, regiones éstas últimas relacionadas con la cognición, la memoria y las conductas complejas. Este neurotransmisor tiene un efecto excitatorio en la mayor parte del cerebro, mediando en el *arousal* y facilitando la activación de las neuronas en respuesta a multitud de estímulos (Berridge, 2008). El LC exhibe dos modalidades de actividad: **tónica** y **fásica**. El equilibrio entre ambas podría determinar la estrategia conductual frente a determinadas situaciones o contextos (Aston-Jones y Cohen, 2005). La tasa de descarga tónica está positivamente correlacionada con el estado de *arousal*. De hecho, la manipulación farmacológica de la misma con clonidina, un agonista de los receptores adrenérgicos α -2, es capaz de alterar los índices electroencefalográficos de *arousal*, disminuyendo la influencia del LC en la actividad neuronal telencefálica (Berridge *et al.*, 1993).

La activación fásica responde a estímulos sensoriales discretos de distintas modalidades y está probablemente desencadenada por neurotransmisión glutamatérgica (Ennis *et al.*, 1992). El nivel de activación fásica es dependiente de la actividad tónica en un momento particular, siendo óptima con niveles moderados de actividad tónica, y menor con niveles tónicos bajos o cuando

estos exceden un cierto umbral, como puede ocurrir en respuesta a un estímulo estresante (Astton-Jones *et al.*, 2000; Usher *et al.*, 1999). Todos estos datos apoyan la hipótesis de que el *arousal* es necesario para el procesamiento óptimo de la información sensorial proveniente del entorno. De esta manera, la actividad fásica del LC se ha relacionado con comportamientos asociados a la realización de tareas específicas, mientras que un cambio hacia una actividad tónica predominante podría proveer mejores soluciones en un entorno cambiante o cuando la conducta presente no es óptimamente adaptativa (Valentino y Van Bockstaele, 2008).

La función del LC está regulada por aferencias de carácter generalmente excitatorio que llegan al mismo LC o a la región peri-LC desde diversas regiones telencefálicas y límbicas, como la CeA, hipotálamo anterior, PVN, córtex cingulado (Cin) y el área hipotalámica posterior (PLH) (Dimitrov *et al.*, 2013). Entre los inputs excitatorios se han identificado proyecciones de glutamato-dinorfina provenientes mayoritariamente de la CeA y proyecciones de hipocretina-orexina y de CRF desde el hipotálamo. Entre los inputs inhibitorios se conocen los provenientes de la CeA mediados por encefalina y los provenientes del PLH mediados por GABA.

Implicación del sistema LC-NA y el *arousal* en la respuesta de estrés

Aunque la activación del eje HPA es considerada generalmente como el punto central de la respuesta de estrés, muchos de los estímulos que inician esta respuesta activan también el sistema LC-NA (Valentino y Van Bockstaele, 2008; Berridge, 2005). La activación de ambos rige la coordinación endocrina y cognitiva de la respuesta de estrés (Berridge, 2005). El estudio de las aferencias que llegan al LC desde áreas relevantes en la respuesta de estrés y su caracterización electrofisiológica revelan cómo la actividad del sistema NA-LC está determinada por las características de los distintos estímulos estresantes al objeto de facilitar respuestas cognitivas adaptativas. A raíz de estos estudios se han ido encontrando interacciones complejas entre el CRF, opioides endógenos y el glutamato. El efecto final de estas interacciones es el ajuste de la actividad y la reactividad del sistema LC-NA a cada estado particular de *arousal*, de tal manera que el procesamiento de los distintos estímulos sensoriales pueda facilitar una respuesta conductual adaptativa al estrés (Valentino y Van Bockstaele, 2008).

El sistema LC-NA muestra una gran sensibilidad a diversos estímulos estresantes (Berridge, 2005; Dunn, 1988; Valentino *et al.*, 1998, Valentino y Van Bockstaele, 2008). Los primeros estudios utilizando el choque eléctrico en las patas como estímulo estresante demostraron que la lesión del LC impedía el incremento de NA asociado al estrés en regiones telencefálicas que reciben aferencias del LC como el mPFC o el hipocampo (Thierry *et al.* 1968; Korf *et al.*, 1973; Cassens *et al.*, 1980, 1981). Así mismo, estímulos estresantes como la administración de IL-2 también producen un incremento de la utilización de NA en estas regiones, subrayando la naturaleza generalizada de la activación (Lacosta *et al.*, 2000).

Otros estudios utilizando microdiálisis demuestran que el LC se ve activado por estímulos estresantes de diferente naturaleza como el choque eléctrico en las patas (“*foot shock*”), el *restraint*, el estrés auditivo y la hipotensión (Abercrombie y Jacobs, 1988; Britton *et al.*, 1992; Smagin *et al.*, 1994; Swiergiel *et al.*, 2008). Otros parámetros, como la expresión de la tirosina hidroxilasa o de *c-fos*, sugieren consistentemente que el LC es capaz de activarse por una gran variedad de estímulos estresantes incluyendo el nado forzado y el estrés social (revisión en Valentino y Van Bockstaele, 2008).

En experimentos electrofisiológicos recientes se ha observado que las neuronas del LC se activan con menor latencia que otras regiones telencefálicas como el PFC o el VTA en respuesta al choque eléctrico en las patas (Pietrajtis *et al.*, 2010, no publicado). Además, tras la inhibición de la actividad espontánea de las neuronas del LC mediante clonidina, la respuesta electrofisiológica al choque en el PFC y el VTA se ve completamente bloqueada (revisión en Sara y Bouret, 2012). Todos estos datos sugieren consistentemente que el LC influye en la respuesta de las estructuras superiores partiendo de una respuesta de corta latencia en el LC debida muy probablemente a inputs recibidos desde la médula espinal (Cedarbaum y Aghajanian, 1978).

Entre el conjunto de neurotransmisores identificados en aferencias al LC, el CRF se ha destacado como un probable mediador de la activación del LC provocada por el estrés. Aparte de la función principal del CRF como iniciador de la activación del eje HPA, la amplia distribución de terminales axónicas con presencia de CRF, apoyan la hipótesis de que este neuropéptido sirve como un modulador de la actividad neuronal para mediar diversos efectos fisiológicos y comportamentales (revisión en Valentino y Van Bockstaele, 2008). En consonancia con esta idea, se ha observado que la administración intracerebroventricular (ICV) de CRF es capaz de incrementar los niveles de NA, valorados mediante microdiálisis en el PFC, el hipocampo y el hipotálamo medial (Dunn and Berridge, 1987; Lavicky y Dunn, 1993; Lee *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998).

Las aferencias inmunoreactivas para CRF que desembocan en el LC y en la región peri-LC proceden de núcleos como la CeA, el BST, el PVN, el Bar y el núcleo paragigantocelular. Éstas inervan sobre todo las regiones periféricas del LC donde abundan las dendritas que se extienden desde este núcleo (Valentino *et al.*, 1992). Estudios de microscopía electrónica han identificado bases anatómicas para acciones directas e indirectas del CRF sobre las neuronas del LC (Van Bockstaele *et al.*, 1996). Por lo tanto, las especializaciones sinápticas identificadas entre las terminales CRF-inmunoreactivas y las dendritas del LC, la mayoría de las cuales son de tipo excitatorio y co-localizan con glutamato (Valentino *et al.*, 2001), indican una modulación directa de la actividad del LC. En este sentido, la administración de CRF en el LC es capaz de incrementar la liberación de NA en corteza e hipocampo (Palamarchouk *et al.*, 2000; 2002; Smagin *et al.*, 1994). Así mismo, mediante la utilización de retrotrazadores, se ha observado que las neuronas de CRF procedentes del PVN que proyectan al LC son distintas de las que proyectan a la eminencia media para iniciar la liberación del ACTH en respuesta a estrés, indicando que las acciones neurohormonales y neuro-moduladoras del CRF podrían estar orquestadas de manera independiente (Reyes *et al.* 2005).

La CeA coordina las respuestas autonómicas y ciertos reflejos motores en respuesta a estímulos emocionales como el miedo condicionado, y lo hace a través de proyecciones al hipotálamo lateral y a la PAG (LeDoux *et al.* 1998). Las proyecciones de CRF que llegan a la región peri-LC desde la amígdala podrían ejercer un papel relevante en la respuesta de miedo. La CeA también coordina la información proveniente del sistema cardiovascular y de las vísceras con las respuestas conductuales, y por ello no es sorprendente que este núcleo juegue un papel crítico en la activación del sistema LC-NA por la hipovolemia (Valentino y Van Bockstaele, 2008). No obstante, la CeA suele activarse poco en términos de *c-fos* con estímulos emocionales y por lo tanto su papel en estas situaciones es poco claro.

El sistema LC-NA no se encuentra bajo regulación tónica por CRF endógeno ya que la administración de antagonistas del receptor de CRF no tiene ningún efecto en la tasa de disparo del LC o en la liberación de NA en ratas no estresadas (Page y Abercrombie, 1999). Sin embargo, la im-

portancia de una liberación tónica de CRF en el LC se hace aparente en ratas adrenalectomizadas, en las cuales se produce una mayor tasa de disparo en comparación con ratas *sham* (Pavlovich y Valentino, 1997). La administración de CRF en el LC normaliza esta diferencia, sugiriendo que la liberación de CRF en el LC está restringida por los niveles basales de corticosterona. Este hecho puede tener importantes implicaciones en condiciones donde pueda existir una disfunción de los receptores de corticosteroides (v.e depresión), en cuyo caso sería predecible una actividad del LC tónicamente elevada.

También existe una evidencia substancial de la liberación de CRF endógeno en el LC durante el estrés. La hipotensión, la cual activa el eje HPA, mimetiza los efectos del CRF en la descarga tónica y fásica del LC (Valentino y Wehby, 1988). Según la presión sanguínea decae, la tasa de disparo del LC se incrementa y con ello la actividad electroencefalográfica telencefálica. Estos efectos son completamente prevenidos por la administración de un antagonista del receptor de CRF en el LC (Curtis *et al.*, 2001; Valentino *et al.*, 1991; Valentino y Wenby, 1988). Así mismo, también se ha observado que la microinfusión de un antagonista del receptor de CRF es capaz de prevenir el incremento de la expresión de la tirosin hidroxilasa en las neuronas del LC y de los niveles de NA cortical inducidos por estímulos estresantes como el choque eléctrico o el estrés por ruido (Melia y Duman, 1991; Kawahara *et al.*, 2000; Smagin *et al.*, 1996). Estos resultados apoyan la idea de que el incremento de la liberación de CRF en el LC, tiene como objetivo incrementar la actividad del sistema LC-NA y en consecuencia la actividad neuronal telencefálica (Curtis *et al.* 1995; Xu *et al.* 2004; Reyes *et al.*, 2006).

Papel del sistema LC-NA en la inducción de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes

La expresión de IEGs en el SNC en respuesta a estímulos estresantes de distinta naturaleza es un fenómeno altamente estudiado. Aunque las vías neuronales que dan lugar a la activación de *c-fos* en el SNC no han sido completamente caracterizadas, existe gran evidencia de que el sistema LC-NA juega un papel relevante (Stone y Zhang, 1995). Esto no es sorprendente dado que, como ya hemos comentado, el sistema LC-NA juega un papel importante en la respuesta del SNC al estrés, al menos en parte relacionado con el estado de *arousal*.

Los **receptores adrenérgicos** implicados parecen ser fundamentalmente α -1 y β -1. La activación del receptor β -1 resulta en una transducción específica de señal que provoca un incremento en la actividad adenilato ciclasa y por tanto en los niveles de AMPc. Este incremento en los niveles de AMPc es capaz de inducir la expresión de *c-fos* en ciertos tipos de células, incluyendo una línea de células neuronales (Stone y Zhang, 1995). Los receptores presinápticos α -2 juegan un papel auto-inhibitorio en la activación de las neuronas noradrenérgicas y en la liberación de NA. Su activación está asociada a un descenso en la actividad adenilato-ciclasa. El bloqueo α -2 por antagonistas como la yohimbina o el atipamizol provoca un incremento en la expresión de *c-fos* en múltiples áreas del SNC, probablemente por desinhibición de las neuronas NA (Gubits *et al.*, 1989; Bing *et al.*, 1992). Estos efectos son prevenidos por un bloqueo β con propanolol y en menor medida por el bloqueo α -1 con prazosina (Bing *et al.*, 1992). De hecho, la utilización de bloqueantes α -1 o β provoca una disminución de la expresión de *c-fos* en respuesta a estrés emocional principalmente en áreas telencefálicas, sin afectar a núcleos como LSV, la Mea o el PVN (Stone *et al.*, 1993, 2007; Stone y Zhang, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Williams y Morilak, 1997).

Con respecto al papel específico del LC, se ha observado que la destrucción selectiva de somas, axones y terminales catecolaminérgicas mediante la administración de **6-hidroxidopamina** (6-

OHDA) es capaz de reducir notablemente la expresión de *c-fos* en respuesta al estrés por aire a presión (“*air puff*”), fundamentalmente en el mPFC y en el BSTv (Spencer y Day, 2004). Así mismo, existen evidencias de que la administración de **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4)**, una neurotoxina que destruye selectivamente las terminales noradrenérgicas provenientes del LC, es capaz de reducir, 5 días después de su administración, la expresión de *c-fos* en el córtex visual, tanto a nivel basal como en respuesta a un estímulo fótico, sin influir en la expresión de otros IEG como *zif268* (Yamada *et al.*, 1999), sugiriendo que la expresión de estos dos genes está regulada por distintas vías.

materiales y métodos

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 8 semanas de edad al inicio del procedimiento experimental, proporcionadas por el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Los animales fueron estabulados en grupos de a dos por caja (1000 cm³; 57 x 27 x 14.5 cm), con una temperatura de 22 °C, una humedad relativa de entre el 40 y el 60%, y con un ciclo de 12 h de luz que comenzaba a las 7.30 am. Los animales tuvieron siempre acceso *ad libitum* a agua y comida (dieta de mantenimiento tipo A-04, Panlab, España). Se permitió que los animales se aclimataran a las condiciones del estabulario de la Unidad de Fisiología Animal de la UAB durante dos semanas antes del día del experimento.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la UAB, por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya, y siguen la concerniente normativa europea ("Principles of laboratory animal care", European Communities Council Directive 86/609/EEC).

Durante las dos semanas de habituación a nuestro estabulario, las ratas fueron expuestas a cuatro sesiones de manipulación o "handling" para minimizar el impacto del estrés asociado a este procedimiento. El procedimiento se realizó cubriendo al animal con un trapo y realizando 3 sesiones de 10 masajes en el lomo, tras cada una de las cuales se alzaba para que animal se habituara a los desplazamientos de un lugar a otro. En el caso de precisarse una toma de muestra sanguínea, el "handling" se finalizó con 10 masajes en la cola, similares a los que se realizan en la toma de muestra. Previamente a la realización de los experimentos, los animales se distribuyeron en los distintos grupos experimentales según su peso corporal, madre y fecha de nacimiento.

Los niveles hormonales de ACTH y corticosterona en rata siguen un ritmo circadiano, con un máximo durante la fase nocturna o de alta actividad (v. g. Márquez *et al.*, 2005). Los niveles de expresión de c-fos fluctúan manteniéndose bajos durante la fase de inactividad (Grassi-Zucconi *et al.*, 1993). Por ambas razones, todos los experimentos se llevaron a cabo durante la fase diurna o de baja actividad, desde las 8.00 hasta las 15.00.

Cuando fue necesario, las muestras de sangre se extrajeron mediante el método de incisión en la cola, consistente en realizar una pequeña incisión en la parte más distal de la cola del animal (preferentemente en una de las venas laterales) y masajear la misma para estimular el flujo sanguíneo. En menos de 2 minutos, se recogían unos 300 ul de sangre en tubos capilares conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente anticoagulante (Sarstedt, Alemania). Los tubos se mantuvieron a 4° C hasta el final del experimento. Posteriormente, la sangre fue centrifugada durante 25 minutos a 8100 rpm a 4° C para la obtención del plasma, que se distribuyó en alícuotas para la determinación de ACTH. Todas las muestras fueron conservadas a -20° C hasta la realización del RIA.

Los distintos grupos experimentales se contrabalancearon a la hora de sacrificar a los animales mediante la perfusión, minimizando así la posible influencia del ritmo circadiano sobre los resultados. Para evitar posibles alteraciones asociadas a todo el procedimiento experimental, la perfusión y los distintos procedimientos de estrés se realizaron en habitaciones distintas. Los animales control fueron trasladados en su caja hasta otra habitación independiente, y de allí pasaron directamente a la anestesia.

Procedimientos de estrés

Ambiente nuevo/campo abierto

Como ambiente nuevo se utilizó una caja plástica rectangular (56 x 36,5 x 31cm) de color gris abierta por la parte de arriba. Para la iluminación se utilizó una bombilla de luz blanca de 25W colocada a 1.20 m sobre la superficie de cada par de cajas (**Fig. 6**). Los animales fueron transportados de dos en dos en sus jaulas a la sala donde fueron expuestas simultáneamente y de cuatro en cuatro a este estímulo estresante. Para el análisis del comportamiento, se colocó una cámara de vídeo (Sony SSC-M388 CE, BW) por cada par de cajas, 1.20 m sobre la superficie de las mismas (al lado de las bombillas).



Figura 6. **Caja rectangular de color gris usada como ambiente nuevo.**

Olor al depredador

Se colocó y fijo con cinta adhesiva un fragmento de toalla de algodón frotado contra la piel del gato (31x24.5 cm) en cajas rectangulares idénticas a las utilizadas como ambiente nuevo. Los gatos utilizados fueron machos no castrados de 5 años de edad residentes en otro animalario. Cada toalla fue guardada en bolsas selladas y mantenidas a -20°C hasta el día del experimento. No se encontraron diferencias entre las toallas obtenidas de cada gato respecto a las variables a investigar. La superficie de la caja rectangular fue dividida en tres regiones de igual área, siendo la zona 1 (Z1) aquella donde se colocó el trazo, la zona 2 (Z2) la región intermedia, y la zona 3 (Z3) la opuesta a la del trazo.

Inmovilización en plancha (IMO)

Los animales fueron inmovilizados durante los tiempos indicados, siguiendo un procedimiento similar al descrito previamente (Kvetnansky y Mikulaj, 1970), con algunas modificaciones. Los movimientos de cabeza se restringieron mediante dos placas de metacrilato (7 x 6 cm) a ambos lados de la misma para evitar posibles autolesiones. Las 4 extremidades se sujetaron con cinta adhesiva a monturas metálicas adosadas a tablas de madera y posteriormente el



Figura 7. **Tabla de IMO.**

cuerpo del animal fue asegurado a la tabla mediante una tira de *velcro* de unos 10 cm de ancho (**Fig. 7**). Los animales se inmovilizaron en tandas de cuatro a ocho simultáneamente siendo colocados en una habitación cerrada para evitar que los demás grupos experimentales se vieran afectados.

Nado forzado

Los animales fueron colocados durante 20 minutos en cilindros de metacrilato transparente (40 cm de altura y 19 cm de diámetro interno) llenos de agua a una temperatura de 36° C y hasta un nivel de 22 cm (**Fig. 8**), siguiendo el procedimiento descrito previamente (Dal-Zotto *et al.*, 2000). Para evitar posibles interacciones, cada tanque fue aislado mediante mamparas de un material negro opaco. Las ratas fueron expuestas de dos en dos, utilizando una toalla al término de la prueba, para trasladarlas. El agua de los tanques se renovó para cada animal.



Figura 8. **Nado forzado.**

Perfusión

Inmediatamente después de los procedimientos de estrés (o en condiciones basales en el caso de los controles), los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria en una cámara saturada con isoflurano (Laboratorios Esteve, España). Una vez alcanzado un plano profundo de anestesia, ésta fue mantenida durante el inicio de la perfusión mediante un recipiente con un algodón impregnado en isoflurano donde se introdujo la cabeza del animal. La perfusión se realizó transcardíacamente, primero con una solución salina (0,9% NaCl) durante dos minutos y posteriormente con una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) y 3,8 % de tetraborato sódico (bórax) durante 12 minutos.

Una vez terminada la perfusión se extrajeron los cerebros y se sumergieron en PFA/bórax para completar la fijación. De esta manera fueron mantenidos a 4° C durante 16/18 h. Después de este periodo se cambió el PFA/bórax por una solución al 30% de sacarosa en tampón fosfato de potasio-cloruro de sodio (KPBS; 0,2M NaCl; 43mM fosfato de potasio). Así fueron mantenidos a 4° C hasta quedar completamente embebidos en la solución crioprotectora de sacarosa (2-3 días). Posteriormente se congelaron mediante isopentano enfriado con nieve carbónica, siendo conservados a -80° C hasta ser cortados serialmente en secciones coronales de 14 µm mediante criostato CM3050-S (Leica Microsystems, Alemania). Las secciones se conservaron en una solución anticongelante (fosfato de sodio 0,05M, pH 7.3; 30% etilenglicol; 20% glicerol) a -20° C hasta su análisis histológico

Tratamiento con neurotoxina DSP-4

Los animales fueron administrados una semana antes de la exposición a los distintos estímulos estresantes con solución salina (0,9% NaCl) o con N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) expresado como hidrocloreuro (Sigma-Aldrich). El DSP-4 se disolvió en solución salina y seguidamente se administró a una dosis de 50 mg/Kg según lo descrito previamente (Jaim-Etcheverry y Zieher, 1980). El DSP-4 traspasa la barrera hemato-encefálica y se acumula en las terminales nerviosas afectando principalmente a las terminales noradrenérgicas del LC (Dudley *et al.*, 1990).

Técnicas

Radioinmunoanálisis de ACTH

Para determinar la concentración de ACTH en plasma, se siguió el protocolo de RIA de doble anticuerpo descrito previamente por Engeland *et al.* (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio. Se utilizó tampón fosfato 50 mM, pH 7.2, conteniendo EDTA disódico 25 mM, Tritón X-100 al 0,1% y albúmina bovina al 0,25%, disueltos todos en agua MilliQ. Todo el proceso se llevó a cabo a 4° C para evitar la degradación del ACTH. Se utilizó ACTH₁₋₃₉ de rata (Sigma-Aldrich) como estándar, 3-[¹²⁵I] iodotirosil23- ACTH₁₋₃₉ (actividad específica 2000 Ci/mmol, PerkinElmer) como marcador y el anticuerpo contra ACTH de rata (ACTH Ab Rb 7) suministrado generosamente por el Dr. William C. Engeland. La fracción ligada se separó por centrifugación a 4700 rpm durante 30 minutos a 4°C, tras la precipitación con un segundo anticuerpo (goat anti-rabbit IgG, Chemicon) conteniendo suero normal de conejo (NSR) al 1,2% y polietilenglicol al 9%. La radioactividad de los pellets se determinó mediante un contador gamma (Wallac 1272 Clinigamma) y los cálculos para determinar la concentración de ACTH se realizaron utilizando una transformación log-logit.

Hibridación “*in situ*”

Obtención de la ribosonda radiactiva para el mRNA de *c-fos* y el hnRNA de CRF

La ribosonda radiactiva antisentido para el mRNA de *c-fos* fue generada mediante transcripción *in vitro* (SP6/T7 Transcription Kit, Roche) a partir de fragmentos de cDNA de rata (Dr. I. Verma, The Salk Institut) subclonados en un plásmido pBluescript SK-1 (Stratagene, USA). La ribosonda radiactiva antisentido para el RNA heteronuclear (hnRNA) de CRF fue generada igualmente desde el fragmento de cDNA de rata (Dr. Lisa Bain, University of Michigan) subclonado en un plásmido PGEM-3 (Promega, USA). Ambas construcciones fueron cedidas por el Dr. Serge Rivest (Laval University, Quebec, Canadá). En cada transcripción se utilizó 1 µg de plásmido digerido como DNA molde y ³⁵S- UTP como nucleótido marcado radiactivamente (actividad específica 1250 Ci/ mmol, PerkinElmer). Finalizada la transcripción y tras la digestión con 20 U de DNasa (SP6/T7 Transcription Kit, Roche), se añadieron 40 µl de tampón STE (0,1 M NaCl; 10 mM Tris-Cl; 1mM EDTA, pH 8.0) y se realizó una incubación a 65° C durante 5 minutos, antes de su purificación para evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente se procedió a la extracción de la sonda mediante columnas de filtración en gel (mini Quick Spin RNA Columns, Roche). Tras la comprobación de la eficiencia del marcaje en cada caso (>50%), el eluido de la columna conteniendo la sonda radiactiva fue conservado a -20° C hasta su utilización en los respectivos ensayos de hibridación “*in situ*”.

Obtención de la ribosonda no radiactiva para el mRNA de *c-fos*

La ribosonda no radiactiva antisentido para el mRNA de *c-fos* fue generada de igual manera que la radiactiva, pero utilizando UTP marcado con digoxigenina (DIG RNA Labeling Mix, Roche).

Protocolo de hibridación “*in situ*”

Previamente al ensayo, las secciones se lavaron con KPBS para retirar la solución anticongelante y se montaron sobre portaobjetos (Superfrost Plus Slides, Thermo Scientific). Posteriormente, las secciones se secaron durante unas 12 h y se conservaron a -20° C en cajas selladas y en presencia de un agente desecante (Silica Gel PS, Fluka) hasta el inicio del ensayo.

El protocolo utilizado fue adaptado de Swanson *et al.* (1989). Todas las soluciones fueron pre-tratadas con dietilpírocarbonato (DEPC) y esterilizadas mediante autoclavado antes de su utilización. Las secciones se post-fijaron en un baño de PFA/bórax durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados en KPBS para eliminar los restos de fijador. Seguidamente se realizó una digestión proteica durante 15 minutos a 37° C mediante Proteinasa K (Roche) a una concentración de 0,01 mg/ml en una solución adecuada (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0). La digestión se detuvo mediante un lavado con agua tratada con DEPC. Posteriormente, las secciones fueron acondicionadas en una solución de trietanolamina (TEA 0.1 M, pH 8.0), e incubadas durante 10 minutos en una solución de anhídrido acético al 0,25% en TEA 0,1 M, pH 8.0. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado en una solución salina conteniendo citrato de sodio (2X SSC: 0,3 M NaCl; 0,03 M citrato sódico tribásico) y por último las secciones se deshidrataron mediante baños sucesivos en concentraciones crecientes de etanol (50%, 75%, 95%, 2 x 100%) dejándolas secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se añadieron sobre cada portaobjetos 100 µl de solución de hibridación (formamida 50%; 0,3 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 1X solución Denhardt; sulfato de dextrano 10%; tRNA de levadura 500 g/l; DTT 10 mM) conteniendo la sonda radioactiva (10⁶ dpm/100µl) o la sonda no radiactiva (1:2000), y éstos se cubrieron con cubreobjetos. Las secciones fueron incubadas durante 16-18 h a 60° C para permitir la hibridación. Tras este tiempo, las secciones se lavaron en 4 baños sucesivos de SSC 4X y se sometieron a una digestión con RNAsa A (Roche) a 0,02 mg/ml en una solución adecuada (NaCl 0,5 M; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). Tras la digestión se realizaron lavados sucesivos en concentraciones decrecientes de SSC (2X → 0,5X) y DTT 1mM (sólo en el caso de la ISH radiactiva), incluyendo un lavado astringente en SSC 0,1X a una temperatura de 60° C durante 30 minutos y un enjuague posterior en SSC 0,1X a temperatura ambiente.

En el caso de la ISH radiactiva las secciones se deshidrataron mediante baños sucesivos en concentraciones crecientes de etanol. Tras dejar secar las secciones a temperatura ambiente, éstas fueron expuestas a una película XAR-5 Kodak Biomax MR (Amersham UK) durante el tiempo necesario para detectar la señal radioactiva. Según la zona, este tiempo estuvo comprendido entre 17 y 30 horas para *c-fos* y entre 5 y 6 días para el hnRNA de CRF.

En el caso de la FISH, tras el último lavado en SSC 0,1X las secciones pasaron a un tampón tris salino-Tween 20 (T-TBS: 0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20). Seguidamente, se incubaron con solución de bloqueo [2% sero-albúmina bovina (BSA) en T-TBS] durante una hora a 37°C. Tras este tiempo, se retiró el exceso de solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo contra DIG conjugado con peroxidasa (anti-DIG-POD, Roche, USA) a una concentración de 1:500 en solución de anticuerpo [1% suero fetal bovino (FCS), 0.1% BSA Acetilada, 0.1% Tween 20 en TBS] dejando incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Acabada esta incubación, se realizaron tres lavados en T-TBS y se procedió a la amplificación de la señal mediante el sistema tiramida-fluoresceina (TSA-plus Fluorescein, PerkinElmer).

Tras la amplificación, se realizó un lavado en T-TBS y se tiñeron los núcleos mediante Hoechst 33258 pentahydrate (Invitrogen) a 1:10000 en TBS durante 10 minutos. Posteriormente se realizó un lavado en T-TBS, otro lavado en TBS y un último lavado en agua destilada. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente antes de ser montados usando un medio de montaje de base acuosa (Fluoromount, Sigma-Aldrich) y sellados con un medio de montaje rápido (Entellan, Merk). Los portaobjetos se conservaron a 4° C hasta la captura de imagen mediante microscopía de epifluorescencia.

Doble marcaje IF-FISH

Consideraciones técnicas previas

Para la realización de este doble marcaje existen diferentes alternativas dependiendo del orden en el que se efectúa cada marcaje simple, del procesamiento en *free-floating* o sobre portaobjetos y de la utilización de técnicas histoquímico-radiactivas o fluorescentes-no radiactivas. En nuestro caso, la elección de uno u otro método ha dependido fundamentalmente del grosor de corte de la muestra (14 μm) y de la imposibilidad de realizar el marcaje de la proteína sobre portaobjetos, hecho que se deriva también del grosor de la muestra.

Tradicionalmente en el nuestro y en otros laboratorios, la alternativa más utilizada ha sido realizar primero el marcaje de la proteína mediante inmunohistoquímica en *free-floating* y posteriormente la detección del mRNA mediante hibridación *in situ* radiactiva sobre portaobjetos con detección mediante emulsión microautorradiográfica. La realización de la técnica en este orden conlleva un problema crucial que es la pérdida de señal radiactiva en la ISH debido a la interacción de la peroxidasa en la detección de la IHQ. La causa de esta disminución se ha relacionado con la posible formación de agregados de cromógeno (DAB, NBT/BCIP, etc) durante la reacción enzimática que pudieran afectar a la unión posterior de la sonda (Chiu *et al.* 1996). Sin embargo, estudios posteriores parecen confirmar que la razón fundamental de la disminución de la señal es la formación de radicales libres de oxígeno durante la reacción de la peroxidasa que podrían afectar a la estabilidad del mRNA (Pineau *et al.*, 2006). En nuestro caso, debido muy probablemente a la proximidad entre la proteína c-Fos y su mRNA, la disminución de la señal radiactiva fue casi total, hecho que nos hizo descartar por completo esta alternativa de doble marcaje. La siguiente posibilidad que valoramos fue la utilización de inmunofluorescencia (IF) combinada con ISH no radiactiva con revelado fluorescente (FISH). Esta alternativa también generó ciertos problemas que fueron fundamentalmente:

- (1) Disminución de la señal específica en la FISH tras la IF.
- (2) Disminución de la señal específica de la IF tras la FISH.

La disminución de la señal específica FISH tras la IF es debida fundamentalmente a la contaminación con nucleasas del tampón de anticuerpo de la IF. Este problema se solucionó utilizando un agente de bloqueo libre de nucleasas específico para biología molecular (Blocking Reagent, Roche) (**Fig. 9**). La IF de c-Fos no se vio alterada con el cambio de agente de bloqueo.

La disminución de la señal específica de la IF tras la FISH es debida fundamentalmente a los numerosos lavados realizados durante la FISH y al daño que sufre el fluorocromo durante la hibridación a 60°C con la sonda no radiactiva. Este tiene una implicación fundamental a la hora de determinar el número de neuronas que se activan con un primer estímulo (neuronas positivas para proteína). Si este dato resulta infravalorado, podríamos cometer un error a la hora de identificar posibles nuevas poblaciones neuronales que responden a un segundo estímulo. Para determinar el alcance de la disminución en la fluorescencia, se ha valorado la pérdida en número de células positivas comparando una IF simple con la IF-FISH en el LSv (**Fig. 10**).

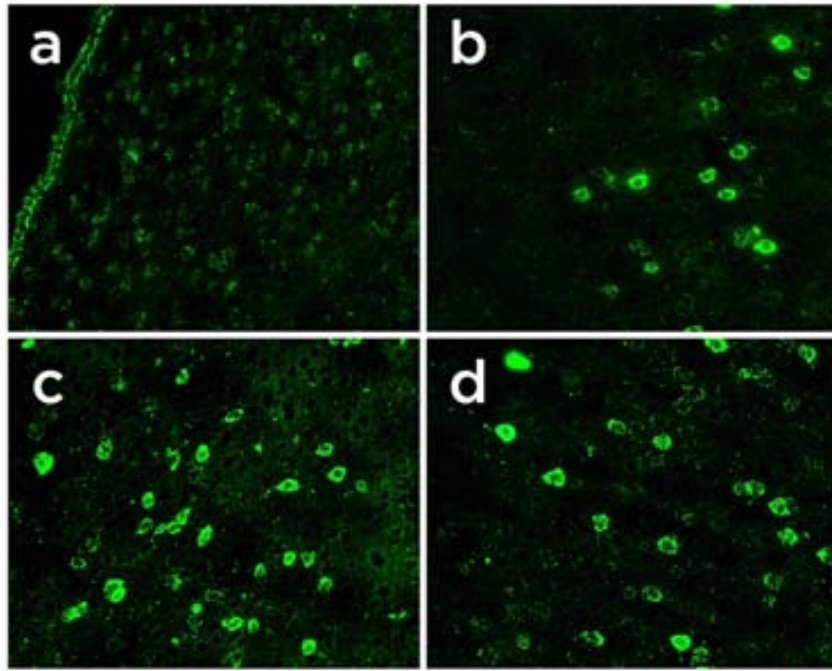


Figura 9. **Utilización de diferentes tampones de bloqueo en la IF y su efecto sobre la FISH.**

Se muestran imágenes de FISH en el LSv utilizando distintos tampones de incubación del anticuerpo en la IF. **a:** 1% BSA en KPBS; **b:** 1% BSA, 5 mg/ml Heparina en KPBS; **c:** 1% Blocking Reagent en KPBS; **d:** sólo FISH. La IF realizada previamente no se vio alterada con el cambio de tampón de bloqueo.

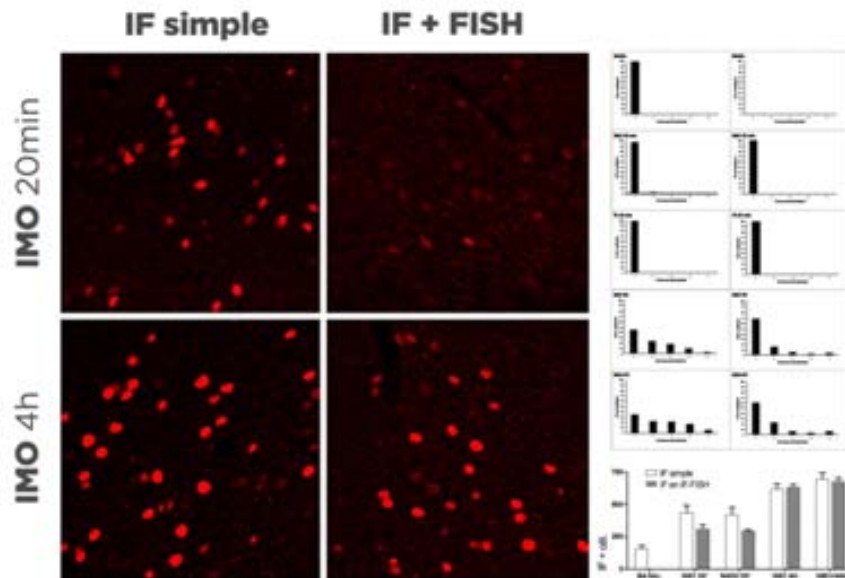


Figura 10. **Pérdida de fluorescencia en la IF tras la FISH.**

Izquierda: Imágenes de IF simple y de IF-FISH en LSv y en animales expuestos a 20 minutos y a 4h de IMO; *Derecha abajo:* cuantificación del nº de neuronas IF+; *Derecha arriba:* distribución del nº de neuronas IF+ en rangos de intensidad de fluorescencia.

Este análisis mostró que la pérdida de fluorescencia al combinar la IF con la FISH se da en las neuronas pertenecientes a los rangos de intensidad más bajos, provocando una disminución de aproximadamente un 30% en el número de neuronas positivas para c-Fos en los animales expuestos a 20 minutos de IMO y de nado. No obstante, en los animales expuestos a IMO prolongada, esta disminución no es apreciable debido a que la gran mayoría de las neuronas pertenecen a rangos de intensidad más elevados. Por esta razón interpretamos que estamos identificando el total de neuronas que responden a la IMO prolongada.

Además de controlar estas variables, hemos observado que es de crucial importancia que las muestras se hayan procesado correctamente sobre todo en el momento de la congelación. De lo contrario, en el momento de visualizar las imágenes, aparece un fondo inespecífico irregular que dificulta enormemente el análisis y disminuye considerablemente la calidad de los datos obtenidos. Para solucionar este problema hemos realizado pruebas con distintos métodos de congelación de las muestras perfundidas entre los cuales la inmersión en isopentano enfriado a -50°C con nieve carbónica dio los mejores resultados.

Protocolo de doble marcaje IF-FISH

El KPBS utilizado en la IF y el resto de soluciones utilizadas en la FISH hasta la aplicación de la sonda radiactiva fueron pre-tratadas con (DEPC) y esterilizadas mediante autoclavado antes de su utilización.

Las secciones se lavaron con KPBS para retirar la solución anticongelante y se incubaron directamente con un anticuerpo policlonal obtenido en conejo contra c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, USA) a una concentración de 1:500 en una solución al 1% de Blocking Reagent (Roche) en KPBS durante 16 horas a 4°C . Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados en KPBS y posteriormente las secciones se incubaron en anticuerpo contra Ig-G de conejo marcado con fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen, USA) a una concentración de 1:500, durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 3 lavados en KPBS y antes de montar las secciones en portaobjetos. Una vez introducido el fluorocromo se tomó la precaución de evitar al máximo la incidencia de luz sobre las muestras.

A diferencia de la FISH descrita anteriormente, para este doble marcaje se redujo el tiempo de digestión proteica mediante Proteinasa K de 15 a 8 minutos. El resto del proceso, incluida la detección y la amplificación fueron idénticos.

Inmunofluorescencia para la dopamina β -hidroxilasa ($D\beta H$)

Las secciones se lavaron con KPBS para retirar la solución anticongelante. La unión inespecífica se minimizó con un tampón de bloqueo compuesto por FCS al 3%, BSA al 2% y Triton X-100 al 0.4% en KPBS. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal obtenido en ratón contra $D\beta H$ (MAB-308, Millipore, USA) a una concentración de 1:2000 en una solución de BSA al 2% y Triton X-100 al 0.4% en KPBS durante 16 horas a 4°C . Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados en KPBS y seguidamente las secciones se incubaron en anticuerpo contra Ig-G de ratón marcado con fluorocromo Alexa-568 (Invitrogen, USA) a una concentración de 1:500, durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 3 lavados en KPBS antes de montar las secciones en porta-objetos. Se realizó un último lavado con agua destilada y los porta-objetos se dejaron secar a temperatura ambiente antes de ser montados usando un medio de montaje de base acuosa (Fluoromount, Sigma-Aldrich) y sellados con un medio de montaje

rápido (Entellan, Merk). Los portaobjetos se conservaron a 4° C hasta la captura de imagen mediante microscopía confocal.

Captura y análisis de imágenes

Para delimitar las coordenadas de análisis en cada ensayo se utilizaron los atlas estereotáxicos de Paxinos & Watson (1998 y 2007).

ISH radiactiva

Las imágenes se capturaron mediante un microscopio NIKON Eclipse E400 equipado con una cámara DMX 1200. Para comprobar que el tiempo de exposición a las películas había sido el necesario para su correcto análisis densitométrico, se realizaron y cuantificaron en cada caso fotografías de exposiciones de secciones que mostraban una intensidad alta, media y baja. Las unidades arbitrarias obtenidas se interpolaron en gráficas de saturación realizadas mediante una microescala autoradiográfica de ¹⁴C que se fotografió y cuantificó en las mismas condiciones, comprobando que los distintos valores se situaran en la parte lineal de la gráfica, ideal para su cuantificación. Los niveles de mRNA de c-fos fueron determinados semicuantitativamente en al menos 6 secciones por área y animal utilizando el programa informático Scion Image (Scion Corporation). Los valores de DOI resultantes fueron expresados en unidades arbitrarias. Todas las muestras que se compararon estadísticamente fueron procesadas en el mismo análisis para evitar la variabilidad inter-ensayo.

FISH

Las imágenes se capturaron con un microscopio NIKON Eclipse 90i equipado con una cámara DMX 1200F. Para el procesamiento y el análisis de las imágenes se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (FIJI, versión 1.47f). Los valores de DOI resultantes fueron expresados en unidades arbitrarias (UA). Los niveles de mRNA de c-fos fueron determinados semicuantitativamente en al menos 4 secciones por área y animal. También se determinó el número de neuronas mediante cuantificación manual y la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas para distribuir las en histogramas con diferentes rangos de DOI.

Doble marcaje IF-FISH

Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5. Para el procesamiento y el análisis de las proyecciones suma obtenidas se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (FIJI, versión 1.47f). Se determinó el número de células para cada marcaje, distribuyéndolas en neuronas positivas para mRNA y proteína (IF/FISH positivas para mRNA y negativas para proteína (RNA+/Fos-); y negativas para mRNA y positivas para proteína (RNA-/Fos+).

Inmunofluorescencia para la D β H

Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5. Para el procesamiento y el análisis de las proyecciones suma obtenidas se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (FIJI, versión 1.47f). Para este análisis, se determinaron los niveles de DOI de la señal específica.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa informático SPSS (*Statistical Package for Social Science* versión 17) para el sistema operativo Windows.

Cuando la distribución de los datos se ajustó a la normalidad y se cumplió la igualdad de varianzas se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando no se cumplía este último requisito se recurrió a la transformación logarítmica. Si a pesar de la transformación logarítmica no se cumplía la igualdad de varianzas se recurrió al análisis mediante el modelo lineal generalizado (GzLM). En el ANOVA, las comparaciones más pertinentes se realizaron a priori o a posteriori dependiendo de la existencia de una hipótesis previa. En todos los casos, la significación en las comparaciones fue corregida mediante el test de Bonferroni secuencial (Holm, 1979). Las diferencias significativas se consideraron a partir de $p < 0,05$. Todos los datos se representaron como la media y el error estándar de la media (SEM).

Para poder estudiar las diferencias en la expresión de *c-fos* y del hnRNA de CRF en el experimento 1, utilizamos un GzLM con un factor entre-sujeto ("GRUPO", con 5 categorías). En el caso de encontrarse un efecto global del grupo se realizaron los contrastes a posteriori. Las diferencias en los niveles de ACTH se estudiaron mediante un GzLM de medidas repetidas (Hardin e Hilbe, 2003), con un factor entre-sujeto ("GRUPO", con 2 niveles: CONTROL e IMO) y un factor intra-sujeto ("TIEMPO", con 3 niveles: 20 minutos post-IMO, 4 h post-IMO, y post-nado). Cuando se observó una interacción entre ambos factores, ésta se descompuso para estudiar el origen de la interacción.

En el experimento 2, cuando la distribución de los datos se ajustó a la normalidad y se cumplió la igualdad de varianzas el análisis se realizó mediante el modelo general lineal (GLM) de una vía (factor "GRUPO" con 6 categorías) con comparaciones programadas a priori, ya que en este caso contamos con una hipótesis previa. Para los histogramas de distribución en rangos de intensidad, se comparó el número de células por cada rango de intensidad mediante una "t" de Student entre los distintos grupos experimentales.

En el experimento 3, para estudiar la interacción entre el estrés y la administración del DSP-4, se utilizó un GzLM con dos factores entre-sujeto: "ESTRÉS", con 4 niveles y "FARMACO", con 2 niveles. Cuando se observó una interacción entre ambos factores, ésta se descompuso para estudiar las diferencias. En el análisis del efecto del DSP-4 sobre la distribución de células en intervalos de DOI se utilizó una "t" de Student.

capítulo

Caracterización de la **respuesta** a una nueva situación estresante tras una **exposición prolongada a la IMO**

1

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Considerando que: (a) *la activación de c-fos es similar en muchas áreas del SNC en respuesta a estímulos estresantes emocionales de naturaleza e intensidad diferente*; y (b) *se observa una disminución progresiva y generalizada de la expresión de c-fos y en la actividad del eje HPA, tanto a nivel central como periférico, con la exposición prolongada a un mismo estímulo estresante*, nuestras hipótesis son las siguientes:

- (1) Es muy probable que en muchas zonas del SNC la mayor parte de las neuronas que muestran activación con *c-fos* sean comunes a diferentes estímulos estresantes.
- (2) La reducción progresiva de la expresión de *c-fos* podría obedecer, bien a cambios en las señales estimuladoras y/o inhibitoras que llegan a la neurona como consecuencia de la exposición prolongada al estímulo estresante, bien a mecanismos específicos de inhibición intracelular de la expresión de *c-fos*.
- (3) La existencia de uno u otro mecanismo podría depender del área concreta del SNC, siendo el primer mecanismo más probable en los niveles jerárquicos superiores del SNC (v.g. corteza prefrontal) y el segundo más en los niveles inferiores (v.g. PVN).
- (4) Una aproximación experimental simple para distinguir entre ambas posibilidades consistiría en exponer a los animales previamente sometidos a un estímulo estresante prolongado (IMO), a una nueva situación estresante (nado forzado). Si la hipótesis de la inhibición intracelular es correcta, la respuesta al nuevo estímulo debería estar mayoritariamente bloqueada, en tanto que si la respuesta depende mayormente de las señales que llegan a las neuronas, la expresión se restablecería en gran medida.

Objetivos

- (1) Confirmar que la exposición prolongada a un estímulo estresante de tipo emocional da lugar a una reducción progresiva de la expresión de *c-fos* en núcleos claves para la integración de la respuesta al estrés emocional (mPFC, LSv, MeA y PVN) y también a una disminución de la activación inicial en variables relacionadas con el eje HPA.
- (2) Analizar si tras la exposición prolongada a una situación estresante (IMO) las neuronas son capaces de activarse de nuevo, en términos de expresión de *c-fos* y de CRF, en respuesta a un nuevo estímulo estresante (nado forzado).
- (3) Comparar la activación central del eje HPA (expresión de *c-fos* y CRF en el PVN) con la respuesta periférica (niveles plasmáticos de ACTH), en las condiciones anteriormente comentadas.

Experimento 1

Procedimiento experimental

Los animales (n=40) se dividieron en 5 grupos experimentales:

- (1) **Grupo CONTROL (n=8):** permanecieron en las cajas sin recibir ningún tratamiento.
- (2) **Grupo IMO 20 min (n=8):** inmovilizados durante 20 minutos.
- (3) **Grupo NADO 20 min (n=8):** expuestos al nado forzado durante 20 minutos.
- (4) **Grupo IMO 4 h (n=8):** inmovilizados durante 4 horas.
- (5) **Grupo IMO+NADO (n=8):** primeramente inmovilizados durante 3h y 40 minutos y expuestos al nado forzado durante 20 minutos más.

Inmediatamente después de los procedimientos de estrés (o en condiciones basales en el caso de los controles), los animales fueron anestesiados y perfundidos. Terminada la perfusión se extrajeron los cerebros y se procesaron para su análisis histológico mediante hibridación *in situ* radiactiva (ISH) del mRNA de *c-fos* en el mPFC (Cin, PrL e IL), LSv, MeA y PVN (mPVN y mpdPVN) y del hnRNA de CRF en el mpdPVN.

Para estudiar las diferencias en la expresión de *c-fos* y del hnRNA de CRF en el experimento 1, utilizamos un modelo lineal generalizado (GzLM) con un factor entre-sujeto ("GRUPO", con 5 categorías). En el caso de encontrarse un efecto global del factor "GRUPO", se realizó el contraste a posteriori de Bonferroni secuencial (Holm, 1979).

Resultados

Análisis de la expresión de *c-fos* mediante ISH radiactiva

El análisis estadístico de los niveles de expresión de *c-fos*, medidos como densidad óptica integrada (DOI) (**Figs. 12-15**; imágenes representativas en **Figs. 11**, primera y segunda columnas) mediante GzLM mostró un efecto significativo del factor grupo sobre la expresión del mRNA de *c-fos* en todas las áreas estudiadas: Cg1 (Wald $\chi^2 = 77.2$; $p < 0.001$); PrL (Wald $\chi^2 = 82.94$; $p < 0.001$); IL (Wald $\chi^2 = 76.54$; $p < 0.001$); LSv (Wald $\chi^2 = 113.13$; $p < 0.001$); MeA (Wald $\chi^2 = 251.15$; $p < 0.001$); mPVN (Wald $\chi^2 = 58.04$; $p < 0.001$); mpdPVN (Wald $\chi^2 = 204.77$; $p < 0.001$).

El número de comparaciones a posteriori, corregidas mediante el test de Bonferroni secuencial, se restringió a aquellas más relevantes de cara a los objetivos del experimento: TODOS vs. BASAL; IMO 20 min vs. IMO 4h; IMO 20min vs. NADO 20 min; IMO 4h vs. IMO+NADO; NADO 20 min vs. IMO+NADO. Todos los grupos de animales estresados fueron significativamente superiores al basal en todas las áreas. Tras la elevación de los niveles de mRNA observada a los 20 minutos de exposición a la IMO, éstos disminuyeron significativamente en todas las áreas a las 4 h de IMO. La exposición a 20 minutos de IMO resultó en niveles de expresión significativamente mayores que los obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado en la MeA y en las dos subregiones del PVN, no observándose diferencias significativas en el resto de las áreas. La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras casi 4 h de IMO en todas las áreas estudiadas; sin embargo, los niveles obtenidos en el mpdPVN fueron significativamente menores a los observados en los animales únicamente expuestos a 20 minutos de nado.

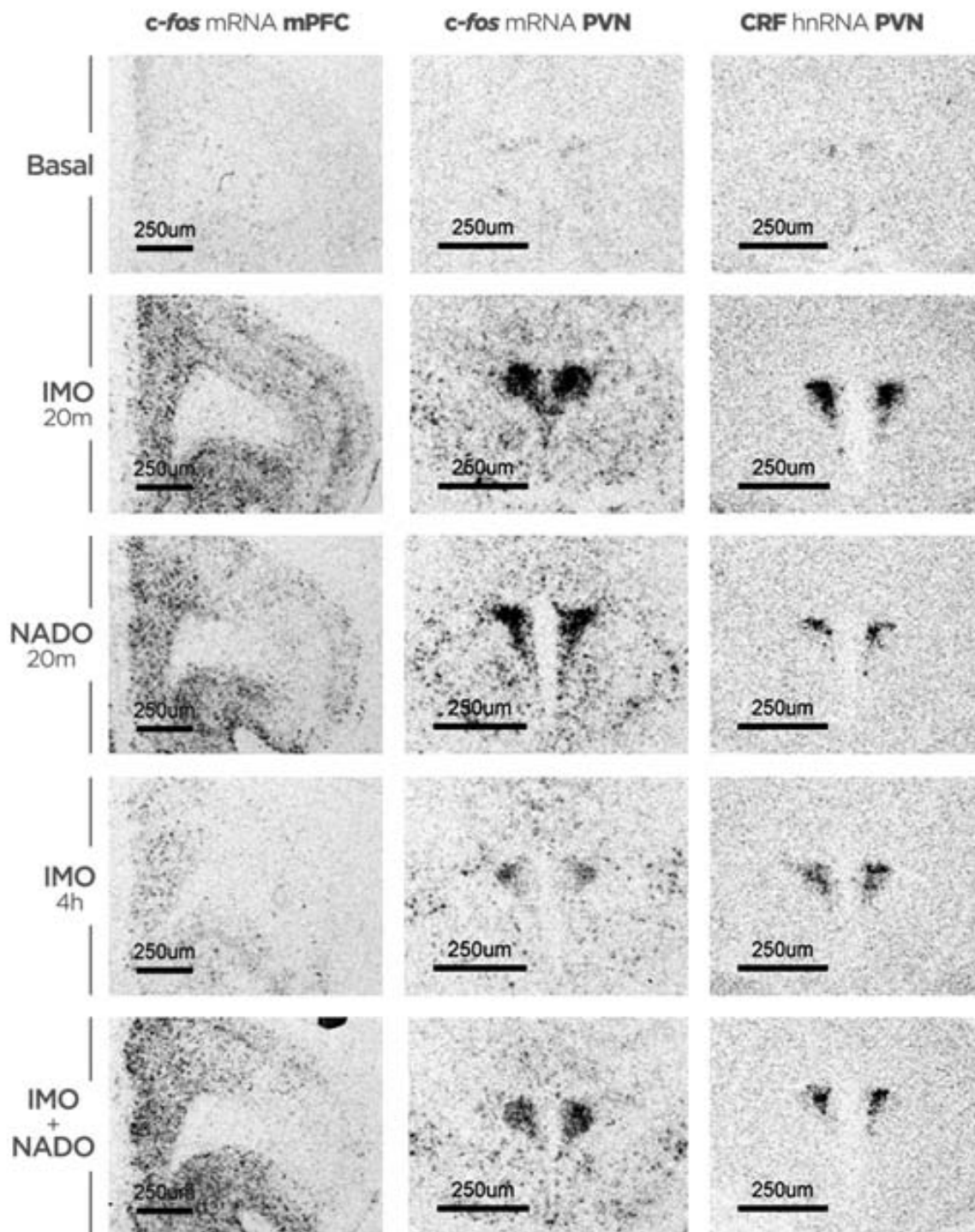


Figura 11. **Autorradiografías representativas de los niveles del mRNA de *c-fos* en el mPFC y el PVN , y del hnRNA de CRF en el PVN.**

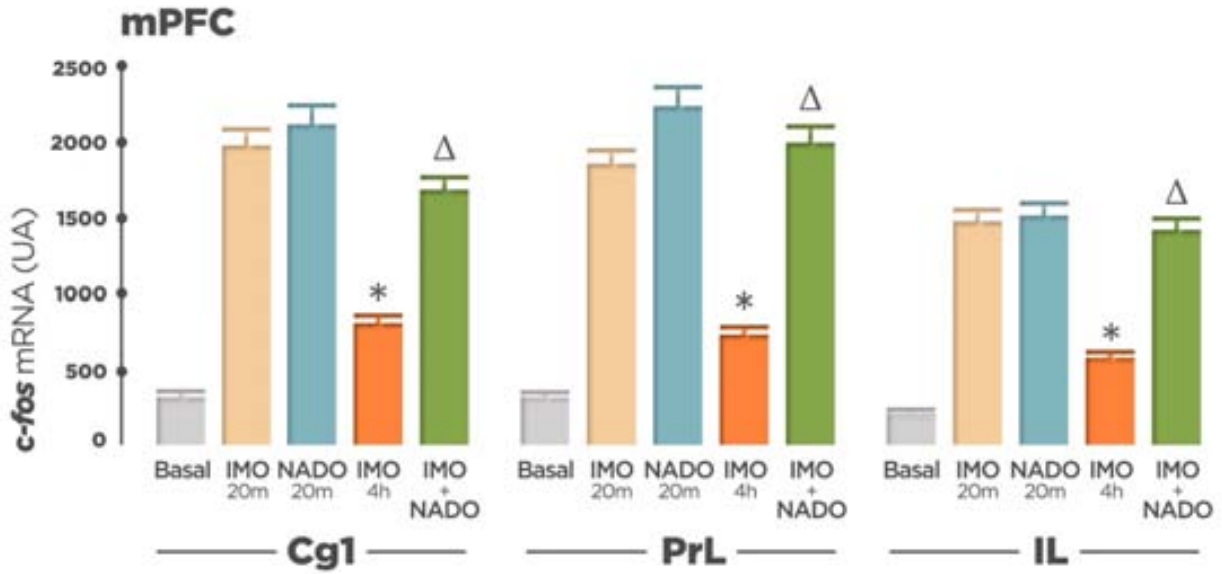


Figura 12. **Cuantificación de los niveles del mRNA de c-fos en el mPFC.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (n = 7-8). Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas, salvo el grupo IMO 4 h en el IL.

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h.

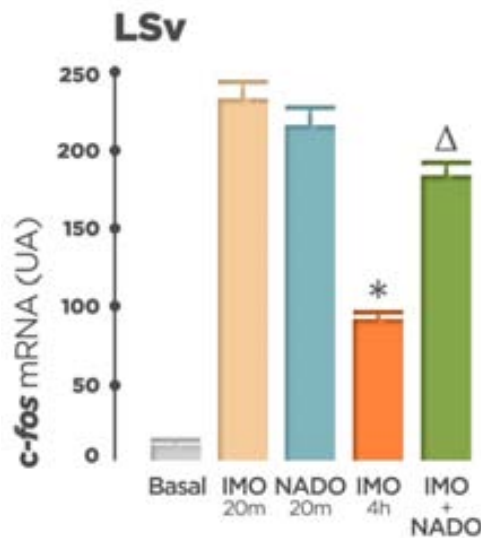


Figura 13. **Cuantificación de los niveles del mRNA de c-fos en el LSv.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (n = 7-8). Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas (no se indican).

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h.

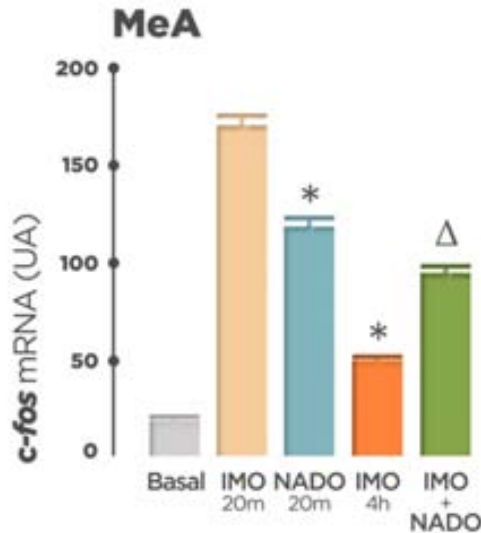


Figura 14. **Cuantificación de los niveles del mRNA de c-fos en la MeA.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (n = 7–8). Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas (no se indican).

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h.

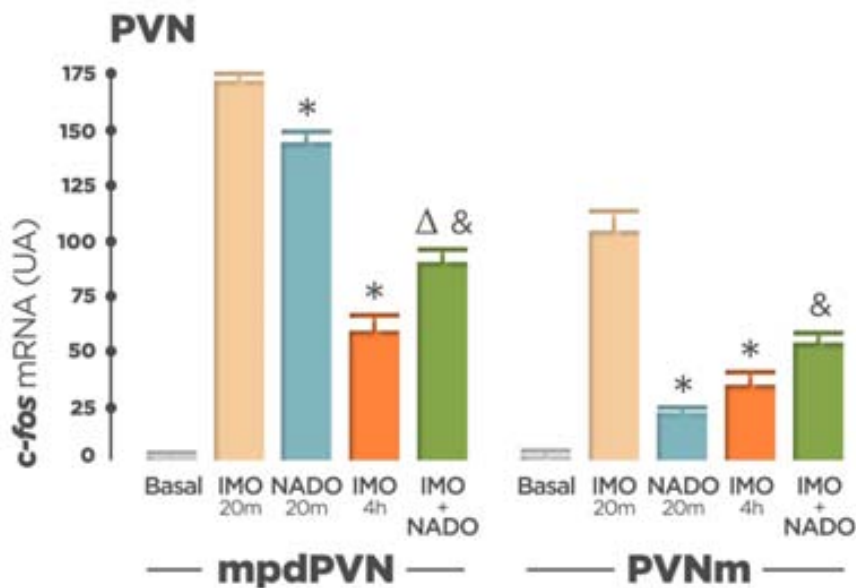


Figura 15. **Cuantificación de los niveles del mRNA de c-fos en el PVN.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (n = 7–8). Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas salvo el grupo NADO 20 min en el mpPVN (no se indican).

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; & indica diferencias significativas vs. NADO 20 min.

Análisis de la expresión de CRF

El análisis estadístico de los niveles del hnRNA de CRF (**Fig. 16**; imágenes representativas en **Figs. 11**, tercera columna) mediante GzLM mostró un efecto significativo del factor grupo sobre la expresión del hnRNA de CRF en el mpdPVN (Wald $\chi^2 = 52.83$; $p < 0.001$). Las comparaciones a posteriori fueron las mismas que en caso del mRNA de *c-fos*. Tras 20 minutos de exposición a la IMO los niveles de hnRNA se incrementaron con respecto a los niveles basales, disminuyendo significativamente tras 4 h de IMO.

Así mismo, la exposición a 20 minutos de IMO resultó en niveles significativamente mayores a los obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado. La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada no mostró valores significativamente diferentes de los obtenidos con una sola exposición a 20 minutos de nado o tras 4 h de IMO.

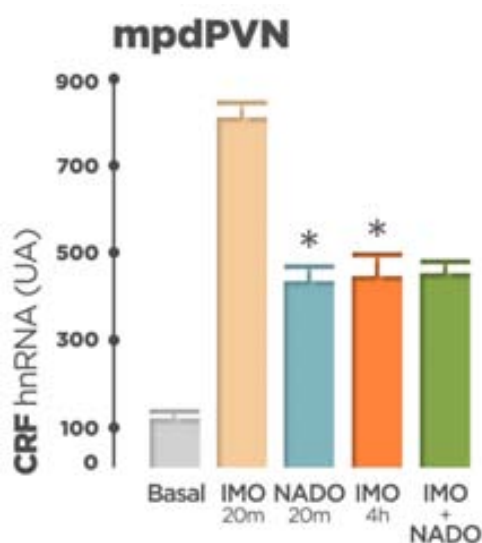


Figura 16. **Cuantificación de los niveles del hnRNA de CRF en el mpdPVN.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas ($n = 7-8$). Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas (no se indican).

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min o indica diferencias significativas vs. NADO 20 min.

Experimento 2

Procedimiento experimental

Los animales (n=16) se dividieron en dos grupos experimentales:

- (1) **Grupo IMO+NADO (n=8):** Las ratas fueron inmovilizadas durante 4 horas, realizando tomas de muestra a los 20 minutos y a las 4 h del inicio de la IMO. Tras la última toma de muestra, las ratas fueron expuestas a 20 minutos de nado forzado, con otra toma de muestra al finalizar dicha exposición.
- (2) **Grupo CONTROL (n=8):** Las ratas permanecieron en sus cajas hasta el momento de la toma de muestra, que se realizó a los 20 minutos y a las 4 h, equivalentes a las tomas de muestra del grupo IMO+NADO. A continuación, fueron expuestas a 20 minutos de nado forzado, con una última toma de muestra al finalizar esta prueba.

Las muestras obtenidas se distribuyeron en alícuotas para la determinación de los niveles de ACTH mediante radioinmunoanálisis (RIA).

Las diferencias en los niveles de ACTH se estudiaron mediante un GzLM de medidas repetidas (Hardin e Hilbe, 2003), con un factor entre-sujeto (“GRUPO”, con 2 niveles: CONTROL e IMO) y un factor intra-sujeto (“TIEMPO”, con 3 niveles: 20 minutos post-IMO, 4 h post-IMO, y post-nado). En el caso de encontrarse un efecto global del factor GRUPO, se realizó el contraste a posteriori de Bonferroni secuencial (Holm, 1979). Cuando se observó una interacción entre ambos factores, ésta se descompuso, estudiando las diferencias entre los dos grupos para cada tiempo ($p < 0.05$).

Resultados

Análisis de los niveles plasmáticos de ACTH

El análisis estadístico de los niveles de ACTH (**Fig. 17**) mediante GzLM mostró efectos significativos del factor grupo (Wald $\chi^2 = 168.94$; $p < 0.001$), del factor tiempo (Wald $\chi^2 = 110.18$; $p < 0.001$) y de la interacción entre ambos factores (Wald $\chi^2 = 163.95$; $p < 0.001$). El número de comparaciones a posteriori, corregidas mediante el test de Bonferroni secuencial, se restringió a aquellas más relevantes de cara a los objetivos del experimento: grupos CONTROL no estresados vs. grupos estresados; IMO 20 min vs. IMO 4h; IMO 20 min vs. NADO 20 min; IMO 4h vs. IMO+NADO; NADO 20 min vs. IMO+NADO.

Tras 20 minutos de exposición a la IMO, los niveles de ACTH se incrementaron con respecto a los niveles basales, disminuyendo significativamente tras 4 h de IMO. Así mismo, la exposición a 20 minutos de IMO resultó en niveles significativamente mayores que los obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado. La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada no causó ningún incremento adicional de los niveles de ACTH que quedaron claramente por debajo de los niveles de los animales sólo expuestos a 20 minutos de nado.

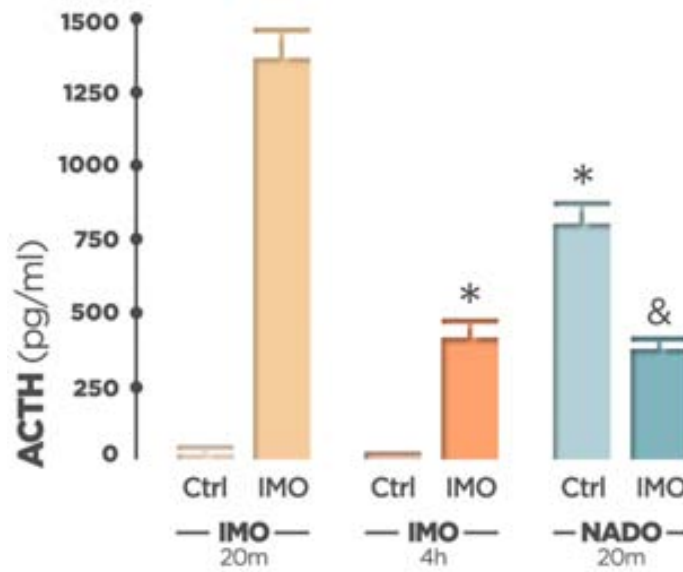


Figura 17. **Cuantificación de los niveles plasmáticos de ACTH.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar (n = 8).

Los grupos fueron comparados mediante GzLM. Las diferencias respecto a los grupos no estresados fueron siempre significativas (no se indican).

* indica diferencias significativas vs. IMO 20min;

& indica diferencias significativas vs. NADO 20 min.

capítulo

¿se activan las mismas
poblaciones neuronales
en respuesta
a la **IMO** y
el **nado**?

2

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

- (1) Considerando que *áreas como el mPFC, el LSv, la MeA y en menor medida el PVN, son capaces de activarse en respuesta a una nueva situación estresante (nado forzado) aplicado tras la IMO prolongada*, una interpretación correcta de estos datos nos obliga a valorar fundamentalmente las siguientes posibilidades:
 - a) Las neuronas que se activaron durante la IMO se encontrarían en su mayor parte bloqueadas para responder a una nueva situación estresante. De esta manera la exposición al nado provocaría la activación de nuevas neuronas específicamente asociadas al nuevo estímulo.
 - b) Las poblaciones neuronales que se activaron durante la IMO prolongada no se encontrarían bloqueadas sino que dejaron de recibir señales estimuladoras. En condiciones adecuadas, serán capaces de activarse nuevamente. De esta manera, tanto la exposición a la IMO como al nado implicaría la activación de las mismas poblaciones neuronales.
- (2) *Si la exposición a 20 minutos de nado forzado tras la IMO prolongada provoca la activación de poblaciones neuronales específicas para este estímulo estresante*, una posibilidad para distinguir las de otras poblaciones que pudieran activarse por la propia manipulación del animal o debido a la liberación de la IMO, sería comparar la respuesta de estos animales con la obtenida en animales liberados de la IMO prolongada y expuestos de nuevo 20 minutos más a la IMO

Objetivos

- (1) Caracterizar la respuesta a la IMO prolongada y al nado forzado en términos de expresión de *c-fos* distinguiendo, mediante un estudio de doble marcaje utilizando inmunofluorescencia (IF) para la proteína c-Fos e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de su mRNA, las poblaciones neuronales activadas en respuesta a ambos estímulos (IF+/ FISH+) de las activadas exclusivamente con el nado (IF-/ FISH+)
- (2) Complementar los resultados mediante un estudio de FISH simple del mRNA de *c-fos* teniendo en cuenta el número de neuronas activadas y el grado de activación de las mismas en respuesta a los distintos estímulos estresantes.
- (3) Realizar una revisión de la validez de la técnica de doble marcaje para identificar poblaciones celulares que se activan en respuesta a estímulos distintos y/o aplicados secuencialmente. Estos resultados se incluyen en un apartado de *consideraciones metodológicas* en la discusión.

Procedimiento experimental

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 8 semanas de edad al inicio del experimento y se siguió el mismo procedimiento general que en experimentos anteriores. Los animales se distribuyeron en seis grupos experimentales según peso corporal, madre y fecha de nacimiento.

- (1) **Grupo CONTROL (n=4):** permanecieron en las cajas sin recibir ningún tratamiento.
- (2) **Grupo IMO 20 min (n=8):** inmovilizados durante 20 minutos.
- (3) **Grupo NADO 20 min (n=8):** expuestos al nado forzado durante 20 minutos.
- (4) **Grupo IMO 4 h (n=6): inmovilizados durante 4 horas.**
- (5) **IMO+IMO (n=6):** primeramente inmovilizados durante 3h 40 minutos, desinmovilizados y re-expuestos a la IMO durante 20 minutos más.
- (6) **Grupo IMO+NADO (n=8):** primeramente inmovilizados durante 3h 40 minutos y expuestos al nado forzado durante 20 minutos más.

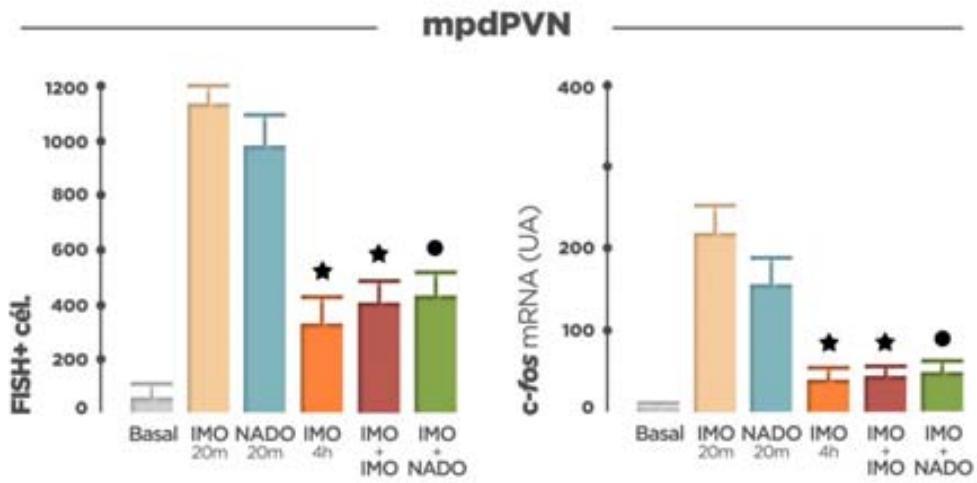
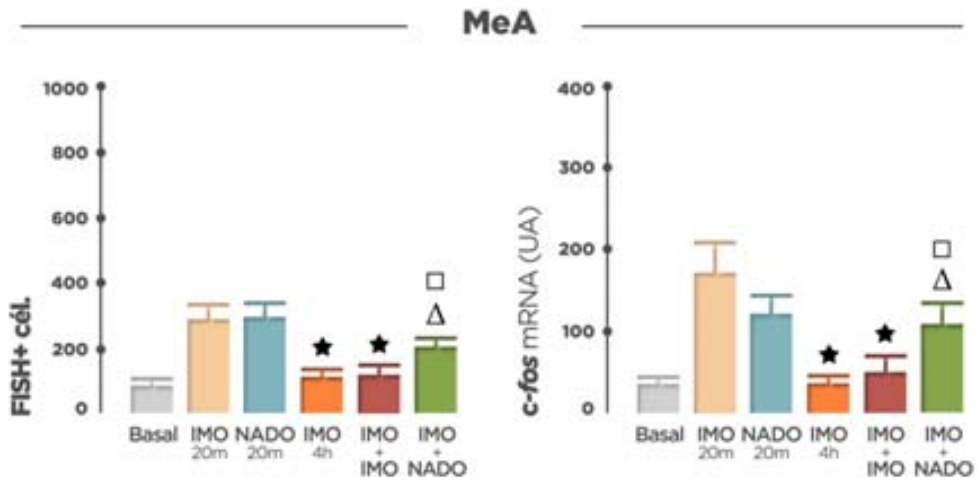
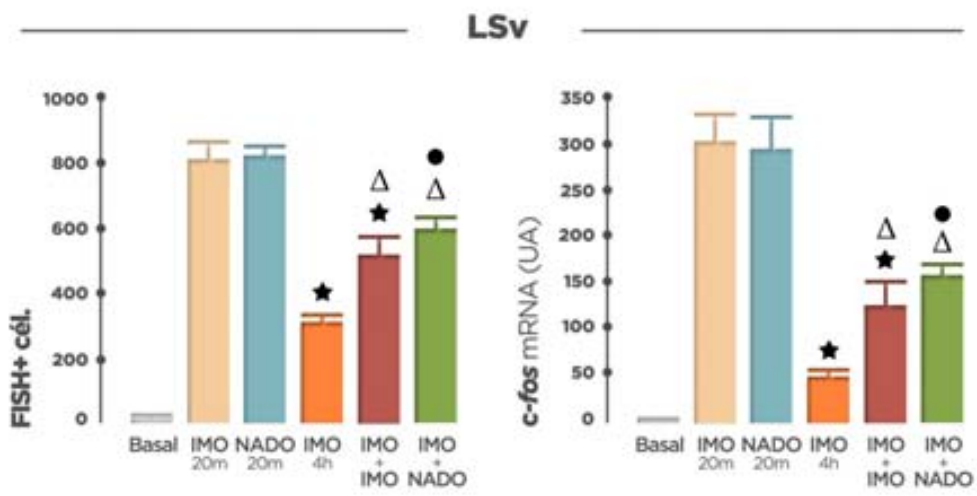
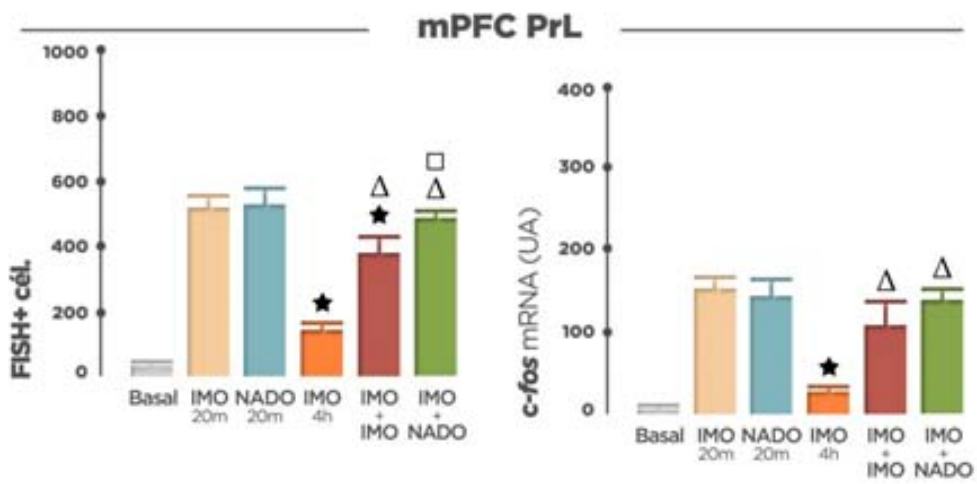
Inmediatamente después de los procedimientos de estrés (o en condiciones basales en el caso de los controles), los animales fueron anestesiados y perfundidos. Terminada la perfusión se extrajeron los cerebros y se procesaron para su análisis histológico mediante FISH simple y mediante doble marcaje IF-FISH en el mPFC (subdivisión PrL), LSv, MeA y PVN (subdivisión mpdPVN).

Resultados

Análisis de la expresión de *c-fos* mediante FISH

La expresión de *c-fos* se valoró mediante el uso de dos parámetros complementarios: 1) el nº de neuronas positivas para el mRNA de *c-fos* por mm² (FISH+/mm²) y 2) la DOI total (UA) de las imágenes obtenidas (**Fig. 18**). Para examinar con mayor detalle las posibles diferencias entre grupos, se cuantificó individualmente la intensidad de las neuronas FISH+ y éstas se distribuyeron en diferentes rangos de intensidad mediante histogramas (**Figs. 19A y 19B**).

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del factor grupo sobre el número de neuronas FISH+ en todas las áreas estudiadas: PrL [F(4, 31) = 16.56; p < 0.001]; LSv [F(4, 31) = 29.38; p < 0.001]; MeA [F(4, 31) = 7.48; p < 0.001]; mpdPVN [F(4, 31) = 17.71; p < 0.001]. Así mismo, el factor grupo también tuvo un efecto significativo sobre la DOI de la fluorescencia de las imágenes: PrL [F(4, 31) = 8.39; p < 0.001]; LSv [F(4, 31) = 20.05; p < 0.001]; MeA [F(4, 31) = 8.07; p < 0.001]; mpdPVN [F(4, 31) = 9.96; p < 0.001]. A parte de la comparación de todos los grupos con el BASAL, el número de comparaciones a priori programadas se restringió a aquellas más relevantes de cara a los objetivos del experimento: 1) IMO 20 min vs. NADO 20 min; 2) IMO 4h vs. IMO 20 min; 3) IMO+IMO vs. IMO 20 min; 4) IMO 4h vs. IMO+IMO; 5) IMO 4h vs. IMO+NADO; 6) IMO+IMO vs. IMO+NADO; 7) NADO 20 min vs. IMO+NADO.



← Figura 18. **Cuantificación del número de neuronas FISH+ por mm² y de los niveles de DOI** de las imágenes en unidades arbitrarias (UA) en mPFC, LSv, MeA y PVN en el análisis mediante FISH simple

Los valores están expresados como la media y el error estándar de los valores obtenidos (basales n = 4, resto de grupos n = 6/8). Los grupos fueron comparados mediante ANOVA y contrastes a priori.

Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas salvo en los grupos IMO 4 h e IMO+IMO en la MeA.

★ indica diferencias significativas vs. IMO 20 min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; ● indica diferencias significativas vs. NADO 20 min; □ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO

En ambos parámetros, todos los grupos de animales estresados fueron significativamente diferentes respecto al basal en todas las áreas salvo en caso de la MeA en los grupos IMO 4 h e IMO+IMO. Tras la elevación de los niveles de expresión de *c-fos* observada a los 20 minutos de exposición a la IMO, éstos disminuyeron significativamente en todas las áreas tras 4 h de IMO. En ningún área los valores obtenidos con la exposición a 20 minutos de IMO difirieron significativamente de los obtenidos con 20 minutos de nado.

La re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO en PrL y LSv (FISH+/mm² y DOI). No obstante, en el PrL los valores de DOI fueron equivalentes a los obtenidos tras la exposición única a 20 minutos de IMO mientras que el número de neuronas FISH+ quedó por debajo. En el LSv, ambos parámetros quedaron por debajo del grupo expuesto a 20 minutos de IMO

La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores de ambos parámetros significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO en todas las áreas estudiadas salvo en el mpdPVN. Tan sólo en el PrL (sólo FISH+/mm²) y la MeA (FISH+/mm² y DOI) los niveles fueron equivalentes a los observados en los animales únicamente expuestos a 20 minutos de nado y significativamente mayores a los obtenidos con la re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada. Por lo tanto estos resultados reflejan una activación específica con el nado.

En el caso de los histogramas de distribución en rangos de intensidad, se comparó el número de neuronas por cada rango de intensidad (t de Student) entre los siguientes grupos experimentales: 1) IMO 20min vs. NADO 20 min; 2) IMO 4h min vs. IMO+IMO; 3) IMO 4h vs. IMO+NADO; 4) IMO+IMO vs. IMO+NADO. Solamente en el LSv se encontraron diferencias entre los valores obtenidos con la exposición a 20 minutos de IMO y los obtenidos con 20 minutos de nado, resultando mayores con el nado en el 2º rango de intensidad.

Sólo se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos a 4 horas de IMO prolongada y los re-expuestos a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada en el mPFC (rangos 1 y 2) y en el LSv (rangos 1 a 3). En cuanto a las diferencias entre los animales expuestos a 4 horas de IMO prolongada y los expuestos a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada, sólo se observaron en el mPFC (rangos 1 a 4), el LSv (rangos 1 a 3) y la MeA (rango 2). Sólo en el mPFC y la MeA (rangos 1 y 2) se observaron diferencias significativas entre los animales re-expuestos a 20 minutos de IMO y los expuestos a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada.

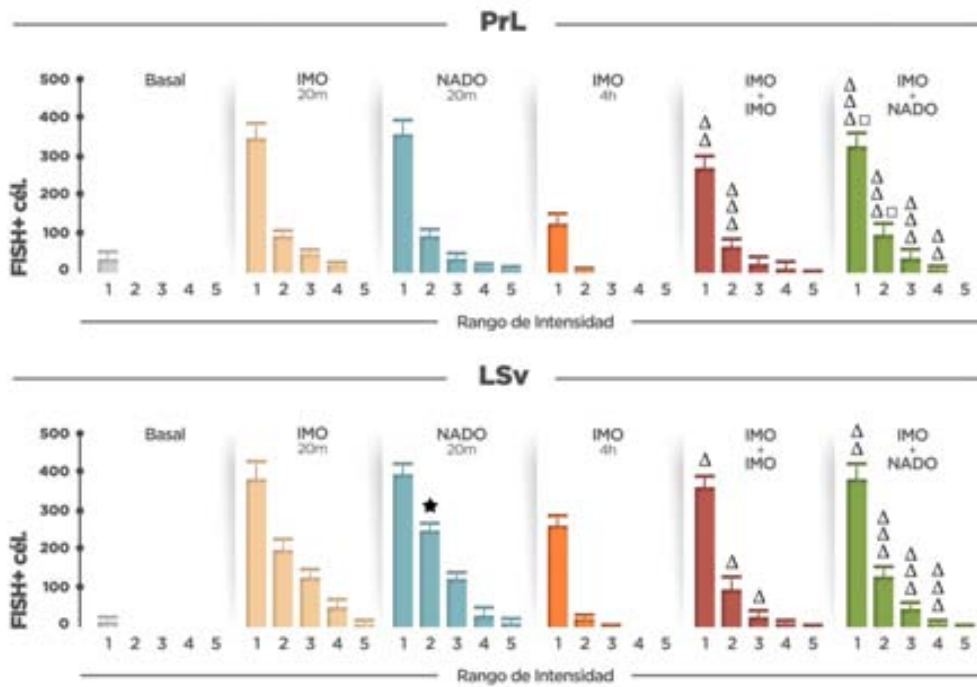


Figura 19A. **Distribución de las neuronas FISH+ en rangos de intensidad en PrL y LSv en el análisis mediante FISH simple.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar (basales n = 4, resto de grupos n = 6-8). El número de neuronas FISH+ por cada rango de intensidad fue comparado mediante “t” de Student entre los distintos grupos experimentales.

★ indica diferencias significativas vs. IMO 20 min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; □ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

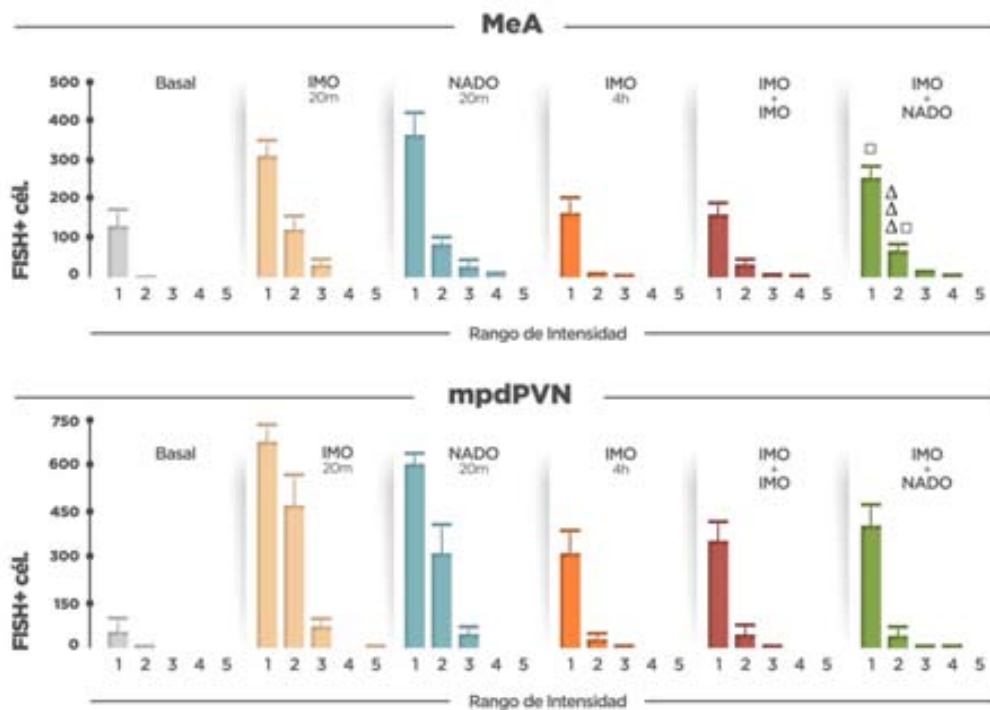


Figura 19B. **Distribución de las neuronas FISH+ en rangos de intensidad en MeA y mpdPVN en el análisis mediante FISH simple.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar (basales n = 4, resto de grupos n = 6-8). El número de neuronas FISH+ por cada rango de intensidad fue comparado mediante “t” de Student entre los distintos grupos experimentales.

Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; □ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

Identificación de las neuronas activadas con la exposición al nado aplicado tras la IMO prolongada mediante doble marcaje IF-FISH

Debido a la complejidad metodológica de esta técnica, decidimos analizar únicamente 2 animales basales y 4 animales para el resto de los grupos. En este estudio se cuantificaron tres parámetros; 1) el número de neuronas positivas únicamente para *c-Fos* proteína (IF+/FISH-); 2) el número de neuronas doble positivas para ambos marcadores (IF+/FISH+); y 3) el número de neuronas positivas únicamente para mRNA de *c-fos* (IF-/FISH+), **Fig. 20**.

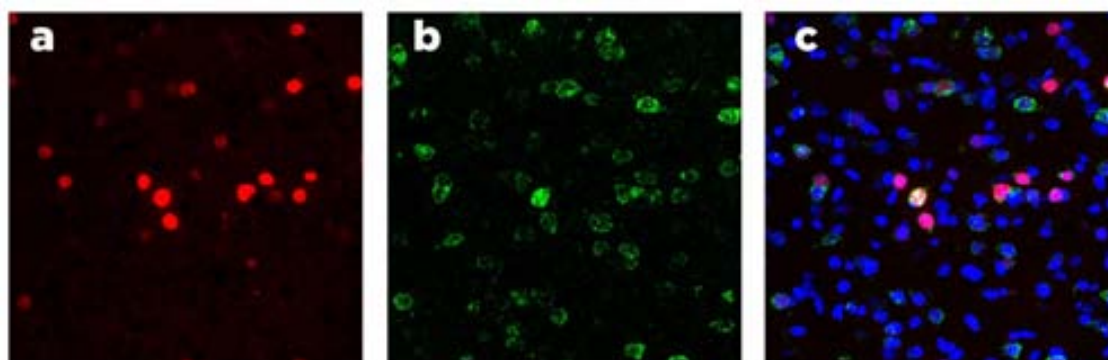


Figura 20. **Imágenes representativas del doble marcaje mediante IF-FISH de la proteína c-Fos y su mRNA en el LSv de un animal expuesto al nado tras una IMO prolongada.**

(a) Marcaje para proteína mediante IF; (b) marcaje para mRNA mediante FISH; (c) imagen compuesta incluyendo la tinción nuclear (Hoechst 33258).

Se ha repetido el análisis del número total de neuronas FISH+ (IF+/FISH+ e IF-/FISH+) para compararlo con el realizado anteriormente (**Fig. 21**). El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del factor GRUPO sobre el número total de neuronas FISH+ en PrL [$F(5, 16) = 17.28$; $p < 0.001$], el LSv [$F(5, 16) = 23.40$; $p < 0.001$], la MeA [$F(5, 16) = 46.18$; $p < 0.001$] y el mpdPVN [$F(5, 16) = 42.17$; $p < 0.001$]. Las comparaciones a priori programadas fueron las mismas que en análisis anterior. Todos los grupos de animales estresados fueron significativamente diferentes respecto al basal en todas las áreas estudiadas. Tras una elevación en el número de neuronas positivas a los 20 minutos de exposición a la IMO, los valores disminuyeron significativamente tras 4 h de IMO en todas las áreas salvo en el PrL.

En la MeA y el mpdPVN los valores obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado resultaron significativamente menores a los obtenidos con 20 minutos de IMO. Únicamente en el PrL la re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO y equivalentes a los obtenidos con la exposición a 20 minutos de IMO. La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO en todas las áreas estudiadas salvo en el LSv. En estos mismos animales y sólo en la MeA los valores obtenidos fueron equivalentes a los observados en los animales únicamente expuestos a 20 minutos de nado. Así mismo, en todas las áreas salvo el LSv, se obtuvieron valores significativamente mayores a los obtenidos con la re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada.

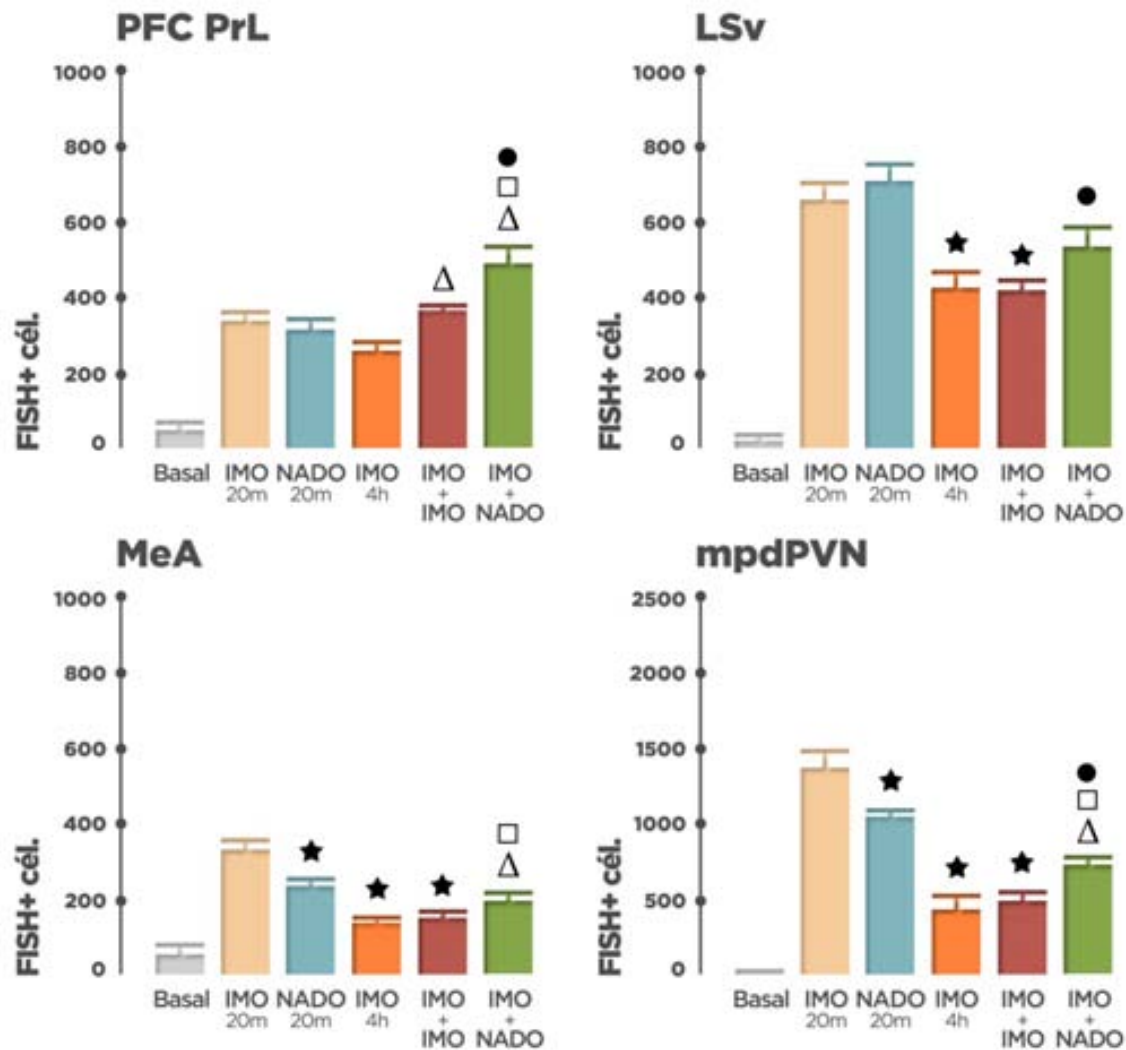


Figura 21. **Cuantificación del número de neuronas FISH+ por mm² en mPFC, LSv, MeA y PVN en el análisis de doble marcaje.**

En este caso, la captación de las imágenes se realizó mediante microscopía confocal. Los valores están expresados como la media y el error estándar (basales n = 2, resto de grupos n = 4). Los grupos fueron comparados mediante ANOVA y contrastes a priori. Las diferencias respecto al grupo BASAL fueron siempre significativas.

- ★ indica diferencias significativas vs. IMO 20 min; △ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h;
- indica diferencias significativas vs. NADO 20 min; □ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

Para valorar la existencia de efectos sumatorios de la exposición a la IMO o al nado tras la IMO prolongada en el número de neuronas reclutadas, se utilizó como parámetro la suma de todas las neuronas detectadas (IF+/FISH-, IF-/FISH+ e IF+/FISH+) (**Fig. 22, estadística A**). El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del factor GRUPO sobre el número total de neuronas en PrL [F(5, 16) = 17.28; p < 0.001], el LSv [F(5, 16) = 23.40; p < 0.001], la MeA [F(5, 16) = 46.18; p < 0.001] y el mpdPVN [F(5, 16) = 42.17; p < 0.001].

Tras una elevación generalizada en el número total de neuronas detectadas a los 20 minutos de exposición a la IMO, solamente en la MeA se observó una disminución significativa tras 4 h de IMO, produciéndose un incremento en el mpdPVN. Solamente en la MeA los valores obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado resultaron significativamente menores a los obtenidos con 20 minutos de IMO. En el PrL y en la MeA la re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO, éstos fueron menores a los obtenidos con la exposición a 20 minutos de IMO en la MeA, siendo equivalentes en el PrL. La exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos tras 4 h de IMO en todas las áreas estudiadas salvo en el mpdPVN. En todos los casos, el número de neuronas detectadas fue superior al obtenido en los animales únicamente expuestos a 20 minutos de nado. Así mismo, en todas las áreas salvo el mpdPVN, se obtuvieron valores significativamente mayores a los obtenidos con la re-exposición a 20 minutos de IMO tras la IMO prolongada.

Para valorar la participación de neuronas ya activadas durante la IMO prolongada en la respuesta a otra IMO o al nado, se utilizó como parámetro el número de neuronas positivas para ambos marcadores (IF+/FISH+) en los tres grupos de animales expuestos a la IMO prolongada (**Fig. 22, estadística B**). Sólo en el caso del mpdPVN, el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró un efecto significativo del factor GRUPO sobre el número de neuronas positivas para ambos marcadores [$F(4, 31) = 9.96$; $p < 0.05$]. En este núcleo, únicamente la exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente mayores a los obtenidos con 4 horas de IMO y con la re-exposición a 20 minutos de IMO.

Para valorar la participación de neuronas de nueva activación en la respuesta a la IMO y al nado tras la IMO prolongada se utilizó como parámetro el número de neuronas positivas únicamente para mRNA (IF-/FISH+) en los tres grupos de animales expuestos a la IMO prolongada (**Fig. 22, estadística C**). El análisis estadístico de los resultados mostró un efecto significativo del factor grupo sobre el número de neuronas IF-/FISH+ en el PrL [$F(4, 15) = 26.45$; $p < 0.001$], el LSV [$F(2, 9) = 32.73$; $p < 0.001$] y la MeA [$F(2, 9) = 13.02$; $p < 0.01$].

En el PrL, el LSV y la MeA la exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente superiores a los obtenidos tras 4 h de IMO.. Solamente en el caso del PrL la re-exposición a la IMO tras la IMO prolongada mostró valores que diferían significativamente de los obtenidos tras 4 horas de IMO. En ningún caso estos valores fueron equivalentes a los obtenidos tras una sólo exposición al nado o a la IMO durante 20 minutos (IF-/FISH+ e IF+/FISH+) En el mpdPVN no se observaron neuronas IF-/FISH+ en ninguno de los tres grupos de animales expuestos a la IMO prolongada.

Se ha realizado también la estadística para el número de neuronas únicamente positivas para proteína (IF+/FISH+) en los tres grupos expuestos a una IMO prolongada (**Fig. 22, estadística D**). En el PrL la re-exposición a la IMO mostró valores significativamente inferiores a los obtenidos tras 4 h de IMO prolongada, y la exposición al nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente superiores a los obtenidos tras la re-exposición a la IMO. En el LSV la exposición al nado tras la IMO prolongada mostró valores significativamente superiores a los obtenidos tras 4 horas de IMO sostenida.

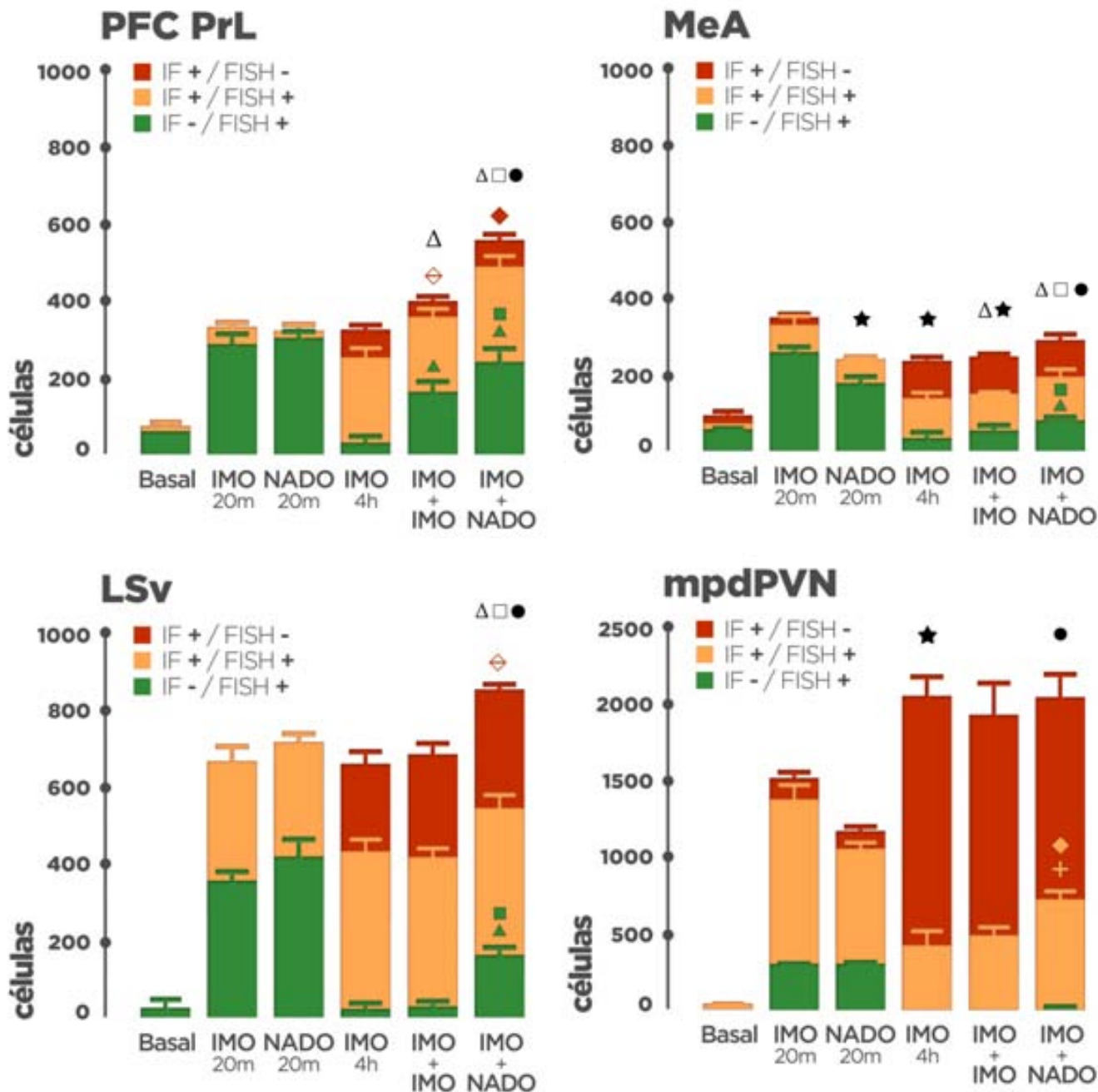


Figura 22. **Participación de neuronas ya activadas durante la IMO prolongada y de neuronas de nueva activación en la respuesta a un nuevo estímulo estresante en el análisis de doble marcaje.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de los valores obtenidos (basales n = 2, resto de grupos n = 4).

Estadística A: Total de neuronas detectadas (IF+/FISH-, IF-/FISH+ e IF+/FISH+):

- ★ indica diferencias significativas vs. IMO 20 min; Δ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h;
- indica diferencias significativas vs. NADO 20 min; □ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

Estadística B: Neuronas ya activadas durante la IMO prolongada (IF+/FISH+):

- ▲ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; ■ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

Estadística C: Neuronas de nueva activación (IF-/FISH+):

- + indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; ◆ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO.

Estadística D: Neuronas positivas únicamente para IF (IF+/FISH-):

- ◇ indica diferencias significativas vs. IMO 4 h; ◆ indica diferencias significativas vs. IMO+IMO

capítulo

Influencia de la activación del **locus coeruleus** en la inducción de **c-fos** por el estrés **emocional**

3

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

- (1) Es probable que en determinadas áreas del SNC gran parte de las neuronas activadas en respuesta al estrés lo sean como consecuencia de procesos de *arousal*, enmascarando las que son realmente importantes en la respuesta de estrés.
- (2) El LC tiene un papel fundamental en la regulación del *arousal* y la noradrenalina liberada desde las terminales provenientes de este núcleo afectaría a la expresión de *c-fos* en respuesta al estrés.
- (3) La interferencia con el sistema LC-NA podría afectar de manera diferencial a aquellas áreas sensibles a la intensidad del estrés (v.g. LSV) y a aquellas no sensibles (v.g. mPFC).

Objetivos

- (1) Confirmar la existencia dentro del SNC de áreas sensibles y no sensibles a la intensidad del estrés en términos de expresión de *c-fos*. Para ello se estudió dicha expresión en respuesta a estímulos estresantes de distinta intensidad en el mPFC, el LSV, la MeA y el PVN.
- (2) Estudiar el efecto la lesión de las terminales del LC sobre la expresión de *c-fos* en las áreas antes mencionadas. Para ello, se administró sistémicamente a los animales la neurotoxina DSP-4, conocida por causar una disminución selectiva de las terminales noradrenérgicas provenientes del LC sin afectar a las terminales provenientes de otras áreas.

Procedimiento experimental

Una semana después de su llegada, los animales (n=60) fueron distribuidos en ocho grupos experimentales dependiendo de dos factores: tratamiento farmacológico (vehículo o DSP-4) y tratamiento de estrés (basal; ambiente nuevo (NE); olor del gato o IMO). Debido al tiempo requerido para la perfusión, el experimento fue realizado en dos días: 32 animales el primer día y 28 el segundo. En ambos días se incluyeron animales representativos de cada grupo experimental.

- (1) **Grupos 1. Veh-BASAL (n=4) y 2. DSP-BASAL (n=4):** permanecieron en las cajas sin ningún tratamiento.
- (2) **Grupos 3. Veh-NE (n=8) y 4. DSP-NE (n=8):** expuestos a ambiente nuevo durante 30 minutos.
- (3) **Grupos 5. Veh-OLOR (n=8) y 6. DSP-OLOR (n=8):** expuestos a una fuente de olor del gato durante 30 minutos.
- (4) **Grupos 7. Veh-IMO (n=10) y 8. DSP-IMO (n=10):** inmovilizados durante 30 minutos.

El DSP-4 fue administrado vía intraperitoneal (IP) una semana antes de la exposición a los distintos estímulos estresantes. Los animales tratados con vehículo recibieron una inyección de solución salina autoclavada. Un animal perteneciente al sexto grupo experimental murió probablemente debido a una administración incorrecta de la droga. El comportamiento de los animales expuestos al ambiente nuevo y al olor del gato fue grabado para su posterior análisis.

Inmediatamente después de los procedimientos de estrés (o en condiciones basales en el caso de los controles), se realizó una toma de muestra de sangre para la determinación de los niveles de ACTH mediante RIA. Posteriormente, los animales fueron anestesiados y perfundidos. Termi-

nada la perfusión se extrajeron los cerebros y se procesaron para su análisis histológico. El alcance de la lesión en las terminales noradrenérgicas del LC, se estudió mediante inmunofluorescencia para la dopamina β -hidroxilasa (D β H) en el mPFC (subdivisiones Cg1, PrL e IL), el LSV, la MeA y el mpdPVN. El análisis de la expresión de *c-fos* se realizó mediante FISH del mRNA de *c-fos* en todas estas áreas. Para estudiar el alcance de la lesión generada por la administración del DSP-4 se utilizó una “t” de Student. El efecto del tratamiento con DSP-4 y de los distintos procedimientos de estrés sobre los niveles de ACTH y sobre la expresión de *c-fos* (DOI total de las imágenes), se analizó mediante GzLM con dos factores entre-sujeto: ESTRÉS (con 4 niveles) y FÁRMACO (con 2 niveles). En el caso de encontrarse un efecto global del factor ESTRÉS, se realizó el contraste a posteriori de Bonferroni secuencial (Holm, 1979). Cuando se observó una interacción entre ambos factores, ésta se descompuso para estudiar el origen de la interacción. En el caso de encontrar una interacción respecto a la expresión de *c-fos*, se realizó la cuantificación del número de neuronas y la distribución de las mismas en diferentes rangos de DOI mediante histogramas. Para el análisis de la influencia del tratamiento con DSP-4 en la distribución de neuronas en diferentes rangos de DOI se utilizó la “t” de Student.

Resultados

No se observaron efectos del tratamiento con DSP sobre la conducta de los animales expuestos al ambiente nuevo y al olor (no se muestran datos).

Alcance de la lesión con DSP-4 en las terminales noradrenérgicas del LC

El análisis estadístico de los niveles de D β H (**Fig. 23**) mostró que únicamente en el mPFC ($t(6) = 4.0$; $p < 0.01$) y en la MeA ($t(14) = 2.90$; $p < 0.05$) se dió una reducción significativa de la DOI total obtenida en los animales tratados con el fármaco.

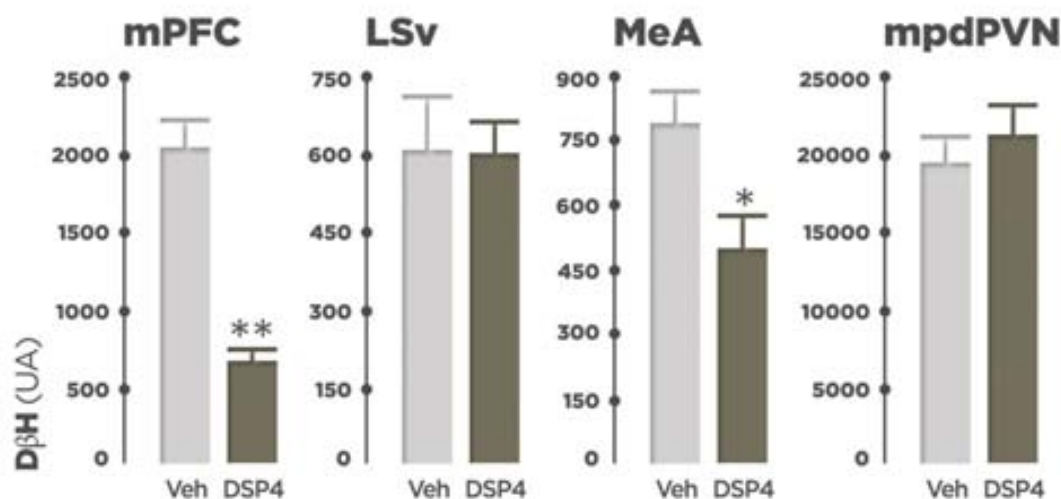


Figura 23. **Cuantificación de los niveles de DBH tras la administración del DSP-4.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (n = 8).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Análisis de los niveles plasmáticos de ACTH

El análisis estadístico de los niveles de ACTH (**Fig. 24**) mediante GzLM no mostró efecto del FÁRMACO pero sí del ESTRÉS (Wald $\chi^2 = 493.36$; $p < 0.001$). No se observó interacción entre ambos factores. Los valores obtenidos con la exposición a los distintos estímulos estresantes difirieron significativamente de los basales. Los valores obtenidos con la exposición al olor resultaron significativamente superiores a los obtenidos con la exposición al NE. Los valores obtenidos con la exposición a la IMO resultaron en valores significativamente superiores a los obtenidos con la exposición al NE y con la exposición al olor.

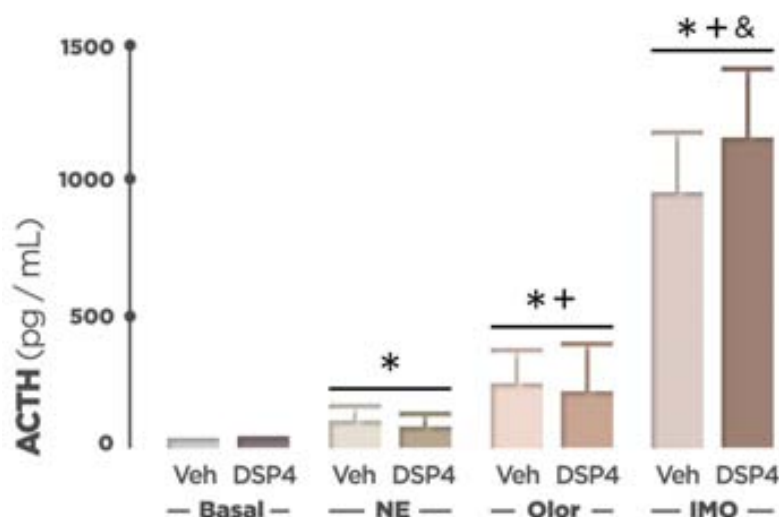


Figura 24. **Cuantificación de los niveles plasmáticos de ACTH.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar (basales $n = 4$, resto de grupos $n = 8/10$). Los grupos fueron comparados mediante GzLM.

* indica diferencias significativas vs. BASAL; + indica diferencias significativas vs. NE; & indica diferencias significativas vs. OLOR, independientemente del fármaco.

Análisis de la expresión de *c-fos* mediante FISH

El análisis estadístico mediante GzLM de los niveles de expresión de *c-fos* (**Fig. 25-27**) mostró un efecto significativo del factor ESTRÉS sobre la expresión del mRNA de *c-fos* en todas las áreas estudiadas: Cg1 (Wald $\chi^2 = 64.3$; $p < 0.001$); PrL (Wald $\chi^2 = 54.7$; $p < 0.001$); IL (Wald $\chi^2 = 57.1$; $p < 0.001$); LSv (Wald $\chi^2 = 113.13$; $p < 0.001$); MeA (Wald $\chi^2 = 111.4$; $p < 0.001$); mpdPVN (Wald $\chi^2 = 221.6$; $p < 0.001$). En cambio, el análisis estadístico no mostró efecto principal del FÁRMACO en ninguna de las áreas estudiadas excepto en el LSv (Wald $\chi^2 = 6.19$; $p < 0.05$), observándose además una interacción entre ambos factores (Wald $\chi^2 = 8.91$; $p < 0.05$). Por esta razón, en esta región se realizó también una cuantificación del número de neuronas FISH+ distribuyéndose posteriormente en diferentes rangos de DOI mediante histogramas (**Fig. 26**). El análisis estadístico sobre el número de neuronas FISH+ mostró únicamente un efecto significativo del factor ESTRÉS (Wald $\chi^2 = 204.25$; $p < 0.001$) sin encontrarse ninguna interacción.

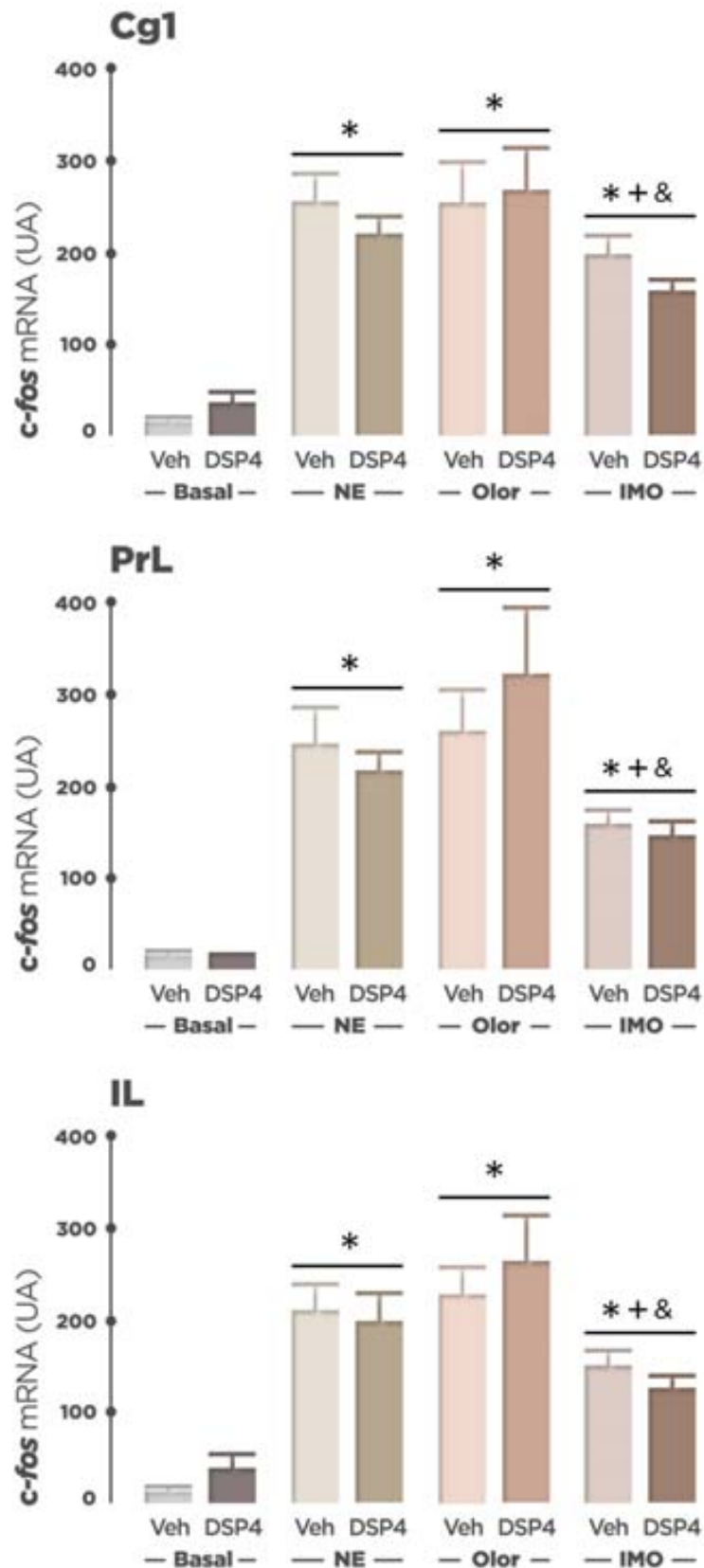


Figura 25. **Cuantificación de los niveles del mRNA de *c-fos* en el mPFC (Cg, PrL e IL).**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (basales n = 4, resto de grupos n = 8/10).

* indica diferencias significativas vs. BASAL; + indica diferencias significativas vs. NE; & indica diferencias significativas vs. OLOR, independientemente del fármaco.

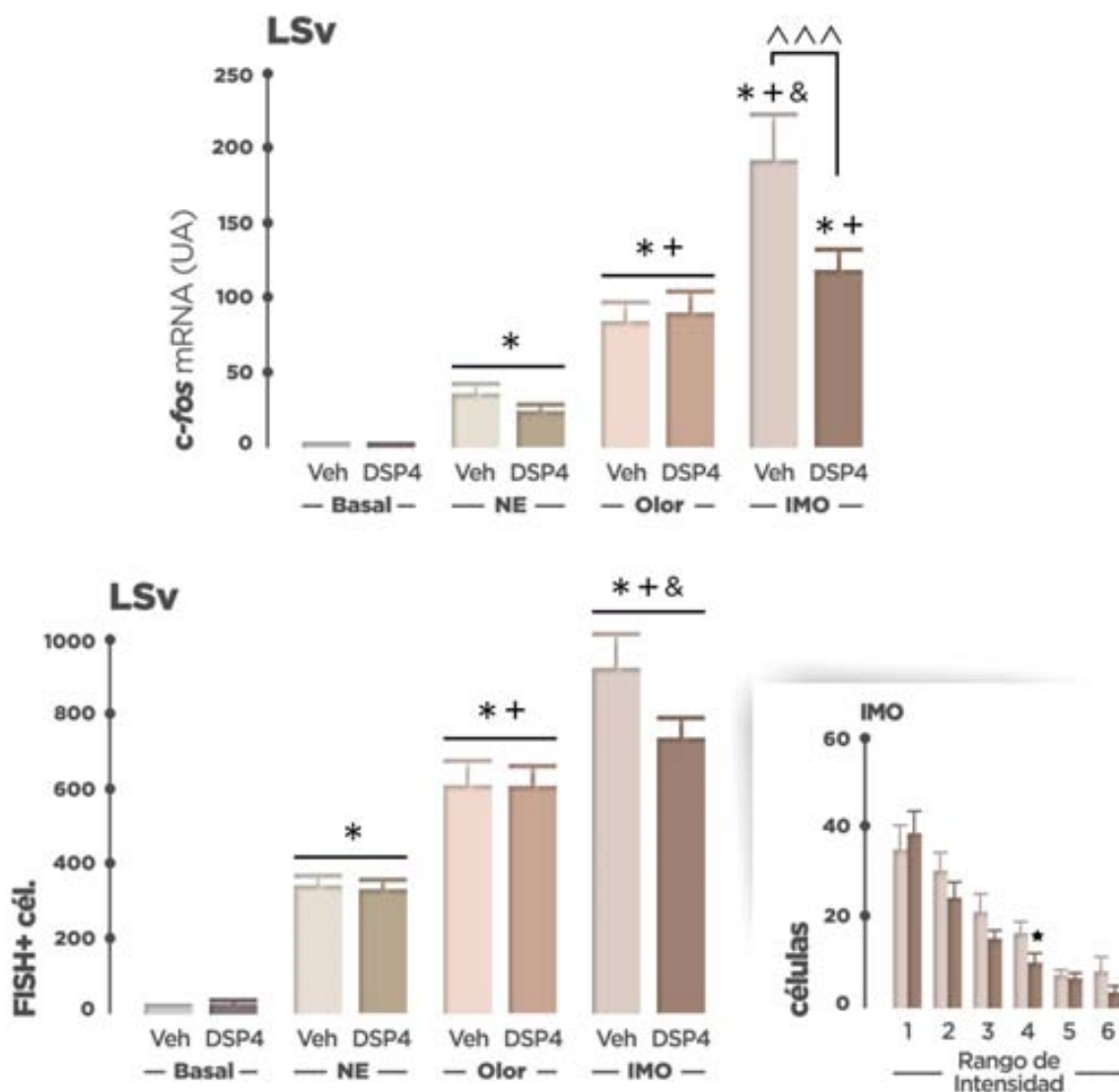


Figura 26. **Cuantificación de los niveles del mRNA de *c-fos* en LSV como DOI total (arriba) y como número de neuronas FISH+ (abajo izquierda), y distribución de las neuronas FISH+ en diferentes rangos de DOI (abajo derecha).**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) y de las neuronas FISH+ por mm² obtenidas (basales n = 4, resto de grupos n = 8/10).

* indica diferencias significativas vs. BASAL; + indica diferencias significativas vs. NE;

& indica diferencias significativas vs. OLOR. Rangos de DOI: 1: 0-5 AU; 2: 5-10 AU; 3: 10-15 AU;

4: 15-20 AU; 5: 20-25 AU; 6: 25 UA y mayor.

El número de comparaciones a posteriori respecto al factor ESTRES, corregidas mediante el test de Bonferroni secuencial, se restringió a aquellas más relevantes de cara a los objetivos del experimento: TODOS vs BASAL, OLOR vs. NE, IMO vs. NE, IMO vs. OLOR. Todos los valores de los grupos de animales estresados fueron significativamente superiores al basal salvo los expuestos a NE en el mpdPVN. La exposición al olor resultó en valores significativamente superiores a los obtenidos con la exposición al NE en el LSV, en la MeA. La exposición a la IMO resultó en valores significativamente inferiores a los obtenidos con la exposición al NE en todas las sub-divisiones del mPFC y significativamente superiores en el LSV y en el PVN. La exposición a la IMO resultó en valores significativamente inferiores a los obtenidos con el olor en todas las

sub-divisiones del mPFC y en la MeA, y significativamente superiores en el LSv, tanto en la DOI como en el número de neuronas, y en el PVN.

La descomposición de la interacción observada en el LSv (**Fig. 26**) mostró una disminución significativa de los valores de DOI obtenidos en los animales tratados con el DSP-4 con respecto a los tratados con vehículo sólo en los animales expuestos a la IMO ($p < 0.001$). En el análisis del número de neuronas FISH+ en el LSv no se observó esta interacción, sin embargo, al distribuirlas en diferentes rangos de DOI mediante histogramas, la comparación de medias mediante un estudio “t” de Student sí que mostró diferencias significativas sólo en uno de los rangos de DOI ($t(18) = 2.33$; $p < 0.05$).

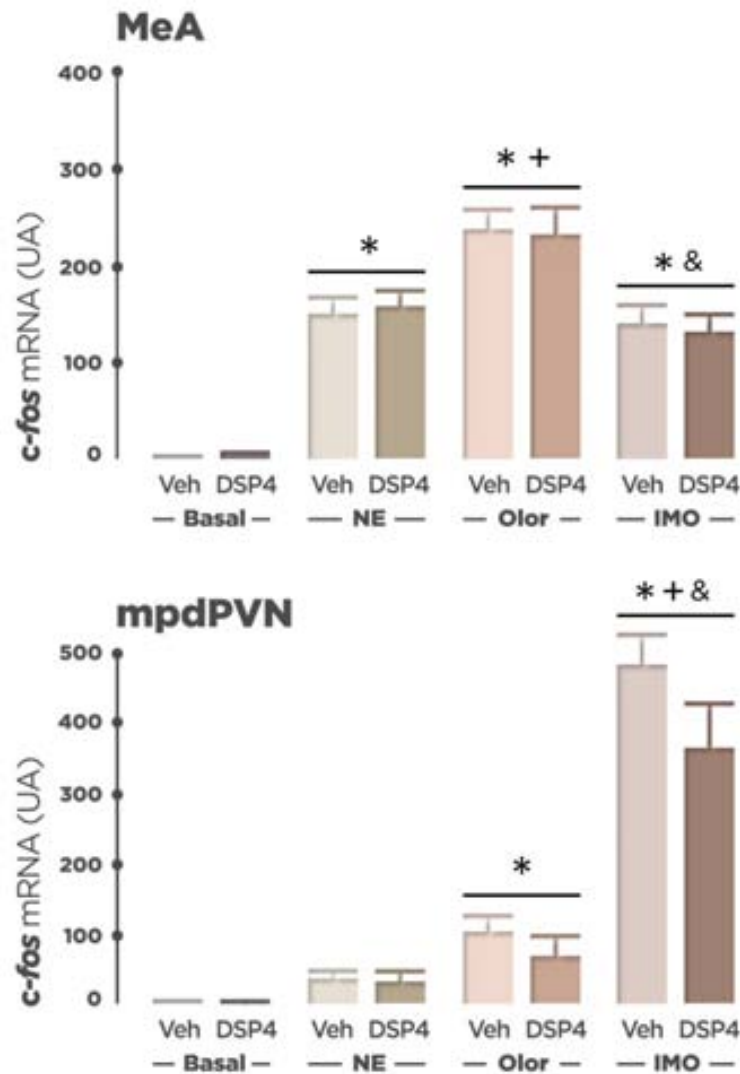


Figura 27. **Cuantificación de los niveles del mRNA de c-fos en la MeA y el mpdPVN.**

Los valores están expresados como la media y el error estándar de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas (basales $n = 4$, resto de grupos $n = 8/10$).

* indica diferencias significativas vs. BASAL; + indica diferencias significativas vs. NE; & indica diferencias significativas vs. OLOR, independientemente del fármaco.

discusión general

Caracterización de la respuesta a una nueva situación estresante

El conjunto de datos bibliográficos parece mostrar gran concordancia respecto a la dinámica de expresión de *c-fos* en el SNC en respuesta a la exposición prolongada a diferentes estímulos estresantes, con una disminución progresiva de los niveles a pesar de la persistencia del estímulo (Imaki *et al.*, 1992; Cullinan *et al.*, 1995; Ma y Aguilera, 1999; Shepard *et al.*, 2005; Trnecková *et al.*, 2007). No obstante, se desconoce si esta disminución es debida a una cierta incapacidad de la maquinaria transcripcional respectiva para mantener una expresión elevada y sostenida, o bien este descenso es un reflejo de cambios en las señales estimuladoras o inhibitoras que llegan a las neuronas como consecuencia de la experiencia prolongada con el estímulo estresante.

Por otro lado, cuando se evalúa la activación neuronal mediante la inducción de IEGs, todos los estímulos con una componente fundamentalmente emocional activan áreas del SNC en gran parte similares (Armario, 2006a). Sin embargo, ***es posible que las poblaciones neuronales activadas dentro de un núcleo determinado sean en mayor o en menor medida específicas para cada estímulo***, pudiendo tratarse de poblaciones neuronales con distinto fenotipo neuroquímico, cada uno de los cuales podría activarse frente a un estímulo concreto. Otra posibilidad es que la mayoría de las neuronas respondan de manera inespecífica, independientemente del estímulo, en parte debido a procesos de activación generalizada o de *arousal* a través de las proyecciones monoaminérgicas procedentes del tronco encefálico y de las señales procedentes de los núcleos de proyección inespecífica del tálamo. ***De esta manera, las poblaciones neuronales que son realmente importantes en la respuesta de estrés podrían quedar enmascaradas dentro del conjunto de neuronas activadas por arousal.***

En función de los posibles mecanismos sugeridos para el descenso de la expresión de *c-fos*, cabe pronosticar consecuencias marcadamente diferentes de la exposición prolongada previa a un estímulo estresante sobre la respuesta a un nuevo estímulo. Es decir, si se activan poblaciones neuronales comunes, una pregunta clave es ¿cómo responderán las neuronas que previamente se habían activado con la IMO al cambio de estímulo estresante? Con el objetivo de analizar si las neuronas son aún capaces de activarse tras varias horas de estrés sostenido y, a su vez, valorar la posible existencia de poblaciones neuronales que se activan específicamente en respuesta a distintos estímulos estresantes de carácter emocional, hemos evaluado en un primer experimento los niveles de expresión del IEG *c-fos* en respuesta a un estímulo estresante sostenido de intensidad elevada (IMO), seguido de un segundo estímulo diferente de menor intensidad (nado forzado). Así mismo, hemos complementado los resultados obtenidos con una evaluación de la activación del eje HPA, tanto a nivel central (expresión del hnRNA de CRF) como a nivel periférico (ACTH). El conjunto de áreas seleccionadas para el análisis de la expresión de *c-fos* se restringió a las más representativas, tanto por su importancia en la integración de la respuesta al estrés emocional como por su distinto comportamiento respecto a la intensidad del estímulo estresante: mPFC, LSv, MeA y PVN (Cullinan *et al.*, 1995; Armario, 2006a; Jankord y Herman, 2008). La expresión de CRF se analizó únicamente en el mpdPVN debido a que ésta es la única región donde los niveles del hnRNA pueden detectarse mediante ISH.

La exposición aguda al nado en animales no estresados previamente produjo una elevación de los niveles de mRNA de *c-fos* que en ningún caso superaron los observados con la IMO, siendo inferiores en la MeA y el mpdPVN. Estos datos, junto con los obtenidos previamente en nuestro

laboratorio también utilizando la expresión de *c-fos* (Ons *et al.*, 2004) y la información aportada por otros marcadores de intensidad de estrés como los niveles de ACTH, hiperglucemia e ingesta (datos no publicados), indican claramente que el nado es un estímulo menos intenso que la IMO. Así mismo, datos previos sobre el efecto de la exposición a estímulos estresantes de carácter emocional de diferente intensidad sobre la inducción de *c-fos* en la MeA y el PVN (Campeau y Watson, 1997; Campeau *et al.*, 1997; Pace *et al.*, 2005; Ons *et al.*, 2004), ponen también de relieve que la inducción de *c-fos* en ambas regiones, parece funcionar como un buen marcador de intensidad de estrés. Se ha de recalcar que, de acuerdo a lo descrito previamente (Cullinan *et al.*, 1995), la exposición al nado no incrementó (o lo hizo débilmente) la expresión de *c-fos* en la subdivisión mPVN. No obstante, esta región sí se vio activada en respuesta a la IMO aguda, aunque en menor grado que el mpdPVN, indicando que el mPVN podría ser sensible sólo a estímulos estresantes emocionales de elevada intensidad, aunque no es descartable que esta diferencia entre estímulos estresantes pueda deberse a otros factores.

A los 20-30 minutos del inicio de la exposición a la IMO se observó una inducción generalizada y rápida de *c-fos*, pero sus niveles de expresión fueron disminuyendo a lo largo del tiempo a pesar de la persistencia del estímulo, siguiendo un patrón similar al observado previamente (Imaki *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1994; Trnecková *et al.*, 2007). Los mecanismos implicados en esta disminución progresiva y generalizada de la expresión de *c-fos* tras la exposición prolongada a estímulos estresantes fundamentalmente emocionales no están aclarados. Una posibilidad es que la expresión de *c-fos* se reduzca progresivamente como consecuencia de un proceso de autoinhibición a través del complejo AP-1 (Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Schonthal *et al.*, 1989). Así mismo, dos variantes de corte y empalme de ICER podrían activarse inicialmente por el estrés y estar implicadas en la represión del gen que codifica para *c-fos* (Misund *et al.*, 2007). Alternativamente, esta disminución podría deberse a otros procesos de inhibición o a la incapacidad de la neurona para mantener una expresión de *c-fos* intensa y prolongada. Sin embargo, determinados estímulos sistémicos como la administración de endotoxina o la hipovolemia son capaces de mantener una elevada expresión de *c-fos* durante varias horas (Rivest y Laflamme 1995; Tanimura *et al.*, 1998). Además, la dinámica de expresión de *c-fos* es dependiente de la región cerebral que se estudia (Trnecková *et al.*, 2007). Estos datos, junto con los expuestos en el presente trabajo, sugieren que la disminución a lo largo del tiempo frente a un estímulo estresante sostenido no es solamente debida a cierta incapacidad de las neuronas de mantener una expresión continuada de *c-fos*, sino más bien a otros mecanismos, entre los cuales, los cambios en las señales que llegan a la neurona podrían jugar un papel crucial. ***De esta manera, es posible que la exposición prolongada a un estímulo estresante, incluso tan intenso como la IMO, pueda conducir a una habituación/adaptación que se traduciría en una reducción progresiva de la activación del SNC o en un incremento progresivo de las señales inhibitoras asociadas a la evidencia de que la situación emocional no es seguida de un daño físico real.***

Aunque se ha de matizar que tras la IMO prolongada los niveles de partida eran superiores a los basales (debido a niveles de mRNA residual provenientes de la exposición a la IMO prolongada), la exposición al nado de los animales previamente expuestos a una IMO prolongada se tradujo en unos niveles de mRNA de *c-fos* equivalentes a los obtenidos con una sola exposición aguda al nado en las distintas regiones del mPFC, el LSV y en la MeA pero menor en el mdpPVN. Los resultados obtenidos sugieren que se mantiene una notable capacidad de respuesta a un estímulo diferente tras el estrés sostenido en los tres primeros núcleos y en menor medida en el mpdPVN. De esta manera, este último núcleo se encontraría sujeto a mecanismos de

regulación diferentes, estando menos capacitado para activarse tras la exposición a un estímulo estresante intenso y sostenido.

La existencia de una importante capacidad de respuesta a un nuevo estímulo en la PFC, el LSv y la MeA sugiere dos posibilidades respecto a la población neuronal que responde tanto a la IMO como al nado. Una primera posibilidad sería que la inducción de *c-fos* en respuesta al nado tuviera lugar en una nueva población neuronal diferente a la que se activó con la IMO. La segunda posibilidad sería que ambos estímulos estuvieran activando la misma población neuronal y que el descenso en la expresión de *c-fos* durante la IMO prolongada obedeciera a cambios en las señales estimuladoras o inhibitoras que llegan a estas neuronas como consecuencia de la experiencia prolongada con el estímulo. Con la exposición a un nuevo estímulo estresante, las señales cambiarían y las neuronas volverían a responder plenamente. Los resultados en el mpdPVN indicarían que la poca capacidad de respuesta al nado tras una IMO prolongada podría deberse a que la población neuronal que responde al nado es (al menos en gran parte) similar a la que responde a la IMO, existiendo mecanismos de represión intracelular que serían responsables de la disminución paulatina de la expresión de *c-fos* y de su incapacidad para responder a nuevas señales.

Los mecanismos que podrían estar afectando a la capacidad de respuesta del PVN frente a un segundo estímulo no están aclarados. Una posibilidad es que la liberación sostenida de glucocorticoides pudiera estar inhibiendo la posterior inducción de *c-fos* en respuesta al estrés. Estudios previos indican que la expresión de *c-fos* en el PVN tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés se incrementa en animales adrenalectomizados, disminuyendo con el aporte de una dosis de mantenimiento de corticosterona en el agua de bebida y llegando a anularse la respuesta al estrés con el aporte crónico de altas dosis de corticosterona (Imaki *et al.*, 1995b; Kovács *et al.*, 2000; Girotti *et al.*, 2007; Pace *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando se inyecta una dosis fisiológica de glucocorticoides 1 - 2 h previas a una exposición a la inmovilización en tubo no se observa una reducción en la expresión de *c-fos* (Ginsberg *et al.*, 2003; Helmreich *et al.*, 2008), aunque si esta dosis es muy elevada (no fisiológica), la respuesta puede llegar reducirse (Imaki *et al.*, 1995b). Sin embargo, los efectos de la manipulación crónica y la administración previa al estrés de glucocorticoides no son equivalentes a nuestra situación dado que los niveles de glucocorticoides se incrementan tras la exposición al estrés. El conjunto de datos disponibles indicaría que es muy improbable que los glucocorticoides jueguen un papel crucial en la disminución progresiva de la expresión de *c-fos* en respuesta a la IMO prolongada observada en el presente trabajo.

Al analizar la dinámica de expresión de CRF en el mpdPVN se observó que, tras una fuerte inducción inicial a los 20 minutos del comienzo de la IMO, los niveles del hnRNA de CRF se fueron reduciendo a lo largo del tiempo a pesar de la persistencia de la situación estresante, aunque se mantuvo un importante nivel sub-máximo de transcripción. Este resultado coincide con el observado previamente en nuestro laboratorio utilizando el mismo estímulo (Trnecková *et al.*, 2007). En cambio, en otro estudio en el que se utilizó la inmovilización en tubo, un estímulo claramente menos intenso que la IMO (Armario and Jolin 1989; Martí *et al.*, 2001), la caída en los niveles de expresión de CRF fue mucho más rápida y prácticamente desapareció tras 90 min de estrés sostenido (Shepard *et al.*, 2005). Aunque no se ha demostrado directamente, es muy posible que estas diferencias en la dinámica sean debidas a la diferente intensidad de los dos estímulos estresantes. De hecho, la exposición aguda al nado produjo una respuesta del hnRNA que fue aproximadamente la mitad de la observada con el mismo tiempo de exposición a la

IMO, sugiriendo que **la expresión de CRF en este núcleo, al igual que la de *c-fos*, funciona como un buen marcador de la intensidad frente a estímulos estresantes de carácter emocional.**

Los resultados obtenidos con exposición al nado tras la IMO prolongada parecen indicar que existe una incapacidad de respuesta a una nueva situación estresante tras casi 4 h de estrés sostenido, ya que no se observó ninguna respuesta adicional al nado en los animales que experimentaron IMO prolongada. Este bloqueo en la expresión de CRF en el mpdPVN estaría parcialmente en consonancia con lo observado con *c-fos*, aunque en este último caso sí se observó cierto nivel adicional de inducción. Este hecho sugiere que, incluso con la presumible llegada de señales estimuladoras adicionales al PVN tras el nado, la transcripción de CRF estaría totalmente bloqueada. Puesto que la expresión de *c-fos* y CRF en respuesta a estímulos sistémicos como la hipovolemia y la endotoxina es más sostenida (Rivest y Laflamme 1995; Tanimura *et al.*, 1998), cabe la posibilidad de que las poblaciones de neuronas de CRF del PVN que responden a estímulos sistémicos sean al menos en parte diferentes de las que responden a los estímulos emocionales, poseyendo propiedades diferentes respecto a la capacidad de expresar *c-fos* y CRF. Otra posibilidad alternativa es que las señales generadas por estímulos sistémicos sean diferentes de las generadas por estímulos emocionales y que las primeras sean capaces de superar cualquier mecanismo de represión intracelular de la expresión de CRF. En este sentido conviene destacar que las terminales noradrenérgicas en el PVN son importantes para activar el eje con estímulos sistémicos pero no emocionales (Ritter *et al.*, 2003).

Al igual que ocurre con la expresión de *c-fos* y de CRF en el mpdPVN y en concordancia con estudios previos (Hauger *et al.*, 1988; Rivier y Vale, 1987; García *et al.*, 2000), los niveles de ACTH en respuesta a la IMO se incrementaron a los 20 minutos para ir disminuyendo progresivamente a pesar de la persistencia del estímulo. La exposición al nado tras la IMO prolongada no mostró respuesta alguna en los niveles de ACTH, sugiriendo un posible bloqueo en la liberación de CRF a la eminencia media. Desafortunadamente, esta posibilidad sólo es abordable estudiando la liberación de CRF al sistema portal hipofisario, algo casi imposible de conseguir en condiciones fisiológicas en la rata (Armario 2006b). Esta incapacidad de respuesta de la adenohipófisis podría guardar relación con la elevada intensidad del estímulo estresante aplicado de manera prolongada, ya que utilizando un segundo estímulo (inmovilización en malla) de mayor intensidad que el primero (*restraint*), se ha observado una cierta capacidad de respuesta de la ACTH al nuevo estímulo (Dhabhar *et al.*, 1997).

Los mecanismos que pueden estar contribuyendo a limitar la respuesta al estrés en el PVN y en la hipófisis pueden ser varios. Un posible candidato sería la retro-inhibición mediada por glucocorticoides. Éstos son capaces de reducir la expresión de CRF en respuesta al estrés, así como la producción y la liberación de ACTH por la adenohipófisis (Keller-Wood y Dallman, 1984; Imaki *et al.*, 1995b). No obstante, algunos trabajos cuestionan este papel clave de los glucocorticoides respecto a los cambios en la expresión de CRF, encontrando patrones similares de expresión del hnRNA en respuesta a la inmovilización en tubo prolongada en ratas adrenalectomizadas y en ratas falsamente operadas o “*sham*” (Shepard *et al.*, 2005). Así mismo, estudios previos en animales adrenalectomizados indican que una administración aguda de corticosterona, simultánea a la exposición a un estímulo estresante de carácter leve como la inyección intraperitoneal de vehículo, no tiene efecto alguno sobre la dinámica temporal de expresión del hnRNA de CRF (Ma y Aguilera, 1999). No obstante, cuando la administración de glucocorticoides en ratas adrenalectomizadas se realiza previamente al estrés (incluso una hora antes), la expresión del hnRNA de CRF se ve parcial o completamente suprimida (Imaki *et al.*, 1995b; Ginsberg *et al.*, 2003,

Helmreich *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que la liberación de glucocorticoides que acompaña a la exposición al estrés no parece afectar a la expresión de CRF en respuesta a dicha situación de estrés. Dado que el incremento de glucocorticoides circulantes no parece explicar por sí solo el rápido descenso en la tasa de transcripción del gen del CRF tras la exposición prolongada a un estímulo estresante, se ha propuesto la existencia de un mecanismo de retro-alimentación intracelular que implica a ICER. Diversos estudios han demostrado que la región promotora CRE en el gen de CRF es importante no sólo para la activación de la transcripción, sino también para el efecto represor de los glucocorticoides (Shepard *et al.*, 2005; Guardiola-Díaz *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2004). La co-localización de ICER con neuronas CRF-érgicas, el hecho de que su expresión no venga influida por glucocorticoides y, sobre todo, la correlación entre el incremento de los niveles de ICER y la disminución de los niveles del hnRNA de CRF (acompañada de un descenso en el reclutamiento de la RNA polimerasa II por el promotor de CRF) tras una inmovilización en tubo prolongada, sugieren consistentemente que ICER sería el principal responsable de la inhibición de la transcripción de CRF (Shepard *et al.*, 2005).

Respecto a los mecanismos que podrían estar influyendo en la reducción progresiva de los niveles de ACTH en plasma, estudios en animales expuestos a choques eléctricos en las patas durante 3-5 horas, sugieren que la incapacidad de estos animales de mantener niveles elevados de ACTH circulante durante el estrés sostenido, podría deberse tanto a una disminución temporal de la reserva disponible de ACTH en la adenohipófisis como a la retro-inhibición mediada por la corticosterona (Rivier y Vale, 1987). Esta conclusión es concordante con otro estudio realizado en nuestro laboratorio utilizando animales intactos y adrenalectomizados expuestos a la IMO (Martí *et al.*, 1999). *Aunque el conjunto de mecanismos que están participando en este bloqueo de la respuesta del eje HPA todavía no están aclarados, los datos presentados en este trabajo, junto con los anteriormente comentados, sugieren consistentemente que, tras una activación de la transcripción y de la síntesis de CRF, el bloqueo parcial de la respuesta podría ser importante para prevenir patologías asociadas a una elevación crónica de este neuropéptido y de la secreción de glucocorticoides (Aguilera et al, 2007).*

¿Se activan las mismas poblaciones neuronales en respuesta a la IMO y el nado?

Consideraciones metodológicas

Relativas al marcaje simple mediante FISH

Cuando se analiza una muestra de tejido mediante ISH radiactiva y se obtiene la DOI de la señal autorradiográfica, no suele estudiarse el número de células positivas ni su grado de activación. De esta manera, un estímulo determinado podría estar activando pocas neuronas pero de manera muy intensa, y otro estímulo podría activar muchas neuronas pero con un nivel de activación más bajo. A la hora analizar estos dos estímulos cuantificando la película autorradiográfica podríamos estar obteniendo niveles similares, ignorando una información que podría ser relevante de cara a la interpretación de los resultados. Tradicionalmente, cuando se ha querido tener una idea del número de células marcadas y su grado de activación, se recurría a la ISH radiactiva y su revelado mediante emulsión micro-autorradiográfica. No obstante, el proceso de contaje de

células y el establecimiento de un criterio a partir del cual podrían ser consideradas como positivas para un determinado marcador se hace complejo en la mayoría de las ocasiones, debido fundamentalmente al carácter aleatorio de la emisión de partículas radiactivas y su recorrido desde el lugar de emisión.

En el caso de la FISH, la identificación de células positivas es mucho más simple permitiéndonos incluso hacer un conteo manual o automatizado con menor probabilidad de error que utilizando la técnica radiactiva. Sin embargo, cuando se trata de cuantificar los niveles de DOI parece que el método radiactivo sigue siendo el más adecuado ya que las partículas radiactivas se revelan directamente en la película o la emulsión. En la FISH, la detección se realiza siguiendo un total de 3 pasos (hibridación, inmunodetección y amplificación) por lo que existe un mayor riesgo de alteración de la señal. En nuestro caso y aunque se trate de experimentos diferentes, hemos podido observar que el análisis de la expresión de c-fos en la MeA y el PVN mediante ISH radiactiva es capaz de discriminar entre estímulos estresantes de diferente intensidad como son la IMO y el nado, mientras que estas diferencias no se detectaron en el análisis de la DOI mediante FISH.

Relativas al doble marcaje mediante IF-FISH

El primer e insalvable problema que nos encontramos cuando tenemos el objetivo de diferenciar las neuronas que se activan por un primer estímulo de las que se activan con un segundo aplicado posteriormente radica en la influencia de la exposición previa al primer estímulo. El segundo problema radica en cómo diferenciar las neuronas que se activan con un primer estímulo de las que se activan con otro estímulo aplicado posteriormente, dado que utilizando un marcaje simple del IEG resulta imposible distinguir ambas poblaciones.

Para afrontar esta segunda cuestión se han desarrollado varias alternativas basadas en el carácter transitorio de la expresión del mRNA de distintos IEG y la dinámica de formación de proteína, así como en la variación en el tiempo de la localización subcelular el mRNA (catFISH). En nuestro caso hemos utilizado una aproximación metodológica basada en trabajos previos (Chaudhuri, 1997; Chaudhuri *et al.*, 1997; Kovacs *et al.*, 2008) para identificar las neuronas que responden a la IMO y al nado, y caracterizar su grado de especificidad. Esta técnica consiste en el análisis histológico mediante doble marcaje de la proteína c-Fos y el mRNA que codifica para esta misma proteína. Como hemos comentado, la expresión del mRNA de c-fos tiene un máximo alrededor de los 30 minutos de iniciada la situación estresante, disminuyendo posteriormente incluso aunque la situación estresante persista (Trnecková *et al.* 2007). En el caso de la proteína, el máximo se da entre la hora y las dos horas, y sus niveles de mantienen en mayor o menor medida durante varias horas dependiendo del área particular que se observe (Chowdhury *et al.*, 2000). Basándonos en estas dinámicas, esta técnica nos permitiría identificar qué células responden a la IMO prolongada mediante la detección de la proteína y cuáles responden al nado aplicado tras esta IMO mediante la detección del mRNA (**Fig. 28**). Más en concreto, **partimos de estas dos hipótesis:**

- (1) **Las neuronas que se activaron durante el primer estímulo mostrarán fundamentalmente proteína y poco o nulo mRNA**
- (2) **Las neuronas que se activan exclusivamente con el segundo estímulo mostrarán fundamentalmente mRNA y nula proteína**

El primer estímulo debería ser suficientemente prolongado para que los niveles de mRNA hayan disminuido sin que ello suponga una pérdida considerable de proteína (evitando falsos negativos para neuronas activadas durante la IMO prolongada) y por el contrario, el segundo estímulo debería ser lo suficientemente corto para que las neuronas expresen únicamente mRNA sin formación considerable de proteína (evitando falsos positivos para neuronas activadas durante

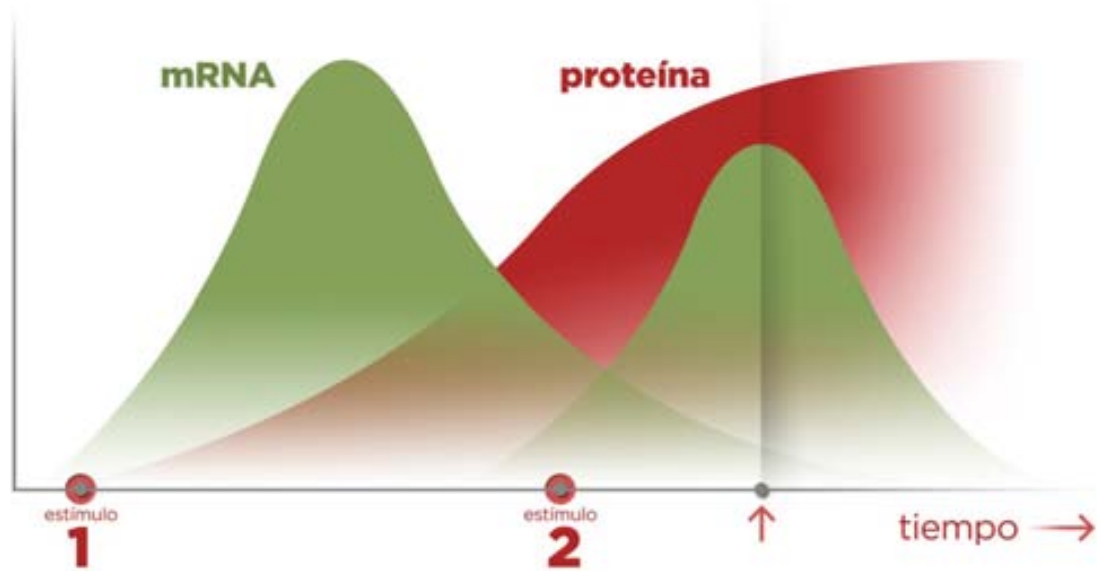


Figura 28. **Dinámica de expresión del mRNA de *c-fos* (verde) y de formación de proteína (rojo).**

Los puntos 1 y 2 representan el inicio de los distintos estímulos estresantes.

El punto indicado con una flecha representa el momento óptimo para identificar las neuronas que respondieron al estímulo 1 mediante IF y las que responden al estímulo 2 mediante FISH

la IMO prolongada). Basándonos en la dinámica de ambos marcadores establecida mediante ISH radiactiva (con cuantificación densitométrica) e inmunohistoquímica (Trnecková *et al.* 2007; Chowdhury *et al.* 2000) debíamos llegar a un consenso a la hora de elegir los tiempos de exposición a ambos estímulos estresantes. En nuestro caso hemos elegido el mismo diseño experimental que se utilizó en el primer experimento, fijando en 3 horas y 40 minutos la exposición prolongada a la IMO y en 20 minutos la exposición al nado tras la IMO prolongada.

Detección de falsos negativos para neuronas activadas con la IMO prolongada por degradación de proteína

Nuestra primera hipótesis supone que tras aproximadamente 4 horas de IMO prolongada, el mRNA ha disminuido considerablemente y la degradación de la proteína, aunque haya pasado el pico máximo de las 2 horas, no es significativa. De esta manera, podríamos identificar la mayoría de ellas mediante inmunofluorescencia, siendo casi indetectables mediante FISH. *No obstante, si la degradación de proteína fuera suficientemente rápida como para dejar de detectar neuronas que fueron en algún momento positivas para proteína, podríamos estar cometiendo un error en la interpretación de los resultados.*

Por trabajos previos de nuestro laboratorio utilizando la IMO como estímulo estresante sabemos que tras alcanzar un máximo, que se da en términos generales a los 30 minutos del inicio de la situación estresante, los niveles del mRNA de *c-fos* disminuyen incluso si la exposición al es-

título estresante persiste, aproximándose a los niveles basales tras 4 horas de exposición prolongada a la IMO (Trnecková *et al.*, 2007). Según hemos observado con el marcaje simple mediante FISH, tras 4 horas de IMO prolongada todavía podemos detectar un número significativo de neuronas positivas para mRNA en determinados núcleos como el LSv o el PVN, pero la intensidad de la señal en éstas es significativamente menor en todos los núcleos. Por lo tanto, hemos de considerar que pueden aparecer neuronas doble positivas tras la IMO prolongada debido a la presencia de mRNA residual procedente de una primera activación.

El pico máximo de producción de proteína se encuentra entre la hora y las 2 horas del inicio de la situación estresante, aunque a los 30 minutos ya puede aparecer una cantidad detectable de proteína en la mayoría de las áreas (Kovács, 1998). La degradación de la proteína pasado el pico máximo es un proceso que sucede a distinta velocidad dependiendo del área que se estudie (Chowdhury *et al.* 2000). De esta manera, los niveles de proteína decaen a partir de una hora de exposición prolongada a la inmovilización en el mPFC y a partir de las 2 horas en la MeA. En el PVN los niveles de proteína parecen mantenerse constantes incluso pasadas 4 horas. Una manera de valorar la degradación de proteína pasado el pico máximo durante las 4 horas de IMO prolongada sería comparar las neuronas positivas para mRNA tras 20 minutos de IMO con las positivas para proteína tras la IMO prolongada (**Fig. 29**).

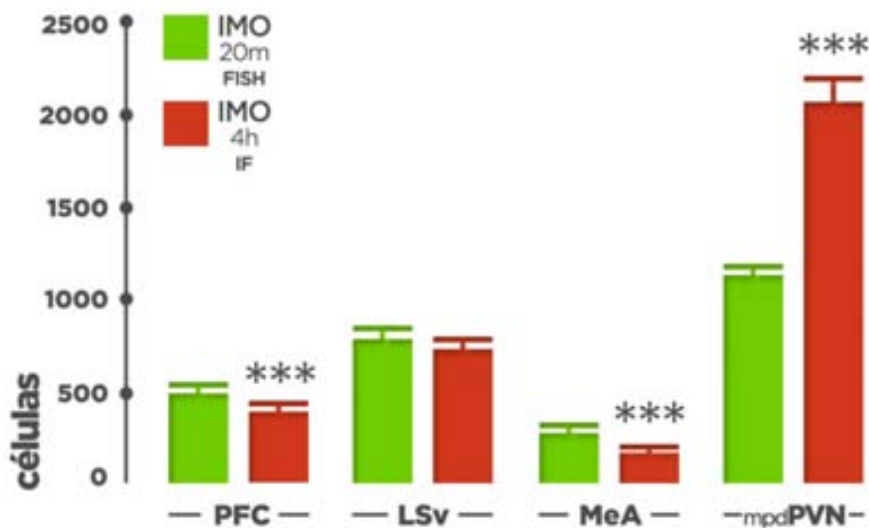


Figura 29. **Relación entre el número de neuronas positivas** para el mRNA de c-fos tras una exposición aguda a la IMO y el número de neuronas positivas para c-Fos proteína tras una exposición prolongada a la IMO durante 4 horas.

*Las medias se compararon mediante un estudio "t" de Student
(n = 8 para IMO 20 min; n= 6 para IMO 4 h).*

La comparación de las medias reveló que solamente en el LSv, el número de neuronas positivas para c-Fos proteína obtenidas tras 4 horas de exposición a la IMO coincide con el número de neuronas positivas para el mRNA de c-fos obtenidas tras la exposición a 20 min de IMO aguda. El número de neuronas positivas para la proteína c-Fos a las 4 horas de IMO fue significativamente menor que el número de neuronas positivas para el mRNA a los 20 min en el PrL y en la MeA, mientras que en el mPcPVN fue significativamente mayor ($p < 0,001$).

En el caso del LSV, no existen datos en la bibliografía acerca del proceso de degradación de proteína en respuesta a la inmovilización prolongada. No obstante, el hecho de que nos encontremos cerca del máximo de expresión de mRNA tras 20 minutos de exposición aguda a la IMO (Trneckova *et al*, 2007) y que el número de neuronas obtenido sea equivalente al número de neuronas positivas para proteína tras la IMO prolongada sugiere que el nivel de proteína es suficientemente elevado como para detectarse aún a las 4 horas o bien que el proceso de degradación de proteína es más lento en este núcleo, facilitando la detección del total de neuronas activadas durante la IMO prolongada mediante este marcador.

Los resultados obtenidos en el PrL parecen indicar que la degradación de proteína tras 4 horas de IMO prolongada es significativa en algunas neuronas de este núcleo, hecho que concuerda con resultados obtenidos en estudios previos (Chowdhury *et al*, 2000). Por lo tanto, es muy probable que el número de neuronas positivas para proteína tras 4 horas de exposición al IMO esté infravalorando el número de neuronas activadas durante la IMO prolongada, especialmente si el doble marcaje ha disminuido la detección de neuronas con menos señal de proteína c-Fos. En consecuencia, este hecho podría estar implicando una sobrevaloración de la aportación de neuronas de nueva activación en la respuesta a un nuevo estímulo tras una IMO prolongada.

Estudios previos de nuestro laboratorio (Trneckova *et al*, 2007) sugieren que tras 20 minutos de exposición aguda a la IMO nos encontraríamos cerca del máximo de expresión del mRNA en el mPFC, el LSV y el PVN, pero en la MeA el máximo de expresión parece alcanzarse aproximadamente media hora después. El hecho de que el máximo de expresión se obtenga aproximadamente a la hora de la exposición a la IMO prolongada en la MeA, sugiere que el reclutamiento de neuronas en respuesta a estrés sostenido o el nivel de activación se da de manera más progresiva que en los dos núcleos anteriores.

De ser así, tras 20 minutos de exposición aguda a la IMO seguramente nos encontramos por debajo del máximo de activación. Así mismo, según otros estudios previos en la MeA (Chowdhury *et al*, 2000), también existe degradación de proteína a partir de las 2 horas de exposición prolongada a la IMO por lo que, al igual que sucede en el mPFC, podríamos estar infravalorando el número de neuronas activadas durante las 4 horas de exposición al IMO y en consecuencia sobrevalorando la aportación neuronas de nueva activación en la respuesta tras la IMO prolongada.

Los datos obtenidos en el mpdPVN parecen indicar que el reclutamiento de neuronas en respuesta a estrés sostenido se da de una forma progresiva, ya que el número de neuronas positivas para la proteína detectado tras la IMO prolongada fue notablemente superior al número de neuronas activadas tras 20 minutos de exposición aguda a la IMO. Estos datos, junto con los obtenidos en estudios previos (Chowdhury *et al*, 2000), sugieren que el proceso de degradación de proteína ocurre posteriormente a las 4 horas de exposición prolongada a la IMO, y por lo tanto estaríamos detectando el total de neuronas activadas durante la IMO prolongada. ***Dado que la dinámica de degradación de la proteína c-Fos y de la expresión de su mRNA es particular de cada región es necesario consensuar los tiempos de exposición a los estímulos estresantes dependiendo de las regiones que se quieran estudiar.***

De esta manera, es probable que en núcleos como el mPFC o la MeA sea más adecuado utilizar tiempos más cortos en la exposición a la IMO sostenida para evitar la pérdida de proteína por degradación. En el LSV y el mpdPVN los tiempos utilizados parecen apropiados debido a que no existe degradación de proteína a las 4 horas de IMO. Es preciso recalcar que en los núcleos don-

de el máximo de expresión de mRNA se sitúa más allá de la media hora, el nivel de activación que aparece con la exposición al nado tras la IMO sostenida podría reflejar sólo una parte del total de neuronas que son capaces de responder. No obstante, en el caso de alargar el tiempo de exposición al nado, sería necesario comprobar que no existe formación de proteína que pudiera interferir con la proveniente del primer estímulo.

Detección de falsos positivos de neuronas activadas durante la IMO prolongada debido a la formación de proteína tras la exposición al segundo estímulo

La segunda hipótesis de la que partimos para dar validez a esta técnica supone que los niveles de mRNA de las neuronas activadas con el nado tras la IMO prolongada son suficientemente elevados para ser detectados sin problemas y que, si se trata de neuronas de nueva activación, 20 minutos no serían suficientes para la formación de nueva proteína, lo que permitiría distinguir a estas neuronas (proteína negativas) de las que ya se activaron durante la IMO prolongada (proteína positivas).

Para confirmar que el número de neuronas positivas para la proteína no cambia por la exposición aguda a la IMO o al nado tras la liberación de la IMO prolongada, hemos realizado una comparación del número de neuronas positivas para la proteína en los tres grupos partiendo de la inmunofluorescencia simple para c-Fos (**Fig. 30**). Los resultados obtenidos en este análisis confirman que *la exposición a 20 minutos de nado tras la IMO prolongada no conlleva la detección de nuevas neuronas en términos de proteína. Por lo tanto podemos descartar la influencia que este factor pudiera tener de cara a la interpretación de los resultados.*

Interpretación de los resultados

Los datos del experimento anterior sugieren que en todas las áreas estudiadas existen, en mayor o en menor medida, neuronas capaces de responder al nado forzado cuando es aplicado tras una IMO prolongada de 4 horas. Al objeto de averiguar el grado de especificidad de estas poblaciones neuronales, hemos realizado un nuevo experimento partiendo del mismo diseño experimental pero añadiendo un sexto grupo de animales que fueron re-expuestos a una segunda IMO tras la IMO prolongada. Con la inclusión de estos animales, hemos pretendido diferenciar entre la activación específica debida a la exposición al nado tras una IMO prolongada y la posible activación causada por la mera manipulación del animal durante el proceso de liberación de la IMO o por la activación de neuronas específicamente asociadas a la propia liberación. Existen datos que demuestran que la liberación de dopamina en el núcleo accumbens es sensible al proceso de liberación de la inmovilización en tubo (Imperato *et al.*, 1991)

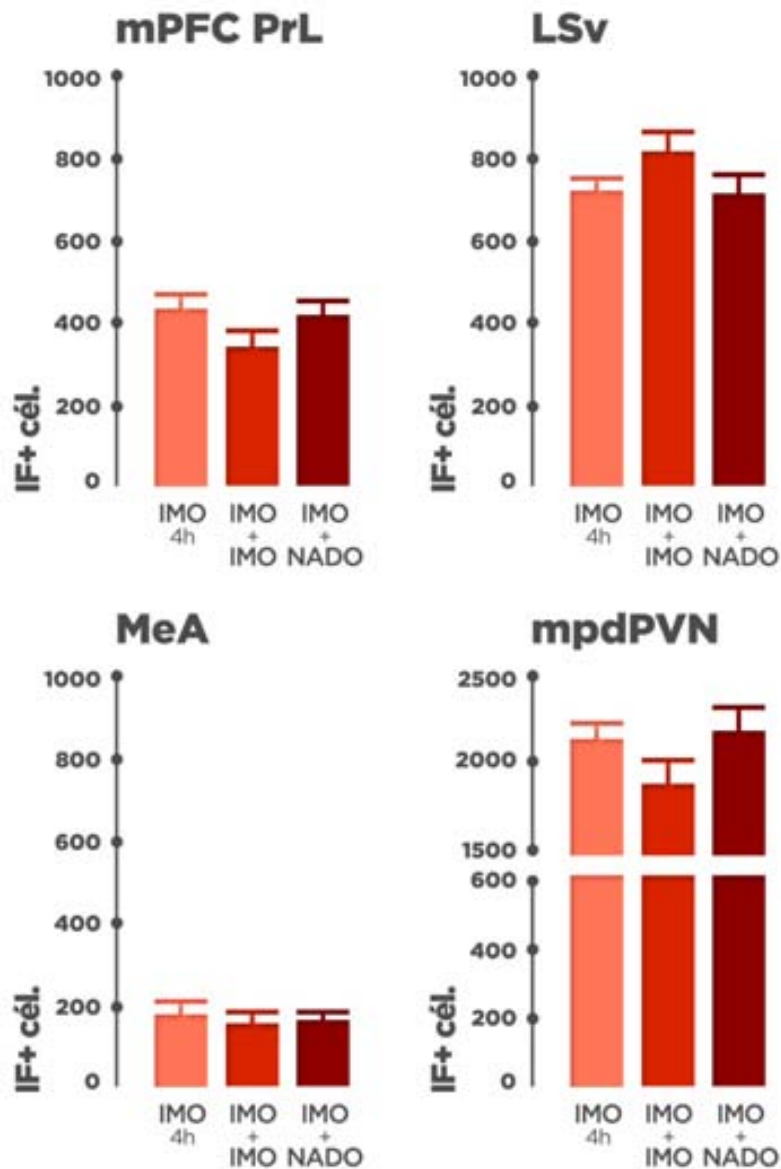


Figura 30. **Cuantificación del número de células positivas** para c-Fos proteína por mm² en **mPFC, LSv, MeA y PVN**.

Los valores están expresados como la media y el error estándar (basales n = 4, resto de grupos n = 6-8). Los grupos fueron comparados mediante ANOVA.

Análisis de la expresión de c-fos mediante FISH

Previamente a la realización del doble marcaje y al objeto de confirmar los resultados obtenidos en el primer experimento utilizando esta vez el método fluorescente en lugar del radiactivo, decidimos realizar un marcaje simple para el mRNA de c-fos mediante FISH, cuantificando tanto la DOI de la imagen total como el número de neuronas positivas por mm². Así mismo, para examinar posibles diferencias no detectables mediante estos dos parámetros, hemos cuantificado la DOI individual de cada neurona positiva distribuyendo el total de neuronas por mm² en diferentes rangos de DOI mediante histogramas. Las imágenes para la realización de este análisis fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia.

Con el marcaje mediante FISH simple hemos observado a los 20 minutos de exposición a la IMO una marcada inducción de la expresión de c-fos (DOI) en todas las áreas estudiadas. En ninguna de las áreas estudiadas los niveles obtenidos con la exposición a la IMO aguda difirieron significativamente de los obtenidos con la exposición al nado, aunque se observe una tendencia en la MeA y el mpdPVN.

Tras 4 horas de exposición prolongada a la IMO hemos observado, como era de esperar, un claro descenso de la señal total derivada del análisis densitométrico de las imágenes y del número de neuronas positivas para el mRNA de c-fos. No obstante, el número de células positivas para el mRNA detectadas tras 4 horas de exposición prolongada a la IMO disminuía menos que los niveles de DOI, sugiriendo que la intensidad individual de la señal por célula era menor aunque continuaran siendo detectables. Este hecho queda patente en los histogramas de distribución de neuronas en función del nivel de DOI de cada célula individual.

Con la exposición a una segunda IMO tras la IMO prolongada se observó una inducción de c-fos solamente en el PrL y el LSv. No obstante, no se alcanzó el mismo nivel observado tras 20 minutos de la exposición inicial a la IMO, salvo en el PrL, y sólo en términos de DOI. Estos resultados sugieren la existencia de neuronas en ambos núcleos que son capaces de activarse con el proceso de liberación de la IMO. Por el contrario, en la MeA o el mpdPVN no se observó ninguna inducción adicional.

Con la exposición al nado tras la IMO prolongada se observó una inducción de la expresión de c-fos en el PrL, el LSv y la MeA, pero no en el mpdPVN. En el caso del mpdPVN, la respuesta a un nuevo estímulo tras la IMO prolongada parece estar bloqueada por completo. En las otras zonas, esta inducción alcanzó niveles equivalentes a los obtenidos con una sola exposición aguda al nado en el PrL y la MeA, pero quedaron por debajo en el caso del LSv. No obstante, si consideramos el incremento respecto a su nivel de partida, el grado de activación es claramente menor que en los expuestos exclusivamente al nado. Cuando comparamos la respuesta a la re-exposición a la IMO con la respuesta al nado tras la IMO prolongada en el PrL y la MeA, el número de neuronas FISH+ resultó significativamente mayor tras el nado que tras la re-exposición a la IMO, siendo equivalentes en el LSv.

Estos resultados sugieren la existencia de poblaciones neuronales en el PrL y el LSv que responden de forma similar a ambas situaciones, pudiendo estar su activación asociada a procesos comunes como podría ser la liberación del animal de la IMO o mecanismos de activación generalizada o de *arousal*. Sin embargo, en el caso del PrL y la MeA, la exposición al nado tras la IMO prolongada produjo la activación de un mayor número de células que las observadas con la re-exposición a la IMO, sugiriendo la existencia de una población neuronal en ambos núcleos que respondería específicamente al nado.

Es importante mencionar que existen diferencias respecto a los resultados obtenidos en el primer experimento en términos de DOI. Por ejemplo, no se ha logrado discriminar entre los niveles obtenidos con la IMO y con el nado ni en la MeA ni en el mpdPVN. Tampoco hemos apreciado un incremento adicional en la señal con la exposición al nado tras la IMO prolongada en el mpdPVN. Estas discrepancias podrían explicarse, como ya hemos comentado, por una menor sensibilidad del método fluorescente con respecto al radiactivo.

Identificación de las neuronas activadas con la exposición al nado aplicado tras la IMO prolongada mediante doble marcaje IF-FISH

Tras el análisis de las imágenes mediante microscopía confocal de las muestras del doble marcaje se observa que el número de neuronas positivas para mRNA que somos capaces de detectar tras la exposición prolongada a la IMO es notablemente superior al observado previamente mediante microscopía de fluorescencia (sobre todo en el caso del PrL). Este hecho se debe seguramente a una mayor resolución de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal que nos permitiría diferenciar las neuronas con bajos niveles de mRNA que no serían detectables mediante el otro método. *La elección del método de captación de imágenes es de crucial importancia para una interpretación correcta de los resultados, ya que dependiendo del método de captación utilizado, podríamos estar infravalorando de manera notable el número de neuronas positivas para mRNA.*

La cuantificación del número de neuronas FISH+ (tanto IF+/FISH+ como IF-/FISH+), indica que en la MeA y el mpdPVN los niveles obtenidos con la exposición a 20 minutos de nado fueron significativamente menores a los obtenidos con la exposición a 20 minutos de IMO, datos que concuerdan con la DOI del primer experimento. Así mismo, tras 4 horas de exposición prolongada a la IMO el número de neuronas FISH+ mostró una disminución en todas las áreas salvo en el PrL, lo que podría deberse a una mayor facilidad para detectar neuronas positivas con bajos niveles de mRNA utilizando microscopía confocal.

Con la exposición a una segunda IMO tras la IMO prolongada, se observó un incremento en el número de neuronas FISH+ exclusivamente en el PrL alcanzándose niveles equivalentes a los obtenidos con una sola exposición a la IMO. En la MeA y en el mpdPVN no se observó respuesta a una segunda exposición a la IMO, en consonancia con los datos de la FISH simple. Al contrario de lo observado con FISH simple, en el LSv no se observó ningún incremento adicional en el número de neuronas activadas. Esto podría deberse a que tras 4 horas de IMO, la captación mediante microscopía confocal nos permite detectar un número elevado de neuronas que muestran poca intensidad de señal.

Con la exposición al nado tras la IMO prolongada se observó un incremento en el número de neuronas FISH+ en el PrL, la MeA y el mpdPVN, pero no en el LSv. En el PrL, el número sobrepasó significativamente al obtenido con una sola exposición aguda al nado, observándose un efecto sumatorio sobre el número de neuronas detectadas tras 4 horas de IMO prolongada y sugiriendo el reclutamiento de nuevas neuronas. En la MeA el número de neuronas FISH+ fue equivalente al obtenido con una sola exposición aguda al nado, resultando significativamente menor en el LSv y el mpdPVN. Así mismo, en el PrL, la MeA y a diferencia del marcaje simple, también en el mpdPVN, el número fue superior al obtenido con la re-exposición a la IMO sugiriendo un mayor reclutamiento de neuronas en respuesta al nado tras la IMO prolongada.

Los resultados obtenidos en el análisis del número total de neuronas (IF+/FISH-, IF+/FISH+ e IF-/FISH+) parecen confirmar que en el PrL, la re-exposición a la IMO tras la IMO prolongada incrementa el número de neuronas detectadas respecto a las 4 horas de IMO prolongada, sugiriendo un reclutamiento de nuevas neuronas en respuesta a este estímulo. Así mismo, en todos los núcleos estudiados salvo en el mpdPVN, la exposición al nado tras la IMO prolongada es capaz de incrementar el número total de neuronas tras 4 horas de IMO prolongada, siendo siempre mayor al observado con la re-exposición a la IMO. Por lo tanto, parece existir un reclutamiento de neuronas asociado exclusivamente a la exposición al nado.

Por otro lado, en concordancia con los datos mostrados en el apartado de consideraciones metodológicas y con estudios previos (Chowdhury *et al*, 2000), el número total de neuronas detectadas en la MeA con la exposición a 20 minutos de IMO fue superior al obtenido con la exposición a 4 horas de IMO prolongada, sugiriendo una degradación de la proteína durante este periodo de tiempo. Así mismo, en el mpdPVN el número total de neuronas detectadas con la exposición a 20 minutos de IMO fue inferior al obtenido con la exposición a 4 horas de IMO prolongada, sugiriendo un reclutamiento de nuevas neuronas durante la exposición prolongada a la IMO.

El análisis del número de neuronas ya activadas durante la IMO prolongada que son capaces de responder de nuevo tras otra IMO o tras el nado (IF+/FISH+), indica que únicamente en el mpdPVN el número de células obtenido con la exposición al nado tras la IMO prolongada fue mayor que el obtenido con 4 horas de IMO o con la re-exposición a la IMO. Esto sugiere que existe una pequeña proporción de células que ya se activaron durante la IMO prolongada, que son capaces de responder de nuevo frente a una nueva situación estresante. Aunque en el LSV no se observa ningún incremento en el número de neuronas IF+/FISH+ con la re-exposición a la IMO o con la exposición al nado tras la IMO prolongada, en el marcaje simple mediante FISH hemos podido observar un incremento en la DOI total al exponer a los animales a una segunda IMO, lo que sugiere que neuronas que se activaron durante la IMO prolongada se vuelven a activar con la re-exposición a la IMO y a otro estímulo estresante como el nado.

Respecto a la activación de nuevas neuronas (IF-/FISH+), se observa que en el PrL, el LSV y la MeA el número de neuronas obtenido con la exposición al nado tras la IMO prolongada es superior al obtenido tras 4 horas de IMO o tras la re-exposición a la IMO, sugiriendo la existencia de poblaciones neuronales capaces de responder *de novo* al nado tras una IMO prolongada. Solamente en el PrL se observan también neuronas de nueva activación con la liberación y re-exposición a la IMO aunque inferior en número al obtenido con el nado, sugiriendo que una parte de las neuronas IF-/FISH+ podría responder a procesos comunes como la manipulación o la propia liberación de la IMO. Tras la IMO prolongada, en ningún caso el número de neuronas de nueva activación con la exposición al nado fue equivalente al observado tras una sola exposición aguda al nado, aunque en el PrL estos valores fueron notablemente más elevados que en resto de áreas. Los datos sugieren que existe una población de neuronas comunes a la IMO y al nado, y otra población específica para cada estímulo.

Al no disponer de los datos individuales de DOI por célula desconocemos el aporte real a la DOI total de las neuronas previamente activadas durante la IMO prolongada y de aquellas de nueva activación. Sin embargo, a la vista de los resultados es muy probable que la respuesta de DOI observada con la exposición a un segundo estímulo tras la IMO prolongada sea debida a una combinación, en mayor o en menor medida, de neuronas previamente activadas durante la IMO prolongada y de neuronas de nueva activación (cuando éstas aparecen). El análisis de la aportación de uno y otro grupo de neuronas a la respuesta tras la IMO prolongada merece ser estudiado.

En conjunto, los resultados obtenidos en el PrL sugieren la existencia de tres tipos de poblaciones neuronales: (a) **una población que respondió a la IMO prolongada cuya expresión de c-fos estaría en parte bloqueada**, es decir, incapacitada para una nueva activación; (b) **una nueva población capaz de responder frente a un estímulo estresante de carácter inespecífico**, como la simple manipulación del animal para liberarlo de la IMO o al hecho de la liberación en sí; y

(c) una pequeña población de neuronas capaz de responder de novo exclusivamente frente a un nuevo estímulo (nado).

El hecho de que una parte de la población de neuronas que ha respondido a la IMO prolongada se encuentre bloqueada para una nueva activación, sugiere la existencia de mecanismos de represión a nivel intracelular que podrían participar en la disminución progresiva de la expresión de c-fos en respuesta a un estímulo estresante de carácter emocional aplicado de manera prolongada. Sería de gran relevancia conocer si esta incapacidad de respuesta afecta a procesos diferentes de la expresión de c-fos y muy especialmente cuál es su comportamiento electrofisiológico.

Existen distintas alternativas para explicar la existencia de nuevas poblaciones neuronales en el PrL capaces de responder a la liberación y posterior re-exposición a la IMO. Es posible que la liberación del animal tras una IMO prolongada provoque la activación de una población neuronal específica que detecte la liberación del animal de la situación estresante y participe en procesos como la aceleración de la recuperación post-estrés del eje HPA (García *et al.*, 2000, Belda y Armario, NP). Estudios recientes parecen confirmar que los glucocorticoides participan en este proceso en el PrL activando la liberación de endocannabinoides, que a su vez disminuirían la liberación de GABA (Hill *et al.*, 2011) con la consiguiente mayor activación de las señales glutamatérgicas descendientes inhibitorias hacia el PVN. Basándonos en estos resultados, es posible que la activación de nuevas neuronas observada con la liberación del animal sea responsable de la puesta en marcha de mecanismos similares. No obstante, cabe la posibilidad de que estas neuronas respondan en realidad a la manipulación del animal, que podría interpretarse como una nueva situación potencial de peligro.

La activación de nuevas neuronas como consecuencia de la exposición al nado tras una IMO prolongada (comparando con los efectos de la liberación del animal y la re-exposición a la IMO), sugiere la existencia de una pequeña población neuronal que responde específicamente al nado. Este hecho no es en principio sorprendente al tratarse de un nuevo estímulo con características muy diferentes a la IMO. No obstante, los resultados de expresión de c-fos en el mPFC en respuesta a distintos estímulos estresantes parecen sugerir una activación no específica resultado de la activación de los procesos de *arousal*. En función de los datos del presente trabajo, es posible que una parte sustancial de las neuronas activadas corresponda a estos procesos, en tanto que existiría una población neuronal que respondería más específicamente a cada tipo de estímulo.

Una respuesta específica del mPFC a cada estímulo estresante es razonable considerando que posiblemente cada situación plantea consecuencias y estrategias de afrontamiento diferentes. Dado que el animal puede moverse con mucha más libertad durante el nado, la activación de estas neuronas podría deberse al propio movimiento del animal. No obstante, se ha observado que la estimulación optogenética directa de las neuronas piramidales del mPFC no es suficiente para provocar un incremento de la actividad ni en el nado ni en el campo abierto (Warden *et al.*, 2012), lo que sugiere una escasa implicación directa en la actividad motora. Dado que en el nado forzado el animal puede también decidir entre la actividad (afrontamiento activo) y la inmovilidad (afrontamiento pasivo), otra posibilidad es que existan diferencias en las estrategias de afrontamiento de ambos estímulos que pudieran conllevar la activación de una nueva población neuronal. A este respecto, datos electrofisiológicos en rata demuestran la existencia de una población neuronal en el mPFC que responde en el momento en que el animal pasa de una estrategia pasiva a otra activa (Warden *et al.*, 2012). Además, la estimulación optogenética selectiva de

las neuronas del PrL que proyectan al DRN, un núcleo serotoninérgico clave en diversas psicopatologías como la depresión, es capaz de inducir un efecto profundo, rápido y reversible sobre la selección de estrategias activas (Warden *et al.*, 2012).

La existencia de neuronas de la región PrL que controlan las conductas activas es compatible con los datos de Amat *et al.* (2005) que observan una mayor activación de neuronas serotoninérgicas del DR con la exposición al choque incontrolable que al controlable, y que la inhibición del mPFC con un agonista del receptor GABA-A (muscimol) previa al estrés controlable provoca una activación del DR similar a la obtenida con un estrés incontrolable, sin afectar a la respuesta al incontrolable. Estos datos sugieren que el mPFC reduce la respuesta al estrés si hay posibilidad de control.

Sin embargo, otros resultados parecen apoyar un papel del mPFC en la aparición de conductas de afrontamiento pasivo. Así, se ha observado una disminución de la inmovilidad en el nado forzado tras la inactivación temporal del PrL mediante la micro-inyección de cloruro de cobalto (Scopinho *et al.*, 2010). Estudios más recientes sugieren que la liberación de 5-HT a nivel prefrontal tendría una implicación relevante en la determinación de la estrategia de afrontamiento, dado que el vaciado serotoninérgico a este nivel es capaz de inhibir la liberación de GABA en respuesta al nado en la BLA a la vez que disminuye las estrategias de afrontamiento pasivo (Andolina *et al.*, 2013). En conjunto, los datos sugieren una participación importante de la mPFC en las estrategias de afrontamiento, aunque su papel concreto, así como el del sistema serotoninérgico, están por definir.

Los resultados obtenidos en el LSv sugieren la existencia de dos poblaciones neuronales bien diferenciadas: (a) **una población que respondió a la IMO prolongada y que se encuentra en parte bloqueada** tanto para responder a una segunda IMO como al nado; y (b) **una nueva población capaz de responder exclusivamente al nado tras la IMO prolongada**. El hecho de que no se observe un mayor número de neuronas con la re-exposición a la IMO no implica que éstas no estén activándose de nuevo, ya que en el marcaje simple puede observarse un claro incremento en la DOI total. Valiéndonos de ambos datos, podríamos concluir que en este núcleo existen neuronas capaces de activarse de nuevo en respuesta a las señales asociadas a la simple manipulación del animal o a la liberación de la IMO.

Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que la terminación de la IMO es capaz de acelerar la vuelta al estado basal de la expresión de c-fos en el LSv (Trnecková *et al.*, 2007) y esta aceleración se acentúa en los animales que tienen una experiencia previa con la situación estresante (Vallés *et al.*, 2006). Puesto que en nuestro caso se observó una nueva activación de c-fos tras la re-exposición a la IMO, parece evidente que esta nueva activación estaría asociada a la re-exposición a la situación estresante. No está claro como estos datos se pueden hacer compatibles con la idea de un papel inhibitorio del LSv en la respuesta de estrés (ver introducción) pues los datos de c-fos sugieren más bien un paralelismo con la dinámica de la respuesta del eje HPA.

La aparición de neuronas de nueva activación en el LSv con la exposición al nado tras una IMO prolongada, sugiere la existencia de una población neuronal que responde específicamente al nado. Estudios recientes, han sugerido un papel modulador del LSv en la estrategia de afrontamiento durante el nado forzado (Singewald *et al.*, 2011). Animales lesionados bilateralmente en el LS muestran una estrategia de afrontamiento más pasiva que los animales control, lo que sugiere que el LSv favorecería las conductas activas. Tanto los glucocorticoides, como la 5-HT

podrían tener una implicación relevante en el papel modulador del LSv, ejerciendo como reguladores negativo y positivo respectivamente sobre el afrontamiento activo.

Los resultados obtenidos en la MeA sugieren la existencia de dos poblaciones neuronales: /a) **una población que respondió a la IMO prolongada y se encontraría parcialmente bloqueada para responder a cualquier estímulo posterior;** y (b) **una pequeña población de neuronas que respondería exclusivamente al nuevo estímulo (nado).** Al contrario de lo que sucede en el PrL y en el LSv, en la MeA no se observa ninguna respuesta adicional a la liberación del animal y la re-exposición a la IMO, sugiriendo que no están llegando señales asociadas a estos estímulos o que las señales inciden en neuronas cuya activación está bloqueada. El hecho de que exista una importante población neuronal que se encuentra parcialmente bloqueada, sugiere que sólo una parte de ellas son capaces de activarse en respuesta al nado aunque estén llegando nuevas señales.

La aparición en la MeA de nuevas neuronas activadas con la exposición al nado tras una IMO prolongada sugiere la existencia de una población neuronal que responde específicamente a este estímulo. Aunque existan trabajos antiguos con lesiones de la MeA que sugieren una implicación en la función locomotora espontánea (Korczynski y Fonberg, 1979), estudios más recientes utilizando lesión electrolítica bilateral de la MeA indican que esta región no tiene una implicación relevante en la actividad locomotora (Vinkers *et al.*, 2010), sugiriendo que la activación de estas neuronas podría deberse a otras características diferenciales del nado frente a la IMO que no guardan una relación directa con la locomoción. No obstante, la administración de antidepresivos directamente en la MeA es capaz de provocar una disminución de la inmovilidad en el test de nado forzado (Salomé *et al.*, 2006; Kawashiwa *et al.*, 1990) y estos efectos parecen estar mediados por terminales noradrenérgicas de la MeA (Araki *et al.*, 1985; Kawashiwa *et al.*, 1987). De esta manera, la elección del afrontamiento activo en el nado forzado podría depender de una población de neuronas de la MeA que podría no estar implicada en la respuesta a un estímulo de características diferentes como la IMO.

Los resultados obtenidos en el mpdPVN parecen confirmar la existencia de **una sola población neuronal que responde tanto al nado como a la IMO y que se encontraría en su mayor parte bloqueada para una nueva respuesta al nado tras la IMO prolongada.** Dicho de otra manera, en el mpdPVN no habría especificidad respecto al estímulo estresante. No obstante, en el análisis del doble marcaje hemos podido observar un incremento en el número de neuronas doble positivas al exponer a los animales al nado tras una IMO prolongada. Esto sugiere que aunque la mayoría de las neuronas del mpdPVN estén bloqueadas, todavía existe una pequeña población que es capaz de volver a activarse por las nuevas señales asociadas a la exposición al nado. Aunque esta conclusión no se ven apoyada por los resultados de la DOI total en la cual no se detectó incremento adicional con el nado, sí concuerda con lo observado previamente en el análisis mediante ISH radiactiva del primer experimento. Esta discrepancia podría explicarse por la ya comentada probable menor sensibilidad del método fluorescente con respecto al método radiactivo.

A pesar de la ligera activación observada en términos de c-fos, parece que la respuesta del eje HPA medida mediante ISH radiactiva del hnRNA de CRF se encuentra totalmente bloqueada. Sin descartar que puede existir un pequeño incremento no detectado por razones metodológicas, es muy probable que exista un bloqueo específico de la expresión del gen del CRF (Liu *et al.*, 2009) que sea independiente del bloqueo de la expresión de c-fos, en la línea de lo discutido en el primer experimento.

Aunque el conjunto de mecanismos que están participando en la disminución de la expresión de *c-fos* y de la activación del eje HPA en respuesta al estrés prolongado todavía no están aclarados, los datos presentados en este trabajo junto con datos previos de la bibliografía, sugieren que muchas neuronas previamente activadas no se encuentran incapacitadas para una nueva respuesta en términos de *c-fos*. Este hecho da relevancia a la caracterización de las señales que llegan a las neuronas frente a posibles mecanismos de represión a nivel intracelular. Sin embargo, la activación central del eje HPA parece mucho más restringida tras el estrés sostenido, indicando una mayor participación de procesos de represión a nivel transcripcional que podría tener una relación directa con el bloqueo total observado a nivel periférico. ***En cualquier caso, aunque en algunas regiones como el mPFC, el LSv o la MeA, existan neuronas capaces de responder tras el estrés prolongado, incluyendo la participación de poblaciones neuronales que responden específicamente al nuevo estímulo, nuestros datos sugieren consistentemente que la respuesta del eje HPA está muy bloqueada. Tras una activación intensa de la transcripción y de la síntesis de CRF que tendería a compensar el incremento de liberación inicial y la consiguiente liberación periférica de ACTH y corticosterona, el bloqueo de la actividad del eje HPA podría ser importante para prevenir patologías asociadas a una elevación crónica de glucocorticoides (Aguilera et al, 2007).***

Influencia del “arousal” en la inducción de *c-fos* en respuesta a estrés emocional

La exposición a diferentes tipos de estímulos estresantes pura o predominantemente emocionales parece desencadenar un patrón cerebral de expresión de *c-fos* en gran parte común, incluso si estos estímulos difieren enormemente en sus características (Cullinan *et al.*, 1995; Kovács, 1998; Ons *et al.*, 2004). Dentro de este grupo de áreas se incluirían áreas corticales, algunos núcleos talámicos y de la amígdala, el LS, el BST anterior, la FH y la PAG. Se considera que la activación de estas áreas podrían estar relacionadas al menos en parte, con un estado de activación general o de *arousal* (Cullinan *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Campeau y Watson, 1997; Kollack-Walker *et al.*, 1997). ***El estado de arousal podría ser un factor común a la mayoría de estímulos emocionales que podría explicar el patrón común de activación. En consecuencia, el arousal podría suponer la activación de un gran número de neuronas, que enmascararía aquellas poblaciones neuronales que son realmente importantes en la respuesta al estrés.***

El conjunto de datos disponibles en la bibliografía sugiere que el sistema LC-NA podría mediar o ser un elemento importante de la respuesta de *arousal* y de estrés en regiones telencefálicas (Berridge, 2008). Así mismo, existen evidencias de que el sistema LC-NA tiene un papel relevante en la expresión telencefálica de *c-fos* en respuesta al estrés emocional (Stone *et al.*, 1993; 1995; 2007; Duncan *et al.*, 1996; Williams y Morilak, 1997; Yamada *et al.*, 1999; Spencer y Day, 2004). Para estudiar la influencia de los mecanismos de *arousal* sobre la inducción de *c-fos* en respuesta al estrés emocional, en el presente trabajo hemos reducido el número de terminales noradrenérgicas provenientes del LC mediante la administración de DSP-4. El DSP-4 es una neurotoxina potente y altamente selectiva que es capaz de inducir neurodegeneración de las terminales noradrenérgicas provenientes del LC sin afectar a los axones provenientes de otros grupos celulares noradrenérgicos (Fritschy y Grzanna, 1989; 1991). Animales administrados con vehículo o DSP-4 fueron expuestos una semana después a estímulos estresantes diferentes tanto cualitativamente

como en términos de intensidad como son el ambiente nuevo (intensidad baja), el olor al depredador (intensidad media) y la IMO (intensidad alta) (Marti *et al.*, 2001; Muñoz-Abellán *et al.*, 2008). Para conocer el alcance de la lesión, hemos estudiado el número de terminales noradrenérgicas en el mPFC, el LSv, la MeA y el mpdPVN mediante inmunofluorescencia de la D β H, la enzima que transforma la dopamina en NA. Seguidamente, hemos analizado el efecto de la lesión sobre la activación periférica del eje HPA (niveles de ACTH) y la expresión de c-fos (FISH) tras la exposición a los distintos estímulos estresantes.

Los resultados obtenidos en el análisis de la D β H mostraron que únicamente en el mPFC y la MeA se dio una reducción del número de terminales noradrenérgicas con la administración del DSP-4, no observándose ningún efecto en el LSv ni en el mpdPVN. En concordancia con lo observado, diversos estudios han observado que tanto el mPFC como la MeA reciben una inervación notable del LC (ver Samuels y Szabadi, 2008). Sin embargo, aunque el LSv y el PVN reciben cierta inervación del LC, su fuente principal de NA proviene de otros grupos celulares del bulbo (Lindvall y Steveni, 1978, Cunningham y Sawchenko, 1988), siendo imperceptible la disminución de las terminales tras la administración del fármaco. Nuestros datos también concuerdan con estudios previos de inmunohistoquímica de D β H y de determinación de la concentración tisular de NA tisular tras la administración de la misma dosis de DSP-4 (Fritschy y Grzanna, 1989; Szot *et al.*, 2010). No obstante, utilizando una dosis algo mayor (60 mg/Kg) sí que se han llegado a observar efectos sobre el PVN diez días después de la lesión (Daniels *et al.*, 1989).

Aunque existen estudios que sugieren una implicación de la administración de DSP-4 en la conducta, sobre todo a nivel de actividad exploratoria (Harro *et al.*, 1995, 1999a; Delini-Stula *et al.*, 1984), en nuestro experimento no hemos observado ningún efecto. Es posible que los cambios a nivel conductual dependan en mayor o en menor medida del tiempo transcurrido tras la lesión, ya que los citados trabajos fueron realizados 15 días tras la administración del fármaco mientras que en nuestro caso transcurrió sólo una semana. Así mismo, se ha observado que la administración de distintas dosis de DSP-4 es capaz de provocar efectos diferentes sobre la inmovilidad en el test de natación forzada aplicado 8 días después, con un incremento de la misma a bajas dosis disminuyendo progresivamente con dosis más elevadas (Harro *et al.*, 1999b). Este menor efecto sobre la inmovilidad a dosis elevadas de DSP-4 podría estar asociado a un incremento en la sensibilidad del receptor β -adrenérgico post-sináptico de NA inducida por una mayor denervación noradrenérgica.

La exposición aguda a los distintos estímulos estresantes produjo una elevación de los niveles de c-fos en todas las áreas estudiadas salvo en el mpdPVN de los animales expuestos a un ambiente nuevo, sugiriendo que este estímulo no es lo suficientemente intenso como para desencadenar una respuesta consistente en esta región. En el mPFC y el mpdPVN el olor produjo una elevación de los niveles de c-fos que fue similar a la obtenida con el ambiente nuevo, mientras que esta activación fue superior en el LSv y la MeA. La exposición a la IMO produjo una elevación de los niveles de c-fos que resultaron inferiores a los obtenidos con la exposición al ambiente nuevo y al olor en el caso del Cg1, PrL e IL, y superiores en el caso del LSv y del mpdPVN. En la MeA, los niveles obtenidos con la IMO resultaron equivalentes a los obtenidos con el ambiente nuevo e inferiores a los obtenidos con el olor del gato. En concordancia con datos previos de nuestro laboratorio (Muñoz-Abellán *et al.*, no publicado), los resultados obtenidos con la exposición al olor del gato en el mPFC y la MeA respecto al ambiente nuevo y a la IMO sugieren que el olor de gato posee propiedades particulares que no están relacionadas exclusivamente con la intensi-

dad del estrés sino con el procesamiento de la información olfativa y la relevancia biológica de dicho olor como estímulo aversivo (Takahashi *et al.*, 2005). De igual manera y en concordancia con resultados previos obtenidos en el córtex piriforme (Rotllant *et al.*, no publicado), los resultados obtenidos en el mPFC con la exposición al ambiente nuevo respecto a la IMO, sugieren factores diferenciales en estos dos estímulos que son independientes de su intensidad y que podrían estar relacionados con la componente exploratoria/olfatoria del ambiente nuevo.

Teniendo en cuenta resultados previos indicando que la expresión de c-fos en el LSv y el mpdPVN es un buen marcador de la intensidad del estímulo estresante (Ons *et al.*, 2004), los resultados hormonales y de c-fos obtenidos en este trabajo indican que los tres estímulos estresantes utilizados difieren en intensidad, siendo el ambiente nuevo el de menor y la IMO el de mayor intensidad. Así, la exposición a los distintos estímulos estresantes produjo, en concordancia con estudios previos, una elevación de los niveles de ACTH que fue proporcional a la intensidad del estrés (Marti *et al.*, 2001; Muñoz-Abellán *et al.*, 2008). No se observó ningún efecto de la administración del DSP-4 en la respuesta del ACTH, de acuerdo con un estudio previo utilizando la respuesta de corticosterona al eter (Dooley *et al.*, 1984; Daniels *et al.*, 1989). Parece por lo tanto, que el funcionamiento del eje HPA no se ve afectado por la lesión de las terminales noradrenérgicas provenientes del LC. No obstante, es posible que la influencia del LC sobre el eje HPA dependa de la aproximación metodológica utilizada. Puede conseguirse una lesión específica de las terminales noradrenérgicas del mPFC mediante la micro-inyección de saporina conjugada con un anticuerpo contra la D β H en esta misma región. Esta inmunotoxina es captada selectivamente por las terminales noradrenérgicas provenientes del LC y es transportada retrógradamente destruyendo las neuronas que la han captado. Esta lesión se ha demostrado capaz de disminuir, 14 días después de su administración, la expresión del mRNA de CRF en el PVN y la liberación de ACTH en respuesta al *restraint* (Radley *et al.*, 2008). No obstante, se ha de tener en cuenta que la destrucción de las neuronas implica la eliminación de señales asociadas a otros neurotransmisores/neuromoduladores coexpresados por las neuronas del LC, incluyendo neuropéptidos.

Únicamente en el LSv y tras la exposición aguda a la IMO se observó un efecto de la administración del DSP-4 provocando una disminución de la expresión de c-fos tanto en la DOI como en el número de células. La influencia de la lesión parece afectar a la inducción de c-fos sólo cuando los animales son expuestos a un estímulo estresante de elevada intensidad. Es posible que este tipo de estímulos requieran una mayor participación de la señalización noradrenérgica en comparación con otros de menor intensidad, llegando a provocar un descenso notable en la expresión de c-fos cuando el sistema LC-NA está dañado. Los efectos de la administración del fármaco en el LSv podrían ser indirectos al no existir una reducción en las terminales noradrenérgicas de este núcleo pudiendo deberse a una disminución de las señales estimuladoras procedentes de otras regiones más afectadas por la lesión como el mPFC. La posibilidad de que las aferencias noradrenérgicas al LSv tengan un papel relevante en la respuesta a determinados estímulos estresantes es compatible con el hecho de que el estrés induce la liberación de NA en este núcleo (Morilak *et al.*, 2005). Así mismo, el hecho de que la microinyección de antagonistas de los receptores α -1-y β en este núcleo disminuyan la conducta defensiva de enterramiento en respuesta al choque eléctrico, sugiere un papel relevante de la liberación de NA en esta respuesta, facilitando el afrontamiento activo (Bondi *et al.*, 2007).

Estos resultados sugieren que la administración del DSP-4 y la consecuente disminución en las terminales noradrenérgicas no es suficiente para alterar la expresión de c-fos en respuesta a

estímulos estresantes de diferente intensidad en la mayoría de las áreas estudiadas, a pesar de la disminución en el número de terminales noradrenérgicas observada en el mPFC y la MeA. Nuestros resultados no concuerdan con datos previos de la literatura que aportan evidencias de que la lesión específica del LC o el bloqueo de los receptores α -1 y β adrenérgicos, son capaces de reducir sustancialmente el incremento de los niveles de mRNA de c-fos en respuesta a la inmovilización en el cortex cerebral (Stone *et al.*, 1993, 1995). Así mismo, mediante inmunohistoquímica, se ha observado una reducción del número de células positivas para c-Fos en respuesta al nado forzado en el cortex orbital medial y ventrolateral tras el bloqueo de los receptores α -1 y β adrenérgicos (Duncan *et al.*, 1996). Es posible que sólo un bloqueo total de la función noradrenérgica, ya sea mediante lesión del LC o por bloqueo de receptores, sea capaz de provocar una disminución de la expresión de c-fos. Por el contrario, la lesión específica de las terminales noradrenérgicas del mPFC sería capaz de provocar un incremento de la expresión de c-fos en esta misma región en respuesta al *restraint* (Radley *et al.*, 2008), sugiriendo un papel diferencial de los distintos sistemas noradrenérgicos.

Por otro lado, si la lesión no es completa pueden aparecer mecanismos compensatorios visibles a partir de los 7-10 días de la lesión con DSP-4. El sistema noradrenérgico y el serotoninérgico pueden trabajar conjuntamente en regiones de proyección común como el mPFC (Briand *et al.*, 2007), siendo capaces de desarrollar respuestas compensatorias que podrían disminuir el efecto de la lesión. Así mismo, estudios de microdialisis han demostrado que los niveles extracelulares de NA no se reducen sustancialmente a menos que los niveles intracelulares disminuyan más de un 90% (Abercrombie y Zigmond, 1989), habiéndose observado incluso un incremento en la NA extracelular a los cinco días de la administración del fármaco a una dosis de 40 mg/kg (Hughes y Stanford, 1998). Además, estas lesiones pueden provocar un incremento en el número de receptores post-sinápticos y en los niveles de segundos mensajeros, observándose en algunos casos una hiperactividad, más que una hipoactividad noradrenérgica (Berridge y Dunn, 1990). Finalmente, el alcance de la lesión puede llegar a depender de la cepa de rata utilizada. Estudios de inmunohistoquímica de la D β H sugieren consistentemente que las ratas de la línea Long Evans son menos sensibles a los efectos neurotóxicos del DSP-4 en comparación con la línea Sprague-Dawley (Schuerger *et al.*, 1995). Por estas razones, incluso en presencia de efectos significativos, se ha de tomar precaución en la interpretación de los resultados. ***En resumen, el escaso impacto de la lesión podría explicarse por la existencia de mecanismos compensatorios propios del sistema noradrenérgico o ajenos al mismo. Sería necesario, por lo tanto, valorar otras alternativas para disminuir la aportación del arousal a la respuesta de estrés.***

conclusiones

Conclusiones

- (1) **La exposición a una IMO aguda produjo una marcada inducción de la expresión de *c-fos* en todas las áreas estudiadas, así como una marcada activación central y periférica del eje HPA.** En todos los casos, esta activación inicial disminuyó tras una exposición prolongada (4 h) a la IMO.
- (2) **En un primer experimento utilizando ISH radiactiva, hemos observado que la exposición a una nueva situación estresante (nado forzado) tras la IMO prolongada indujo un notable incremento en la expresión de *c-fos* en el mPFC, el LSv y la MeA.** Esto sugiere que las neuronas activadas durante la IMO son capaces de responder frente a un nuevo estímulo o que se están activando nuevas neuronas con el nado.
- (3) **En el PVN la respuesta a un nuevo estímulo parece estar en su mayor parte bloqueada,** sugiriendo el predominio de una única población neuronal que responde indistintamente a diferentes estímulos estresantes en las cuales la expresión de *c-fos* está en gran parte bloqueada.
- (4) **De manera similar, la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo parece estar bloqueada tanto a nivel central** (niveles del hnRNA de CRF en el PVN) como periférico (niveles de ACTH). Por lo tanto, el bloqueo en la expresión de CRF tras el estrés prolongado parece sobre todo asociado a una represión a nivel intracelular. El bloqueo de la respuesta de la ACTH podría responder tanto a una disminución de la liberación de CRF en la eminencia media, como a una incapacidad de la adenohipófisis para responder a los factores hipotalámicos estimuladores, incluido el CRF.
- (5) **En un segundo experimento utilizando FISH hemos obtenido resultados equivalentes al primero en términos de intensidad total de la señal (DOI).** También hemos observado que la re-exposición a la IMO tras la IMO prolongada produjo una activación en el PrL y en el LSv, sugiriendo que ambas regiones son capaces de activarse por la simple manipulación del animal o por la propia liberación de la IMO, aunque esta activación no superó la obtenida con la exposición al nado tras la IMO prolongada.
- (6) **Tras el doble marcaje, hemos observado que en el PrL, el LSv y la MeA, la exposición al nado tras la IMO prolongada provocó la participación de nuevas poblaciones neuronales sugiriendo cierta especificidad en la respuesta a estímulos estresantes de distinta naturaleza.** En el PrL también se observaron nuevas neuronas con la re-exposición a la IMO, lo que sugiere que existe una población de neuronas que podría ser sensible al proceso de liberación de la IMO.
- (7) **La expresión de *c-fos* en la MeA y el mpdPVN en respuesta a la IMO aguda resultó superior, en términos generales, a la obtenida con la exposición al nado agudo.** Estos datos sugieren que la expresión de *c-fos* en ambas regiones parece funcionar como un buen marcador de la intensidad del estrés.

- (8) Las neuronas ya activadas durante la exposición prolongada a un estímulo estresante no se encuentran necesariamente impedidas para responder de nuevo**, como se observa con la re-exposición a la IMO en el LSv. Aunque no podemos descartar la participación de mecanismos de represión a nivel intracelular en la disminución de la expresión de *c-fos* en respuesta al estrés prolongado, los cambios en las señales que llegan a las neuronas juegan un papel relevante.
- (9) A nivel metodológico hemos confirmado la validez del doble marcaje mediante IF-FISH para la proteína c-Fos y su mRNA como herramienta para distinguir células activadas por distintos estímulos aplicados de manera secuencial.** No obstante, la realización de controles y la elección del método óptimo de captación de imágenes son de crucial importancia de cara a una correcta interpretación de los resultados.
- (10) La administración de DSP-4 provocó una disminución de las terminales noradrenérgicas solamente en el mPFC y en la MeA.** Esta lesión no tuvo un impacto sobre la expresión de *c-fos* en respuesta a los distintos estímulos estresantes, salvo en la respuesta del LSv a la IMO donde se observó una disminución. El escaso impacto de la lesión podría explicarse por la existencia de mecanismos compensatorios propios del sistema noradrenérgico o ajenos al mismo. Sería necesario, por lo tanto, valorar otras alternativas para disminuir la aportación del *arousal* a la respuesta de estrés.
- (11) La expresión de c-fos en el LSv y en el mpdPVN fue capaz de discriminar entre estímulos estresantes de diferente intensidad** (ambiente nuevo, olor del gato e IMO). En el mPFC y la MeA el olor del gato produjo niveles de expresión de *c-fos* superiores al ambiente nuevo y a la IMO sugiriendo que el olor de gato posee propiedades particulares que no están relacionadas exclusivamente con la intensidad del estrés sino con el procesamiento de la información olfativa y la relevancia biológica de dicho olor como estímulo aversivo.
- (12) En conjunto, los resultados sugieren que en la reducción de la expresión de c-fos observada tras la exposición prolongada a un estímulo emocional pueden intervenir tanto la familiarización con el estímulo y la consiguiente reducción de las señales estimuladoras como la represión intracelular de la expresión del gen.** La contribución de cada uno de los mecanismos es marcadamente dependiente del área estudiada. En la respuesta del eje HPA podrían añadirse bloqueos adicionales que probablemente contribuyen a reducir el posible impacto negativo de una liberación excesiva de glucocorticoides. Así mismo, parecen existir poblaciones de neuronas específicas para la IMO y el nado, aunque muchas de ellas pueden ser comunes a ambos.

bibliografía

a

- Abercrombie, E. D., & Jacobs, B. L. (1988). Systemic naloxone administration potentiates locus coeruleus noradrenergic neuronal activity under stressful but not non-stressful conditions. *Brain Res*, 44(1-2), 362-366.
- Abercrombie, E. D., & Zigmond, M. J. (1989). Partial injury to central noradrenergic neurons: reduction of tissue norepinephrine content is greater than reduction of extracellular norepinephrine measured by microdialysis. *J Neurosci*, 9(11), 4062-4067.
- Adan, R. A., & Gispen, W. H. (2000). Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol*, 40(1-3), 13-24.
- Aguilera, G., Kiss, A., Liu, Y., & Kamitakahara, A. (2007). Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress*, 10(2), 153-161.
- Aguilera, G., & Liu, Y. (2012). The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol*, 33(1), 67-84.
- Aguilera, G., Nikodemova, M., Wynn, P. C., & Catt, K. J. (2004). Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*, 25(3), 319-329.
- Akana, S. F., Chu, A., Soriano, L., & Dallman, M. F. (2001). Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol*, 13(7), 625-637.
- Alheid, G. F. (2003). Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 185-205.
- Al-Noori, S., Sanders, N. M., Taborsky, G. J., Jr., Wilkinson, C. W., Zavosh, A., West, C., et al. (2008). Recurrent hypoglycemia alters hypothalamic expression of the regulatory proteins FosB and synaptophysin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(5), R1446-1454.
- Amat, J., Baratta, M.V., Paul, E., Bland, S.T., Watkins, L.R., Maier, S.F. (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci*. 8(3):365-71.
- Andolina, D., Maran, D., Valzania, A., Conversi, D., & Puglisi-Allegra, S. (2013). Prefrontal/amygdalar system determines stress coping behavior through 5-HT/GABA connection. *Neuropsychopharmacology*, 38(10), 2057-2067.
- Antoni, F. A. (1986). Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev*, 7(4), 351-378.
- Armario, A. (1998). Estrés: concepto y respuesta fisiológica. In: Tresguerres, J. and et al. (Eds.), *Tratado de endocrinología básica y clínica. Síntesis*, Madrid, pp. 2176-2205.
- Armario, A. (2006a). The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressors. In: Pinaud, R. and Tremere, L. (Eds.), *Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders*. Springer science.
- Armario, A. (2006b). Fisiología y fisiopatología del estrés. In: Achetegui Laizate, J. (Ed.), *El estrés crónico: aspectos clínicos y terapéuticos*. Edicions Mayo, Barcelona, pp. 19-29.
- Armario, A., Daviu, N., Muñoz-Abellan, C., Rabasa, C., Fuentes, S., Belda, X., et al. (2012). What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell Mol Neurobiol*, 32(5), 749-758.
- Armario, A., & Jolin, T. (1989). Influence of intensity and duration of exposure to various stressors on serum TSH and GH levels in adult male rats. *Life Sci*, 44(3), 215-221.
- Aston-Jones, G., & Cohen, J. D. (2005). Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol*, 493(1), 99-110.

- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., & Cohen, J. (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry*, *46*(9), 1309-1320.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., & Cohen, J. (2000). Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res*, *126*, 165-182.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Ivanova, S., Usher, M., & Cohen, J. (1998). Neuromodulation and cognitive performance: recent studies of noradrenergic locus ceruleus neurons in behaving monkeys. *Adv Pharmacol*, *42*, 755-759.
- Armstrong, W. (1995). Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System* (2ed). Academic Press, Sidney, pp. 377-403.

b

- Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *44*, 525-557.
- Belda, X., & Armario, A. (2009). Dopamine D1 and D2 dopamine receptors regulate immobilization stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychopharmacology (Berl)*, *206*(3), 355-365.
- Berridge CW. (2005) The locus coeruleus-noradrenergic system and stress: modulation of arousal state and state-dependent behavioral processes. *Handbook of Stress and the Brain. Part I: The Neurobiology of Stress*. Elsevier B.V; Amsterdam: pp. 437-464.
- Berridge, C. W. (2008). Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev*, *58*(1), 1-17.
- Berridge, C. W., & Dunn, A. J. (1990). DSP-4-induced depletion of brain norepinephrine produces opposite effects on exploratory behavior 3 and 14 days after treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, *100*(4), 504-508.
- Berridge, C. W., Page, M. E., Valentino, R. J., & Foote, S. L. (1993). Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *Neuroscience*, *55*(2), 381-393.
- Berridge, C. W., Schmeichel, B. E., & Espana, R. A. (2012). Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Med Rev*, *16*(2), 187-197.
- Berridge, C. W., Stellick, R. L., & Schmeichel, B. E. (2005). Wake-promoting actions of medial basal forebrain beta2 receptor stimulation. *Behav Neurosci*, *119*(3), 743-751.
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, *42*(1), 33-84.
- Bhatnagar, S., & Dallman, M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*, *84*(4), 1025-1039.
- Bing, G., Stone, E. A., Zhang, Y., & Filer, D. (1992). Immunohistochemical studies of noradrenergic-induced expression of c-fos in the rat CNS. *Brain Res*, *592*(1-2), 57-62.
- Bonaz, B., & Rivest, S. (1998). Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *Am J Physiol*, *275*(5 Pt 2), R1438-1449.
- Bondi, C. O., Barrera, G., Lapid, M. D., Bedard, T., Mahan, A., & Morilak, D. A. (2007). Noradrenergic facilitation of shock-probe defensive burying in lateral septum of rats, and modulation by chronic treatment with desipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(2), 482-495.
- Borowsky, B., & Kuhn, C. M. (1992). D1 and D2 dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacology*, *31*(7), 671-678.
- Borowsky, B., & Kuhn, C. M. (1993). GBR12909 stimulates hypothalamo-pituitary-adrenal activity by inhibition of uptake at hypothalamic dopamine neurons. *Brain Res*, *613*(2), 251-258.

- Boudaba, C., Szabo, K., & Tasker, J. G. (1996). Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci*, *16*(22), 7151-7160.
- Breuner, C. W., & Orchinik, M. (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*, *175*(1), 99-112.
- Briand, LA., Gritton, H., Howe, WM., Young, DA., Sarter, M. (2007) Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol*, *83*(2):69-91
- Britton, K. T., Segal, D. S., Kuczynski, R., & Hauger, R. (1992). Dissociation between in vivo hippocampal norepinephrine response and behavioral/neuroendocrine responses to noise stress in rats. *Brain Res*, *574*(1-2), 125-130.
- Bubser, M., & Deutch, A. Y. (1999). Stress induces Fos expression in neurons of the thalamic paraventricular nucleus that innervate limbic forebrain sites. *Synapse*, *33*(1), 13-22.

C

- Campeau, S., Akil, H., & Watson, S. J. (1997). Lesions of the medial geniculate nuclei specifically block corticosterone release and induction of c-fos mRNA in the forebrain associated with audiogenic stress in rats. *J Neurosci*, *17*(15), 5979-5992.
- Campeau, S., & Watson, S. J. (1997). Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol*, *9*(8), 577-588.
- Campeau, S., & Watson, S. J., Jr. (2000). Connections of some auditory-responsive posterior thalamic nuclei putatively involved in activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in response to audiogenic stress in rats: an anterograde and retrograde tract tracing study combined with Fos expression. *J Comp Neurol*, *423*(3), 474-491.
- Casady, R. L., & Taylor, A. N. (1976). Effect of electrical stimulation of the hippocampus upon corticosteroid levels in the freely-behaving, non-stressed rat. *Neuroendocrinology*, *20*(1), 68-78.
- Cassens, G., Kuruc, A., Roffman, M., Orsulak, P. J., & Schildkraut, J. J. (1981). Alterations in brain norepinephrine metabolism and behavior induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Behav Brain Res*, *3*(3), 387-407.
- Cassens, G., Roffman, M., Kuruc, A., Orsulak, P. J., & Schildkraut, J. J. (1980). Alterations in brain norepinephrine metabolism induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Science*, *209*(4461), 1138-1140.
- Ceccatelli, S., Villar, M. J., Goldstein, M., & Hokfelt, T. (1989). Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(23), 9569-9573.
- Cedarbaum, J. M., & Aghajanian, G. K. (1978). Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol*, *178*(1), 1-16.
- Champagne, D., Beaulieu, J., & Drolet, G. (1998). CRFergic innervation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus: a tract-tracing study. *J Neuroendocrinol*, *10*(2), 119-131.
- Chan, R. K., Brown, E. R., Ericsson, A., Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1993). A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci*, *13*(12), 5126-5138.
- Chan, R. K., & Sawchenko, P. E. (1994). Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol*, *348*(3), 433-460.
- Chaudhuri, A. (1997). Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport*, *8*(13), iii-vii; *8*(16), v-ix.

- Chaudhuri, A., Nissanov, J., Larocque, S., & Rioux, L. (1997). Dual activity maps in primate visual cortex produced by different temporal patterns of zif268 mRNA and protein expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, *94*(6), 2671-2675.
- Cheung, S., Ballew, J. R., Moore, K. E., & Lookingland, K. J. (1998). Contribution of dopamine neurons in the medial zona incerta to the innervation of the central nucleus of the amygdala, horizontal diagonal band of Broca and hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, *808*(2), 174-181.
- Chiasson, B. J., Hong, M. G., & Robertson, H. A. (1997). Putative roles for the inducible transcription factor c-fos in the central nervous system: studies with antisense oligonucleotides. *Neurochem Int*, *31*(3), 459-475.
- Chiu, K. P., Duca, K. A., Berman, S. A., Sullivan, T., & Bursztajn, S. (1996). A novel in situ double-labeling method for simultaneous detection of mRNA and expressed protein or two different mRNAs. *J Neurosci Methods*, *66*(2), 69-79.
- Choi, D. C., Furay, A. R., Evanson, N. K., Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2007). Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci*, *27*(8), 2025-2034.
- Chowdhury, G. M., Fujioka, T., & Nakamura, S. (2000). Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull*, *52*(3), 171-182.
- Clark, P. J., Bhattacharya, T. K., Miller, D. S., & Rhodes, J. S. (2011). Induction of c-Fos, Zif268, and Arc from acute bouts of voluntary wheel running in new and pre-existing adult mouse hippocampal granule neurons. *Neuroscience*, *184*, 16-27.
- Cole, R. L., & Sawchenko, P. E. (2002). Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, *22*(3), 959-969.
- Crane, J. W., Ebner, K., & Day, T. A. (2003). Medial prefrontal cortex suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a physical stressor, systemic delivery of interleukin-1beta. *Eur J Neurosci*, *17*(7), 1473-1481.
- Croiset, G., Nijsen, M. J., & Kamphuis, P. J. (2000). Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *Eur J Pharmacol*, *405*(1-3), 225-234.
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, *64*(2), 477-505.
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., & Watson, S. J. (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol*, *332*(1), 1-20.
- Cunningham, E. T., Jr., & Sawchenko, P. E. (1988). Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol*, *274*(1), 60-76.
- Curtis, A. L., Bello, N. T., & Valentino, R. J. (2001). Evidence for functional release of endogenous opioids in the locus ceruleus during stress termination. *J Neurosci*, *21*(13), RC152.
- Curtis, A. L., Pavcovich, L. A., Grigoriadis, D. E., & Valentino, R. J. (1995). Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience*, *65*(2), 541-550.
- Czigner, A., Mihaly, A., Farkas, O., Buki, A., Krisztin-Peva, B., Dobo, E. (2004). Dynamics and regional distribution of c-fos protein expression in rat brain after a closed head injury. *Int J Mol Med*, *14*(2), 247-252.

d

- Dal-Zotto, S., Marti, O., & Armario, A. (2000). Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res*, *114*(1-2), 175-181.

- Daniels, W. M., Jaffer, A., Searson, A., Russell, V. A., & Taljaard, J. J. (1989). The effect of partial noradrenergic denervation on corticosterone secretion in the rat. *Neurochem Res*, *14*(12), 1187-1190.
- Davis, K. D., Taylor, S. J., Crawley, A. P., Wood, M. L., & Mikulis, D. J. (1997). Functional MRI of pain- and attention-related activations in the human cingulate cortex. *J Neurophysiol*, *77*(6), 3370-3380.
- Day, H. E., Masini, C. V., & Campeau, S. (2004). The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res*, *1027*(1-2), 139-151.
- Dayas, C. V., Buller, K. M., Crane, J. W., Xu, Y., & Day, T. A. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*, *14*(7), 1143-1152.
- Dayas, C. V., Buller, K. M., & Day, T. A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci*, *11*(7), 2312-2322.
- Dayas, C. V., & Day, T. A. (2002). Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci*, *15*(10), 1712-1718.
- De Kloet, E. R. (2003). Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*, *37*(2), 51-68.
- De Kloet, E.R., Joëls, M. and Holsboer, F. (2005) *Stress and the brain*. from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, *6*, 463-475.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joels, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*, *22*(10), 422-426.
- De Kloet, E. R., Reul, J. M., & Sutanto, W. (1990). Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *37*(3), 381-394.
- Delini-Stula, A., Mogilnicka, E., Hunn, C., & Dooley, D. J. (1984). Novelty-oriented behavior in the rat after selective damage of locus coeruleus projections by DSP-4, a new noradrenergic neurotoxin. *Pharmacol Biochem Behav*, *20*(4), 613-618.
- Deurveilher, S., Lo, H., Murphy, J. A., Burns, J., & Semba, K. (2006). Differential c-Fos immunoreactivity in arousal-promoting cell groups following systemic administration of caffeine in rats. *J Comp Neurol*, *498*(5), 667-689.
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., & Spencer, R. L. (1997). Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology*, *65*(5), 360-368.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C., & Tasker, J. G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*, *23*(12), 4850-4857.
- Dimitrov, E. L., Yanagawa, Y., & Usdin, T. B. (2013). Forebrain GABAergic projections to locus coeruleus in mouse. *J Comp Neurol*, *521*(10), 2373-2397.
- Diorio, D., Viau, V., & Meaney, M. J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci*, *13*(9), 3839-3847.
- Dolgov, A. M., Smagin, G. N., & Sadovnikov, V. I. (1994). [Hormonal heterochronia in the stress-regulating system in cerebral ischemia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, *94*(1), 23-26.
- Dooley, D. J., Hunziker, G., & Hausler, A. (1984). Corticosterone secretion in the rat after DSP-4 treatment. *Neurosci Lett*, *46*(3), 271-274.
- Dudley, M. W., Howard, B. D., & Cho, A. K. (1990). The interaction of the beta-haloethyl benzylamines, xylamine, and DSP-4 with catecholaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *30*, 387-403.
- Duncan, G. E., Johnson, K. B., & Breese, G. R. (1993). Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci*, *13*(9), 3932-3943.

- Duncan, G. E., Knapp, D. J., & Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res*, 713(1-2), 79-91.
- Duncan, G. E., Knapp, D. J., Johnson, K. B., & Breese, G. R. (1996). Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like immunoreactivity. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(2), 1076-1089.
- Dunn, A. J. (1988). Stress-related changes in cerebral catecholamine and indoleamine metabolism: lack of effect of adrenalectomy and corticosterone. *J Neurochem*, 51(2), 406-412.
- Dunn, A. J., & Berridge, C. W. (1987). Corticotropin-releasing factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catecholaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav*, 27(4), 685-691.

e

- Emmert, M. H., & Herman, J. P. (1999). Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res*, 845(1), 60-67.
- Engeland, W. C., & Arnhold, M. M. (2005). Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine*, 28(3), 325-332.
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*, 25(3-4), 132-149.
- Ennis, M., Aston-Jones, G., & Shiekhhattar, R. (1992). Activation of locus coeruleus neurons by nucleus paragigantocellularis or noxious sensory stimulation is mediated by intracoeular excitatory amino acid neurotransmission. *Brain Res*, 598(1-2), 185-195.
- Ericsson, A., Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci*, 14(2), 897-913.

f

- Fallon, J. H., Koziell, D. A., & Moore, R. Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol*, 180(3), 509-532.
- Figueiredo, H. F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C. M., & Herman, J. P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci*, 18(8), 2357-2364.
- Foote, S. L., Bloom, F. E., & Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, 63(3), 844-914.
- Forray, M. I., & Gysling, K. (2004). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev*, 47(1-3), 145-160.
- Foulkes, N. S., Borjigin, J., Snyder, S. H., & Sassone-Corsi, P. (1996). Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 14140-14145.
- Fritschy, J. M., & Grzanna, R. (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*, 30(1), 181-197.

- Fritschy, J. M., & Grzanna, R. (1991). Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? *Prog Brain Res*, *88*, 257-268.
- Fritschy, J. M., & Grzanna, R. (1992). Restoration of ascending noradrenergic projections by residual locus coeruleus neurons: compensatory response to neurotoxin-induced cell death in the adult rat brain. *J Comp Neurol*, *327*(3), 421-441.
- Fuertes, G., Laorden, M. L., & Milanes, M. V. (2000). Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology*, *77*(1), 60-67.
- Fukuda, A., Nakadai, T., Shimada, M., & Hisatake, K. (2009). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R enhances transcription from the naturally configured c-fos promoter in vitro. *J Biol Chem*, *284*(35), 23472-23480.
- Fukuda, A., Shimada, M., Nakadai, T., Nishimura, K., & Hisatake, K. (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R cooperates with mediator to facilitate transcription reinitiation on the c-Fos gene. *PLoS One*, *8*(8), e72496.
- Funahashi, S., & Andreau, J. M. (2013). Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *J Physiol Paris*, *107*(6), 471-482.

g

- Gallo-Payet, N., & Payet, M. D. (2003). Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech*, *67*(3), 275-287.
- Garcia, A., Marti, O., Valles, A., Dal-Zotto, S., & Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, *72*(2), 114-125.
- George, O., Le Moal, M., & Koob, G. F. (2012). Allostasis and addiction: role of the dopamine and corticotropin-releasing factor systems. *Physiol Behav*, *106*(1), 58-64.
- George, O., Sanders, C., Freiling, J., Grigoryan, E., Vu, S., Allen, C. D., et al. (2012). Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(44), 18156-18161.
- Ginsberg, A. B., Campeau, S., Day, H. E., & Spencer, R. L. (2003). Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, *15*(11), 1075-1083.
- Ginty, D. D., Bonni, A., & Greenberg, M. E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, *77*(5), 713-725.
- Girotti, M., Weinberg, M. S., & Spencer, R. L. (2007). Differential responses of hypothalamus-pituitary-adrenal axis immediate early genes to corticosterone and circadian drive. *Endocrinology*, *148*(5), 2542-2552.
- Goldstein, D. S., & Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, *10*(2), 109-120.
- Goldstein, D. S., & McEwen, B. (2002). Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*, *5*(1), 55-58.
- Gomard, T., Jariel-Encontre, I., Basbous, J., Bossis, G., Moquet-Torcy, G., & Piechaczyk, M. (2008). Fos family protein degradation by the proteasome. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 5), 858-863.
- Grassi-Zucconi, G., Menegazzi, M., De Prati, A. C., Bassetti, A., Montagnese, P., Mandile, P., et al. (1993). c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci*, *5*(8), 1071-1078.

- Gray, T. S., Piechowski, R. A., Yracheta, J. M., Rittenhouse, P. A., Bethea, C. L., & Van de Kar, L. D. (1993). Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinology*, *57*(3), 517-524.
- Greenberg, M. E., Shyu, A. B., & Belasco, J. G. (1990). Deadenylation: a mechanism controlling c-fos mRNA decay. *Enzyme*, *44*(1-4), 181-192.
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joels, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*, *350*(2), 299-309.
- Guardiola-Diaz, H. M., Kolinske, J. S., Gates, L. H., & Seasholtz, A. F. (1996). Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. *Mol Endocrinol*, *10*(3), 317-329.
- Gubits, R. M., Smith, T. M., Fairhurst, J. L., & Yu, H. (1989). Adrenergic receptors mediate changes in c-fos mRNA levels in brain. *Brain Res Mol Brain Res*, *6*(1), 39-45.

h

- Hardin, J., Hilbe, J. (2003). *Generalized Estimating Equations*. London: Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-1-58488-307-4.
- Harro, J., Häidkind, R., Harro, M., Modiri, A. R., Gillberg, P. G., Pähkla, R., Matto, V., Oreland, L. (1999a). Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioural and biochemical effects of DSP-4 treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*, *10*(1):5-16.
- Harro, J., Oreland, L., Vasar, E., & Bradwejn, J. (1995). Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *Eur Neuropsychopharmacol*, *5*(4), 447-455.
- Harro, J., Pähkla, R., Modiri, A. R., Harro, M., Kask, A., & Oreland, L. (1999b). Dose-dependent effects of noradrenergic denervation by DSP-4 treatment on forced swimming and beta-adrenoceptor binding in the rat. *J Neural Transm*, *106*(7-8), 619-629.
- Hauger, R. L., Lorang, M., Irwin, M., & Aguilera, G. (1990). CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res*, *532*(1-2), 34-40.
- Hauger, R. L., Millan, M. A., Lorang, M., Harwood, J. P., & Aguilera, G. (1988). Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology*, *123*(1), 396-405.
- Helmreich, D. L., Parfitt, D. B., Walton, J. R., & Richards, L. M. (2008). Dexamethasone and stressor-magnitude regulation of stress-induced transcription of HPA axis secretagogues in the rat. *Stress*, *11*(4), 302-311.
- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*, *28*(3), 370-490.
- Herdegen, T., & Zimmermann, M. (1995). Immediate early genes (IEGs) encoding for inducible transcription factors (ITFs) and neuropeptides in the nervous system: functional network for long-term plasticity and pain. *Prog Brain Res*, *104*, 299-321.
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, *20*(2), 78-84.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., & Watson, S. J. (1994). Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol*, *6*(4), 433-442.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Ziegler, D. R., & Tasker, J. G. (2002). Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci*, *16*(3), 381-385.

- Herman, J. P., Dolgas, C. M., & Carlson, S. L. (1998). Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience*, *86*(2), 449-459.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., et al. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, *24*(3), 151-180.
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Netto, E., & Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res*, *45*(4), 292-298.
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *29*(8), 1201-1213.
- Herman, J. P., Schafer, M. K., Thompson, R. C., & Watson, S. J. (1992). Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol*, *6*(7), 1061-1069.
- Herman, J. P., Schafer, M. K., Young, E. A., Thompson, R., Douglass, J., Akil, H., et al. (1989). Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci*, *9*(9), 3072-3082.
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, *50*(2-3), 83-107.
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T., et al. (2011). Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*, *31*(29), 10506-10515.
- Hoffman, G. E., & Lyo, D. (2002). Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol*, *14*(4), 259-268.
- Hughes, Z. A., & Stanford, S. C. (1998). A partial noradrenergic lesion induced by DSP-4 increases extracellular noradrenaline concentration in rat frontal cortex: a microdialysis study in vivo. *Psychopharmacology (Berl)*, *136*(3), 299-303.



- Imaki, T., Shibasaki, T., Chikada, N., Harada, S., Naruse, M., & Demura, H. (1996). Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocr J*, *43*(6), 629-638.
- Imaki, T., Shibasaki, T., & Demura, H. (1995). Regulation of gene expression in the central nervous system by stress: molecular pathways of stress responses. *Endocr J*, *42*(2), 121-130.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M., & Demura, H. (1992). Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology*, *131*(1), 240-246.
- Imaki, T., Xiao-Quan, W., Shibasaki, T., Yamada, K., Harada, S., Chikada, N., et al. (1995). Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *J Clin Invest*, *96*(1), 231-238.
- Imperato, A., Puglisi-Allegra, S., Casolini, P., & Angelucci, L. (1991) Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res*. *538*(1), 111-117.
- Itoi, K., & Sugimoto, N. (2010). The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *J Neuroendocrinol*, *22*(5), 355-361.

j

- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, *12*(2), 118-134.
- Jaim-Etcheverry, G., & Zieher, L. M. (1980). DSP-4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Res*, *188*(2), 513-523.
- Janknecht, R., Cahill, M. A., & Nordheim, A. (1995). Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*, *16*(3), 443-450.
- Jankord, R., & Herman, J. P. (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*, *1148*, 64-73.
- Jariel-Encontre, I., Salvat, C., Steff, A. M., Pariat, M., Acquaviva, C., Furstoss, O., et al. (1997). Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Mol Biol Rep*, *24*(1-2), 51-56.
- Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev*, *16*(2), 115-130.
- Jones, B. E., Halaris, A. E., McIlhany, M., & Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res*, *127*(1), 1-21.
- Jones, B. E., & Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res*, *127*(1), 25-53.
- Ju, G., & Han, Z. S. (1989). Coexistence of corticotropin releasing factor and neurotensin within oval nucleus neurons in the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. *Neurosci Lett*, *99*(3), 246-250.

k

- Kang, G., Ye, K., Liu, N., Allison, D. B., & Gao, G. (2009). Weighted multiple hypothesis testing procedures. *Stat Appl Genet Mol Biol*, *8*, Article23.
- Kant, G. J., Bunnell, B. N., Mougey, E. H., Pennington, L. L., & Meyerhoff, J. L. (1983). Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *18*(6), 967-971.
- Kaminski K.L., Watts A.G. (2012) Intact catecholamine inputs to the forebrain are required for appropriate regulation of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin gene expression by corticosterone in the rat paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol*, *24*(12), 1517-26.
- Kawahara, H., Kawahara, Y., & Westerink, B. H. (2000). The role of afferents to the locus coeruleus in the handling stress-induced increase in the release of noradrenaline in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Eur J Pharmacol*, *387*(3), 279-286.
- Kehne, J. H. (2007). The CRF1 receptor, a novel target for the treatment of depression, anxiety, and stress-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *6*(3), 163-182.
- Kehne, J. H., & Cain, C. K. (2010). Therapeutic utility of non-peptidic CRF1 receptor antagonists in anxiety, depression, and stress-related disorders: evidence from animal models. *Pharmacol Ther*, *128*(3), 460-487.

- Keller-Wood, M., Kimura, B., Shinsako, J., & Phillips, M. I. (1986). Interaction between CRF and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids. *Am J Physiol*, 250(3 Pt 2), R396-402.
- Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev*, 5(1), 1-24.
- Kim, K., Nose, K., & Shibamura, M. (2000). Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J Biol Chem*, 275(27), 20685-20692.
- King, B. R., & Smith, R. (2004). Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Front Biosci*, 9, 32-39.
- Kohler, C., Chan-Palay, V., & Steinbusch, H. (1982). The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol*, 209(1), 91-111.
- Kollack-Walker, S., Watson, S. J., & Akil, H. (1997). Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *J Neurosci*, 17(22), 8842-8855.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flugge, G., Korte, S. M., et al. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(5), 1291-1301.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., et al. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 23(7), 925-935.
- Korczyński, R., & Fonberg, E. (1979). Spontaneous locomotor activity and food and water intake in rats with medial amygdala lesions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 39(4), 227-240.
- Korf, J., Aghajanian, G. K., & Roth, R. H. (1973). Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology*, 12(10), 933-938.
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., & McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(1), 3-38.
- Kovacs, G. L., Sarnyai, Z., & Szabo, G. (1998). Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 945-962.
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*, 33(4), 287-297.
- Kovacs, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol*, 20(6), 665-672.
- Kovacs, K. J., Csejtei, M., & Laszlovszky, I. (2001). Double activity imaging reveals distinct cellular targets of haloperidol, clozapine and dopamine D(3) receptor selective RGH-1756. *Neuropharmacology*, 40(3), 383-393.
- Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1993). Mediation of osmoregulatory influences on neuroendocrine corticotropin-releasing factor expression by the ventral lamina terminalis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7681-7685.
- Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1996). Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci*, 7(2), 125-133.
- Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E. (1996). Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci*, 16(1), 262-273.
- Kovacs, K., Miklós, I. and Bali, B. (2005). Psychological and physiological stressors. In: Steckler, T. et al. (Eds.), *Handbook of stress and the brain*. Elsevier, pp. 775-792.
- Kovary, K., & Bravo, R. (1991). Expression of different Jun and Fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol Cell Biol*, 11(5), 2451-2459.
- Kovary, K., & Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 11(9), 4466-4472.
- Kudo, T., Kushikata, T., Kudo, M., Kudo, T., & Hirota, K. (2010). A central neuropathic pain model by DSP-4 induced lesion of noradrenergic neurons: preliminary report. *Neurosci Lett*, 481(2), 102-104.

Kvetnansky, R., & Mikulaj, L. (1970). Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, *87*(4), 738-743.

-
- Lacosta, S., Merali, Z., & Anisman, H. (2000). Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *Neuroimmunomodulation*, *8*(2), 83-90.
- Lanfume, L., & Hamon, M. (2000). Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol*, *27*(5), 429-435.
- Larsen, P. J., & Mikkelsen, J. D. (1995). Functional identification of central afferent projections conveying information of acute "stress" to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci*, *15*(4), 2609-2627.
- Lavicky, J., & Dunn, A. J. (1993). Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J Neurochem*, *60*(2), 602-612.
- Lazarus, R. S. (1993). From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol*, *44*, 1-21.
- LeDoux, J. E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., & Romanski, L. M. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci*, *10*(4), 1062-1069.
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci*, *8*(7), 2517-2529.
- Lee, E. H., Chang, S. Y., & Chen, A. Y. (1994). CRF facilitates NE release from the hippocampus: a microdialysis study. *Neurosci Res*, *19*(3), 327-330.
- Li, H. Y., Ericsson, A., & Sawchenko, P. E. (1996). Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(6), 2359-2364.
- Li, H. Y., & Sawchenko, P. E. (1998). Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *J Comp Neurol*, *393*(2), 244-266.
- Lindvall, O., & Stenevi, U. (1978). Dopamine and noradrenaline neurons projecting to the septal area in the rat. *Cell Tissue Res*, *190*(3), 383-407.
- Liposits, Z., Paull, W. K., Setalo, G., & Vigh, S. (1985). Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry*, *83*(1), 5-16.
- Liu, Y., & Aguilera, G. (2009). Cyclic AMP inducible early repressor mediates the termination of corticotropin releasing hormone transcription in hypothalamic neurons. *Cell Mol Neurobiol*, *29*(8), 1275-1281.
- Lowry, C. A. (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol*, *14*(11), 911-923.
- Lowry, C. A., & Moore, F. L. (2006). Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. *Gen Comp Endocrinol*, *146*(1), 19-27.
- Luckman, S. M., Dyball, R. E., & Leng, G. (1994). Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J Neurosci*, *14*(8), 4825-4830.

- Ma, X. M., & Aguilera, G. (1999). Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology*, *140*(12), 5642-5650.
- Maeda, T. (2000). The locus coeruleus: history. *J Chem Neuroanat*, *18*(1-2), 57-64.
- Makara, G. B., & Haller, J. (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol*, *65*(4), 367-390.
- Makara, G. B., Mergl, Z., & Zelena, D. (2004). The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: an assessment of the evidence. *Ann N Y Acad Sci*, *1018*, 151-161.
- Mao, D., Warner, E. A., Gurwitch, S. A., & Dowd, D. R. (1998). Differential regulation and transcriptional control of immediate early gene expression in forskolin-treated WEHI7.2 thymoma cells. *Mol Endocrinol*, *12*(4), 492-503.
- Marquez, C., Belda, X., & Armario, A. (2002). Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res*, *928*(1-2), 181-185.
- Marquez, C., Nadal, R., & Armario, A. (2005). Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology*, *30*(2), 179-187.
- Marti, O., Andres, R., & Armario, A. (1999). Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *Am J Physiol*, *277*(3 Pt 2), R869-877.
- Marti, O., & Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci*, *16*(3-4), 241-260.
- Marti, O., Garcia, A., Valles, A., Harbuz, M. S., & Armario, A. (2001). Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *Eur J Neurosci*, *13*(1), 129-136.
- McDonald, A. J. (2003). Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci*, *985*, 1-21.
- McDougall, S. J., Widdop, R. E., & Lawrence, A. J. (2004). Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci*, *20*(9), 2430-2440.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, *840*, 33-44.
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*, *888*(1-2), 172-189.
- McEwen, B. S. (2003). Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry*, *54*(3), 200-207.
- McEwen, B. S. (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*, *1032*, 1-7.
- McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*, *153*(18), 2093-2101.
- Melia, K. R., & Duman, R. S. (1991). Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(19), 8382-8386.
- Menetrey, D., Gannon, A., Levine, J. D., & Basbaum, A. I. (1989). Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J Comp Neurol*, *285*(2), 177-195.

- Michelson, D., Licinio, J. and Gold, P. (1995). Mediation of the stress response by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.
- Misund, K., Steigedal, T. S., Laegreid, A., & Thommesen, L. (2007). Inducible cAMP early repressor splice variants ICER I and Ilgamma both repress transcription of c-fos and chromogranin A. *J Cell Biochem*, 107(6), 1532-1544.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., & Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119(3), 887-897.
- Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D., & Gutkind, J. S. (2005). Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem*, 280(42), 35081-35084.
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*, 150(1), 112-116.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S., et al. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(8), 1214-1224.
- Morin, S. M., Ling, N., Liu, X. J., Kahl, S. D., & Gehlert, D. R. (1999). Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience*, 92(1), 281-291.
- Muñoz-Abellan, C., Andero, R., Nadal, R., & Armario, A. (2008). Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology*, 33(8), 1139-1150.



-
- O'Donnell, A., Yang, S. H., & Sharrocks, A. D. (2008). MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch. *Mol Cell*, 29(6), 780-785.
- Ons, S., Marti, O., & Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *J Neurochem*, 89(5), 1111-1118.
- Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev*, 43(4), 425-473.



-
- Pacak, K., & Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22(4), 502-548.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2), R1247-1255.
- Pace, T. W., Gaylord, R., Topczewski, F., Girotti, M., Rubin, B., & Spencer, R. L. (2005). Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experience is not directly related to the stressfulness of that experience. *Eur J Neurosci*, 22(7), 1679-1690.

- Pace, T. W., Gaylord, R. I., Jarvis, E., Girotti, M., & Spencer, R. L. (2009). Differential glucocorticoid effects on stress-induced gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and ACTH secretion in the rat. *Stress, 12*(5), 400-411.
- Page, M. E., & Abercrombie, E. D. (1999). Discrete local application of corticotropin-releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus. *Synapse, 33*(4), 304-313.
- Palamarchouk, V. S., Swiergiel, A. H., & Dunn, A. J. (2002). Hippocampal noradrenergic responses to CRF injected into the locus coeruleus of unanesthetized rats. *Brain Res, 950*(1-2), 31-38.
- Palamarchouk, V. S., Zhang, J., Zhou, G., Swiergiel, A. H., & Dunn, A. J. (2000). Hippocampal norepinephrine-like voltammetric responses following infusion of corticotropin-releasing factor into the locus coeruleus. *Brain Res Bull, 53*(4), 319-326.
- Palkovits, M., Baffi, J. S., & Dvori, S. (1995). Neuronal organization of stress response. Pain-induced c-fos expression in brain stem catecholaminergic cell groups. *Ann N Y Acad Sci, 771*, 313-326.
- Papavassiliou, A. G., Treier, M., Chavrier, C., & Bohmann, D. (1992). Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun. *Science, 258*(5090), 1941-1944.
- Parkes, D., Rivest, S., Lee, S., Rivier, C., & Vale, W. (1993). Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol Endocrinol, 7*(10), 1357-1367.
- Pavcovich, L. A., & Valentino, R. J. (1997). Regulation of a putative neurotransmitter effect of corticotropin-releasing factor: effects of adrenalectomy. *J Neurosci, 17*(1), 401-408.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, INC., London.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, INC., London.
- Perrotti, L. I., Hadeishi, Y., Ulery, P. G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R. S., et al. (2004). Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci, 24*(47), 10594-10602.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci, 106*(2), 274-285.
- Pineau, I., Barrette, B., Vallieres, N., & Lacroix, S. (2006). A novel method for multiple labeling combining in situ hybridization with immunofluorescence. *J Histochem Cytochem, 54*(11), 1303-1313.
- Pratt, W. B., Morishima, Y., Murphy, M., & Harrell, M. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*(172), 111-138.
- Price, M. L., & Lucki, I. (2001). Regulation of serotonin release in the lateral septum and striatum by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci, 21*(8), 2833-2841.

R

-
- Radley, J. J., Arias, C. M., & Sawchenko, P. E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci, 26*(50), 12967-12976.
- Radley, J. J., Gosselink, K. L., & Sawchenko, P. E. (2009). A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci, 29*(22), 7330-7340.
- Radley, J. J., Williams, B., & Sawchenko, P. E. (2008). Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *J Neurosci, 28*(22), 5806-5816.

- Radwanska, K., Nikolaev, E., & Kaczmarek, L. (2010). Central noradrenergic lesion induced by DSP-4 impairs the acquisition of avoidance reactions and prevents molecular changes in the amygdala. *Neurobiol Learn Mem*, *94*(3), 303-311.
- Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M., & de Kloet, E. R. (1989). On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, *50*(2), 117-123.
- Reul, J. M., & de Kloet, E. R. (1986). Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *J Steroid Biochem*, *24*(1), 269-272.
- Reyes, B. A., Fox, K., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2006). Agonist-induced internalization of corticotropin-releasing factor receptors in noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci*, *23*(11), 2991-2998.
- Reyes, B. A., Valentino, R. J., Xu, G., & Van Bockstaele, E. J. (2005). Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in rat brain. *Eur J Neurosci*, *22*(1), 93-106.
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res Brain Res Rev*, *24*(2-3), 91-113.
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev*, *24*(2-3), 115-195.
- Ritter, S., Watts, A. G., Dinh, T.T., Sanchez-Watts, G., Pedrow, C. (2003). Immunotoxin lesion of hypothalamically projecting norepinephrine and epinephrine neurons differentially affects circadian and stressor-stimulated corticosterone secretion. *Endocrinology*, *144*(4), 1357-67.
- Rivest, S., & Laflamme, N. (1995). Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats. *J Neuroendocrinol*, *17*(7), 501-525.
- Rivier, C., & Vale, W. (1987). Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology*, *121*(4), 1320-1328.
- Roland, B. L., & Sawchenko, P. E. (1993). Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*, *333*(1), 123-143.
- Romero, L. M., & Sapolsky, R. M. (1996). Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol*, *8*(4), 243-258.
- Roosendaal, B. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, *25*(3), 213-238.

S

- Samuels, E. R., & Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol*, *6*(3), 235-253.
- Sandi, C. (2003). [Glucocorticoid involvement in memory consolidation]. *Rev Neurol*, *37*(9), 843-848.
- Saper, C. (1995). Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System* (2ed). Academic Press, Sydney, pp. 107-135.
- Sapolsky, R. M. (2000). Stress hormones: good and bad. *Neurobiol Dis*, *15*(5), 540-542.
- Sara, S. J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, *10*(3), 211-223.
- Sara, S. J., & Bouret, S. (2012). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, *76*(1), 130-141.

- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., & Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*, *334*(6180), 314-319.
- Sawchenko, P. E., Brown, E. R., Chan, R. K., Ericsson, A., Li, H. Y., Roland, B. L., et al. (1996). The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res*, *107*, 201-222.
- Sawchenko, P. E., Li, H. Y., & Ericsson, A. (2000). Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res*, *122*, 61-78.
- Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Steinbusch, H. W., & Verhofstad, A. A. (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res*, *277*(2), 355-360.
- Schonthal, A., Buscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Hattori, K., et al. (1989). The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene*, *4*(5), 629-636.
- Schuerger, R. J., & Balaban, C. D. (1995). N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) has differential efficacy for causing central noradrenergic lesions in two different rat strains: comparison between Long-Evans and Sprague-Dawley rats. *J Neurosci Methods*, *58*(1-2), 95-101.
- Scopinho, A. A., Scopinho, M., Lisboa, S. F., Correa, F. M., Guimaraes, F. S., & Joca, S. R. (2010). Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res*, *214*(2), 437-442.
- Selye, H. (1998). A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *10*(2), 230-231.
- Senba, E., & Ueyama, T. (1997). Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res*, *29*(3), 183-207.
- Senba, E., Umemoto, S., Kawai, Y., & Noguchi, K. (1994). Differential expression of fos family and jun family mRNAs in the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis after immobilization stress. *Brain Res Mol Brain Res*, *24*(1-4), 283-294.
- Sewer, M. B., & Waterman, M. R. (2003). ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech*, *63*(3), 300-307.
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, *4*(4), 477-485.
- Shepard, J. D., Liu, Y., Sassone-Corsi, P., & Aguilera, G. (2005). Role of glucocorticoids and cAMP-mediated repression in limiting corticotropin-releasing hormone transcription during stress. *J Neurosci*, *25*(16), 4073-4081.
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E., & Belasco, J. G. (1989). The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*, *3*(1), 60-72.
- Singewald, G. M., Rjabokon, A., Singewald, N., & Ebner, K. (2011). The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology*, *36*(4), 793-804.
- Smagin, G. N., & Dunn, A. J. (2000). The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *Eur J Pharmacol*, *405*(1-3), 199-206.
- Smagin, G. N., Harris, R. B., & Ryan, D. H. (1996). Corticotropin-releasing factor receptor antagonist infused into the locus coeruleus attenuates immobilization stress-induced defensive withdrawal in rats. *Neurosci Lett*, *220*(3), 167-170.
- Smagin GN, Swiergiel AH, Dunn AJ. (1994) Sodium nitroprusside infusions activate cortical and hypothalamic noradrenergic systems in rats. *Neurosci. Res. Comm.* 14:85-91.
- Spencer, C. M., & Houpt, T. A. (2001). Dynamics of c-fos and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection. *Brain Res Mol Brain Res*, *93*(2), 113-126.
- Spencer, S. J., & Day, T. A. (2004). Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. *J Neurosci Res*, *78*(2), 279-288.

- Stamp, J. A., & Herbert, J. (1999). Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. *Neuroscience*, *94*(4), 1313-1322.
- Steigedal, T. S., Bruland, T., Misund, K., Thommesen, L., & Laegreid, A. (2007). Inducible cAMP early repressor suppresses gastrin-mediated activation of cyclin D1 and c-fos gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *292*(4), G1062-1069.
- Stone, E. A., Lehmann, M. L., Lin, Y., & Quartermain, D. (2007). Reduced evoked fos expression in activity-related brain regions in animal models of behavioral depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(6), 1196-1207.
- Stone, E. A., Quartermain, D., Lin, Y., & Lehmann, M. L. (2007). Central alpha1-adrenergic system in behavioral activity and depression. *Biochem Pharmacol*, *73*(8), 1063-1075.
- Stone, E. A., & Zhang, Y. (1995). Adrenoceptor antagonists block c-fos response to stress in the mouse brain. *Brain Res*, *694*(1-2), 279-286.
- Stone, E. A., Zhang, Y., & Carr, K. D. (1995). Massive activation of c-fos in forebrain after mechanical stimulation of the locus coeruleus. *Brain Res Bull*, *36*(1), 77-80.
- Stone, E. A., Zhang, Y., John, S., Filer, D., & Bing, G. (1993). Effect of locus coeruleus lesion on c-fos expression in the cerebral cortex caused by yohimbine injection or stress. *Brain Res*, *602*(2), 181-185.
- Swanson, G. J., Nomura, S., & Hogan, B. L. (1989). Distribution of expression of 2AR (osteopontin) in the embryonic mouse inner ear revealed by in situ hybridisation. *Hear Res*, *41*(2-3), 169-177.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., & Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, *36*(3), 165-186.
- Swiergiel, A. H., Li, Y., Wei, Z. Y., & Dunn, A. J. (2008). Effects of chlordiazepoxide on footshock- and corticotropin-releasing factor-induced increases in cortical and hypothalamic norepinephrine secretion in rats. *Neurochem Int*, *52*(6), 1220-1225.
- Szot, P., Miguez, C., White, S. S., Franklin, A., Sikkema, C., Wilkinson, C. W., et al. (2010). A comprehensive analysis of the effect of DSP4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience*, *166*(1), 279-291.

t

- Takahashi, L. K., Nakashima, B. R., Hong, H., & Watanabe, K. (2005). The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(8), 1157-1167.
- Tamai, K. T., Monaco, L., Nantel, F., Zazopoulos, E., & Sassone-Corsi, P. (1997). Coupling signalling pathways to transcriptional control: nuclear factors responsive to cAMP. *Recent Prog Horm Res*, *52*, 121-139; discussion 139-140.
- Tanimura, S. M., Sanchez-Watts, G., & Watts, A. G. (1998). Peptide gene activation, secretion, and steroid feedback during stimulation of rat neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, *139*(9), 3822-3829.
- Tanimura, S. M., & Watts, A. G. (2000). Adrenalectomy dramatically modifies the dynamics of neuropeptide and c-fos gene responses to stress in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol*, *12*(8), 715-722.
- Thierry, A. M., Javoy, F., Glowinski, J., & Kety, S. S. (1968). Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat. I. Modifications of norepinephrine turnover. *J Pharmacol Exp Ther*, *163*(1), 163-171.

Trneckova, L., Rotllant, D., Klenerova, V., Hynie, S., & Armario, A. (2007). Dynamics of immediate early gene and neuropeptide gene response to prolonged immobilization stress: evidence against a critical role of the termination of exposure to the stressor. *J Neurochem*, *100*(4), 905-914.

u-v

- Umemoto, S., Kawai, Y., Ueyama, T., & Senba, E. (1997). Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of NGFI-A. *Neuroscience*, *80*(3), 763-773.
- Usher, M., Cohen, J. D., Servan-Schreiber, D., Rajkowski, J., & Aston-Jones, G. (1999). The role of locus coeruleus in the regulation of cognitive performance. *Science*, *283*(5401), 549-554.
- Vale, W., Vaughan, J., Smith, M., Yamamoto, G., Rivier, J., & Rivier, C. (1983). Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology*, *113*(3), 1121-1131.
- Valentino, R. J., Curtis, A. L., Page, M. E., Pavcovich, L. A., & Florin-Lechner, S. M. (1998). Activation of the locus coeruleus brain noradrenergic system during stress: circuitry, consequences, and regulation. *Adv Pharmacol*, *42*, 781-784.
- Valentino, R. J., Page, M., Van Bockstaele, E., & Aston-Jones, G. (1992). Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience*, *48*(3), 689-705.
- Valentino, R. J., Page, M. E., & Curtis, A. L. (1991). Activation of noradrenergic locus coeruleus neurons by hemodynamic stress is due to local release of corticotropin-releasing factor. *Brain Res*, *555*(1), 25-34.
- Valentino, R. J., Rudoy, C., Saunders, A., Liu, X. B., & Van Bockstaele, E. J. (2001). Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. *Neuroscience*, *106*(2), 375-384.
- Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol*, *583*(2-3), 194-203.
- Valentino, R. J., & Wehby, R. G. (1988). Corticotropin-releasing factor: evidence for a neurotransmitter role in the locus coeruleus during hemodynamic stress. *Neuroendocrinology*, *48*(6), 674-677.
- Valles, A., Marti, O., & Armario, A. (2006). Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol*, *66*(6), 591-602.
- Van Bockstaele, E. J., Colago, E. E., & Valentino, R. J. (1996). Corticotropin-releasing factor-containing axon terminals synapse onto catecholamine dendrites and may presynaptically modulate other afferents in the rostral pole of the nucleus locus coeruleus in the rat brain. *J Comp Neurol*, *364*(3), 523-534.
- Vanderwolf, C. H. (1992). The electrocorticogram in relation to physiology and behavior: a new analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, *82*(3), 165-175.
- Vanderwolf, C.H. & Robinson, T.E. (1981). Reticulo-cortical activity and behavior: a critique of the arousal theory and a new synthesis. *The Behavioral and Brain Sciences*, *4*, 459-514.
- Verleye, M., & Bernet, F. (1983). Behavioral effects of lesions of the central noradrenergic bundles in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, *19*(3), 407-414.
- Vigas, M., (1984). Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. Gordon and Breach Sci. Publ., New York.

- Vinkers, C. H., Bijlsma, E. Y., Houtepen, L. C., Westphal, K. G., Veening, J. G., Groenink, L., et al. (2010). Medial amygdala lesions differentially influence stress responsivity and sensorimotor gating in rats. *Physiol Behav*, *99*(3), 395-401.
- Vinson, G. P., Hinson, J. P., & Toth, I. E. (1994). The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol*, *6*(3), 235-246.

W

- Wagner, C. K., Eaton, M. J., Moore, K. E., & Lookingland, K. J. (1995). Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *Brain Res*, *677*(2), 229-237.
- Wan, W., Janz, L., Vriend, C. Y., Sorensen, C. M., Greenberg, A. H., & Nance, D. M. (1993). Differential induction of c-Fos immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheral administration of endotoxin. *Brain Res Bull*, *32*(6), 581-587.
- Warden, M. R., Selimbeyoglu, A., Mirzabekov, J. J., Lo, M., Thompson, K. R., Kim, S. Y., et al. (2012). A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*, *492*(7429), 428-432.
- Watts, A. G. (2005). Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol*, *26*(3-4), 109-130.
- Whitnall, M. H., Kiss, A., & Aguilera, G. (1993). Contrasting effects of central alpha-1-adrenoreceptor activation on stress-responsive and stress-nonresponsive subpopulations of corticotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the rat. *Neuroendocrinology*, *58*(1), 42-48.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (1999). Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J Neurosci*, *19*(24), RC48.
- Williams, A. M., & Morilak, D. A. (1997). alpha1B adrenoceptors in rat paraventricular nucleus overlap with, but do not mediate, the induction of c-Fos expression by osmotic or restraint stress. *Neuroscience*, *78*(3), 901-913.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D., Jr., & Schwartz, M. W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, *280*(5368), 1378-1383.

X-Y-Z

- Xu, G. P., Van Bockstaele, E., Reyes, B., Bethea, T., & Valentino, R. J. (2004). Chronic morphine sensitizes the brain norepinephrine system to corticotropin-releasing factor and stress. *J Neurosci*, *24*(38), 8193-8197.
- Xu, Y., Day, T. A., & Buller, K. M. (1999). The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1beta administration. *Neuroscience*, *94*(1), 175-183.
- Yamada, Y., Hada, Y., Imamura, K., Mataga, N., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (1999). Differential expression of immediate-early genes, c-fos and zif268, in the visual cortex of young rats: effects of a noradrenergic neurotoxin on their expression. *Neuroscience*, *92*(2), 473-484.
- Yao, M., & Denver, R. J. (2007). Regulation of vertebrate corticotropin-releasing factor genes. *Gen Comp Endocrinol*, *153*(1-3), 200-216.

- Yokoyama, K., Hiyama, A., Arai, F., Nukaga, T., Sakai, D., & Mochida, J. (2013). C-Fos regulation by the MAPK and PKC pathways in intervertebral disc cells. *PLoS One*, *8*(9), e73210.
- Zangenehpour, S., & Chaudhuri, A. (2001). Neural activity profiles of the neocortex and superior colliculus after bimodal sensory stimulation. *Cereb Cortex*, *11*(10), 924-935.
- Zangenehpour, S., & Chaudhuri, A. (2002). Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res Mol Brain Res*, *109*(1-2), 221-225.
- Zhang, J. J., Swiergiel, A. H., Palamarchouk, V. S., & Dunn, A. J. (1998). Intracerebroventricular infusion of CRF increases extracellular concentrations of norepinephrine in the hippocampus and cortex as determined by in vivo voltammetry. *Brain Res Bull*, *47*(3), 277-284.
- Ziegler, D. R., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol*, *448*(3), 217-229.
- Zorrilla EP, Koob GF. (2005) The roles of urocortins 1, 2 and 3 in the brain. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM, editors. *Handbook of Stress and the Brain*. Vol. 15. Elsevier Science; New York: pp. 179-203. series title: *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*.

