

TESIS DOCTORAL DE  
**CRISTINA MÁRQUEZ VEGA**

**Diferencias individuales en  
la respuesta endocrina al  
estrés: Influencia de los  
rasgos de conducta.**

Dept. de Biología Celular, Fisiología y  
Inmunología.  
Unidad de Fisiología Animal.  
Universidad Autónoma de Barcelona.  
2006

Directores:

Antonio Armario García

Roser Nadal i Alemany

A mi familia  
y a mi familia extendida.

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

- Mecanismos moleculares y áreas del sistema nervioso central implicadas en los efectos a largo plazo de una sola exposición al estrés sobre el eje HPA. DGICYT: SAF2002-00623
  
- Personalidad, estrés y adicción: un modelo experimental en ratas.  
Plan Nacional sobre drogas. Ministerio del Interior.
  
- Red de trastornos adictivos: investigación básica, clínica y epidemiológica.  
Instituto de Salud Carlos III (Madrid) (G03/005)

Cristina Márquez disfrutó de la beca de "Formación de Personal Investigador" de la Universitat Autònoma de Barcelona y de una beca asociada al proyecto "Personalidad, estrés y adicción: un modelo experimental en ratas" del Ministerio del Interior.

# Índice

<b>Lista de abreviaturas</b>	3
<b>Introducción</b>	5
<b>1: Estrés y eje Hipotalámico-pituitario-adrenal</b>	7
1.1.- Concepto de estrés	7
1.2.- Eje Hipotalámico-pituitario-adrenal	12
1.2.1.- Factores liberadores de ACTH: CRF y AVP	15
1.2.2.- Hormonas periféricas: ACTH y glucocorticoides	17
1.2.3.- Receptores de glucocorticoides y mecanismos de retroinhibición	20
1.2.4.- Eje HPA e intensidad de los estímulos estresantes	22
1.2.5.- Dinámica del eje HPA en respuesta al estrés	24
1.2.6.- Eje HPA y adaptación al estrés	26
<b>2: Diferencias individuales y estrés</b>	31
2.1.- Diferencias individuales y estructura de la personalidad	31
2.1.1.- Introducción	31
2.1.2.- Modelos de personalidad en humanos	33
2.2.- Concepto de emoción y su relación con la respuesta al estrés	37
2.3.- Variables de personalidad en humanos y eje HPA	39
2.4.- Estudios de las bases biológicas de las diferencias individuales en animales	40
2.4.1.- Problemas metodológicos	40

2.4.2.- El origen de las diferencias individuales en relación a la emotividad	43
2.4.3.- Valoración de los rasgos conductuales de interés	44
2.4.4.- Relación entre ansiedad y eje HPA	46
2.4.5.- Relación entre actividad/exploración y eje HPA	49
2.5.- Separación de los rasgos de ansiedad y actividad /exploración	52
<b>Objetivos</b>	55
<b>Resultados</b>	59
<b>Capítulo 1:</b> Reactividad endocrina del eje HPA y otros marcadores de estrés en respuesta a situaciones estresantes de intensidad elevada	61
<b>Capítulo 2:</b> Estudio de la respuesta del eje HPA y la glucosa a la inmovilización crónica: diferencias individuales	69
<b>Capítulo 3:</b> Estudio de la consistencia de la respuesta del eje HPA tras la exposición a estímulos estresantes de intensidad moderada	83
<b>Capítulo 4:</b> Estudio de la consistencia de la respuesta del eje HPA y la prolactina tras la exposición a estímulos estresantes de diferente intensidad	95
<b>Capítulo 5:</b> Contribución de los rasgos conductuales de ansiedad y búsqueda de novedad a la reactividad al estrés del eje HPA y la prolactina	105
<b>Discusión</b>	117
¿Qué información nos aporta el eje HPA acerca del estrés?	120
Diferencias individuales y adaptación al estrés crónico	123
Diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés: consistencia	125
Diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés: relación con rasgos conductuales	127
<b>Conclusiones</b>	135
<b>Referencias</b>	139
<b>Agradecimientos</b>	155

3V: tercer ventrículo

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADX: adrenalectomía

ADX+B: adrenalectomía y suplementación con corticosterona

APO-SUS: ratas susceptibles a la apomorfina

APO-UNSUS: ratas no susceptibles a la apomorfina

AVP: arginina-vasopresina

BAS: Sistema de Activación Conductual (*Behavioral Activation System*)

BIS: Sistema de Inhibición Conductual (*Behavioral Inhibition System*)

CRF: factor liberador de corticotropina

CRFBP: proteína ligadora de CRF

CBG: transcortina (*corticosteroid-binding globulin*)

CRH: hormona liberadora de corticotropina

DA: dopamina

dp: región dorsal parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo

GR: receptor de glucocorticoides

HAB: ratas de conducta de alta ansiedad

hnRNA: RNA heteronuclear

HPA: eje hipotalámico-pituitario-adrenal

HR: animales reactivos a los ambientes nuevos

IEG: genes de activación temprana

IMO: inmovilización en plancha

Kd: constante de disociación

LAB: ratas de conducta de baja ansiedad

LH : hormona luteinizante

## LISTA DE ABREVIATURAS

LR: animales poco reactivos a los ambientes nuevos

ME: eminencia media

mpdd: subdivisión medial parvocelular dorsal del núcleo paraventricular del hipotálamo

mpdv: subdivisión medial parvocelular ventral del núcleo paraventricular del hipotálamo

mPVN: zona magnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo

MNR: ratas Maudsley no reactivas

MR: ratas Maudsley reactivas

MR: receptor de mineralocorticoides

OXT: oxitocina

PKA: proteína-quinasa A

PEN: modelo psicoticismo-extraversión-neuroticismo de Eysenck

pPVN: zona parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo

POMC: proopiomelanocortina

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo

RHA: ratas Romanas de alta evitación

RLA: ratas Romanas de baja evitación

SHA: ratas Siracusa de alta evitación

SLA: ratas Siracusa de baja evitación

SNC: sistema nervioso central

sm PVN: región submagnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo

SMA: sistema simpático-médulo-adrenal

TSH : hormona estimulante de tiroides

TRH: tirotropina

UCN: urocortina

VIP: péptido intestinal vasoactivo

## **INTRODUCCIÓN**





# **1: ESTRÉS Y EJE HIPOTALÁMICO-PITUITARIO-ADRENAL**

## **1.1- Concepto de estrés**

El término estrés se ha integrado tanto en nuestro vocabulario diario que es difícil creer que el uso que le damos actualmente tenga tan solo unos 60 años. Hoy en día está bien establecido que la exposición a situaciones estresantes puede causar muchas alteraciones tanto fisiológicas como psicológicas. El estrés se ha propuesto como una de las nuevas enfermedades de nuestro tiempo, supuestamente debido al ritmo y estilo de vida de los países denominados del mundo desarrollado.

El creciente interés de diferentes disciplinas científicas en la investigación del estrés es en gran medida debido a la idea de que la exposición a situaciones estresantes puede influir en la aparición y desarrollo de diversas patologías. Este hecho ha provocado un crecimiento exponencial de la información disponible acerca de las interacciones entre las áreas del sistema nervioso central (SNC) que controlan la respuesta al estrés y aquellas involucradas en la regulación de las funciones cognitivas, las emociones y aspectos fisiológicos como el crecimiento, la función reproductiva o el sistema inmunológico. Todo este nuevo conocimiento ha permitido establecer una asociación entre disfunciones en la respuesta de estrés y la vulnerabilidad al desencadenamiento o desarrollo de determinadas patologías (Chrousos y Gold, 1992).

Históricamente, una de las mayores contribuciones en el estudio del estrés ha sido la de Walter Cannon que a finales del siglo XIX rescató el concepto propuesto por Claude Bernard de "*Milieu Interieur*", o el postulado de que el organismo muestra un equilibrio fisiológico interno. Cannon propuso la teoría que el sistema simpático-médulo-adrenal (SMA) reacciona ante varias situaciones de emergencia (por ejemplo, dolor, hemorragia, exposición al frío) mediante la

liberación de adrenalina al torrente circulatorio, y que esta activación del sistema SMA juega un papel importante en el mantenimiento del "*Milieu Interieur*". Cannon acuñó el término homeostasis (etimológicamente deriva de la palabra griega "homeo" que significa "igual", y "stasis", que significa "posición"), para describir el conjunto de mecanismos que permiten a los organismos sobrevivir gracias al mantenimiento de un complejo, dinámico y armonioso equilibrio ante los cambios internos y el ambiente. Éste y otros autores tomaron prestado del campo de la física el término estrés (ver Kopin, 1995). Aunque Cannon nunca definió el término estrés directamente, lo utilizaba en sus escritos para referirse a agentes adversos del ambiente que alejan a los organismos de su equilibrio homeostático normal y generan por tanto respuestas compensatorias. De hecho, el concepto de estrés no se puede entender sin el presupuesto de un estado homeostático y de la existencia de mecanismos fisiológicos que mantengan el equilibrio interno. Cannon también propuso las respuestas de lucha o huida (*fight or flight*) como reacciones naturales de los animales ante situaciones amenazantes.

Sin embargo, fue Hans Selye, a partir de 1936, quien popularizó el concepto de estrés. Observó que sus pacientes con enfermedades graves desarrollaban a menudo una serie de síntomas comunes como alteraciones gastrointestinales y pérdida de peso. Demostró mediante experimentación con animales que la exposición a diferentes situaciones adversas como la exposición al frío, intervenciones quirúrgicas, ejercicio muscular o infecciones causaba hipertrofia adrenal, reducción del tamaño del timo y de los nódulos linfáticos y el desarrollo de síntomas gastrointestinales. A raíz de estos resultados definió este estado como "el síndrome de estrés" o "síndrome de adaptación general", que sería consecuencia de una respuesta estereotipada del organismo ante todos los estímulos estresantes.

Según Selye, la respuesta del organismo es siempre la misma e independiente del tipo de estímulo estresante, afecta a casi todos los sistemas de regulación del organismo y se desarrolla en cuatro etapas (Kopin, 1995): (i) la "reacción de alarma" caracterizada por una descarga SMA inmediata en la que se libera al torrente circulatorio adrenalina y noradrenalina; (ii) la "etapa de resistencia" en la que se produce una activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) con la consiguiente liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y de glucocorticoides (cortisol en la mayoría de mamíferos y corticosterona en roedores); (iii) la "etapa de adaptación" cuyos síntomas son hipertrofia adrenal, ulceración gastrointestinal y reducción del tamaño del timo, y por último, si la situación estresante persiste (iv) la "etapa de agotamiento", que provoca la muerte del organismo. Estas etapas no se aceptan hoy en día.

A finales de los años 60, como reflejo de un cambio de paradigma en el estudio del estrés, Richard Lazarus introdujo por primera vez la teoría del estrés psicológico y un marco teórico en el que comprender cómo las personas reaccionan frente a situaciones adversas. Esta teoría sustenta que la respuesta de estrés aparece cuando los sucesos sobrepasan las estrategias de afrontamiento de los individuos. Las situaciones se vuelven estresantes para un individuo sólo si

las percibe como amenazadoras, peligrosas e incontrolables, aunque la persona realmente sí pueda disponer de algún control sobre ellas. Según este autor, los individuos no pueden reaccionar afectivamente a una situación si no realizan una evaluación cognitiva de ésta, aunque no tiene por qué realizarse necesariamente a nivel consciente (Lazarus, 1993). Por lo tanto, la manera como un individuo evalúa y afronta una situación estresante modifica las consecuencias de la misma, lo que indica que no existe una respuesta estereotipada de todos los individuos (McEwen, 1995).

Por otro lado, en los años 70 John W. Mason cuestionó también la propuesta de Selye de una respuesta inespecífica y estereotipada al estrés. A partir de sus trabajos en monos en los que comparaban diferentes estímulos como el frío, el calor o el ayuno, todos ellos capaces de activar la respuesta del eje HPA, observó que cuando estos estímulos eran presentados de manera gradual, minimizándose por tanto el malestar asociado a la exposición a los mismos, los cambios en el cortisol eran claramente dependientes de cada tipo de estímulo estresante: el frío elevaba los niveles de cortisol, el calor los disminuía y el ayuno no tenía efecto. A partir de estos resultados, Mason propuso que la uniformidad de la activación del eje HPA observada normalmente en situaciones estresantes se debía a la reacción emocional común causada por el malestar psicológico asociado a dichas situaciones (Mason, 1968). Sin embargo, la teoría de Mason es criticable en dos sentidos: (i) las respuestas neuroendocrinas ante situaciones estresantes de tipo físico se han descrito incluso en humanos y otros animales bajo los efectos de la anestesia (Dallman y Jones, 1973, Lilly, 1994); (ii) el incremento gradual en la intensidad de los estímulos físicos que utilizaba en sus experimentos podría estar permitiendo al animal una adaptación a la situación que no es posible con cambios bruscos y por lo tanto haría innecesaria la respuesta de estrés. En este sentido, es posible que una situación se perciba como estresante sólo en el caso en el que el estímulo rebase la capacidad de adaptación propia de los mecanismos homeostáticos.

Los estudios de Lazarus y la perspectiva psicosomática de Mason permitieron que algunos investigadores se centraran en la importancia de algunas características de los estímulos estresantes y la capacidad del organismo para percibirlos como tales y responder ante ellos. En este sentido, Weiss (1972), mientras estudiaba la influencia de factores psicológicos en trastornos inducidos experimentalmente (lesiones gástricas), observó que la efectividad del afrontamiento de la situación de estrés para la prevención de ulceraciones dependía de la retroalimentación que recibía el animal de la eficacia de su conducta tras su respuesta de afrontamiento. Tener o no tener control efectivo sobre la situación estresante, parece ser un factor crucial en la aparición de numerosos efectos negativos.

Por otro lado, aunque desde nuestra perspectiva el concepto de estrés implique un cierto grado de respuesta inespecífica a cualquier tipo de situación estresante, existe una importante componente de especificidad de la respuesta de estrés dependiente de la naturaleza del

estímulo estresante. Está ampliamente aceptado que, dependiendo de las características de cada estímulo estresante, las vías nerviosas que se activan y algunos aspectos de la respuesta de estrés pueden ser diferentes (Romero y Sapolsky, 1996, Pacak et al., 1998, Pacak y Palkovits, 2001). Recientemente, en una serie de experimentos se expusieron ratas a tres tipos de estímulos estresantes de tipo sistémico en los que podía graduarse la intensidad (frío, hemorragia e hipoglucemia inducida por insulina) y se valoraron los niveles de ACTH, noradrenalina y adrenalina (Pacak y Palkovits, 2001). Los autores confirmaron que las tres variables estaban relacionadas positivamente con la intensidad de la situación estresante, pero que cada tipo de estímulo activaba cada una de estas hormonas de una manera cuantitativamente diferente. Es decir, aunque estos sistemas fisiológicos se activan tras la exposición a muchos estímulos sistémicos, si se utiliza simultáneamente información de diferentes marcadores, cada estímulo nos puede dar una información cuantitativa diferente.

Actualmente se aceptan dos grandes categorías de estímulos estresantes: estímulos estresantes de tipo emocional (también denominados anticipatorios o procesativos) o de tipo sistémico (también denominados físicos o reactivos). Aunque esta clasificación no es siempre fácil de establecer debido a que determinados estímulos estresantes tienen un perfil mixto, el criterio general es el de clasificarlos, en función de las componentes más definitorias, en uno u otro sentido. Estímulos estresantes de tipo sistémico serían aquellos que provocan perturbaciones directas en la homeostasis (reflejadas en parámetros fisiológicos), como los de tipo inmunológico (administración de endotoxina y citoquinas), alteraciones metabólicas u osmóticas (administración de insulina o de 2-deoxiglucosa, inyección de solución salina hipertónica), hipoxia o hemorragia, entre otros. Todos ellos pueden activar la respuesta de estrés a través de mecanismos reflejos que no implican percepción consciente. Por otro lado, los estímulos estresantes de tipo emocional no constituyen una amenaza directa sino potencial para el equilibrio homeostático y dan lugar a activación emocional. Serían ejemplos situaciones estresantes de tipo social (como la derrota social, el aislamiento social o la privación maternal) y otros que son fundamentalmente emocionales, pero que tienen una componente física (exposición al ruido, dolor tras la exposición a choque eléctrico en las patas de los animales, nado forzado, inmovilización). Sus efectos estresantes son sobre todo el resultado de la activación emocional que los acompaña.

Las rutas que convergen en la activación de la respuesta de estrés a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN, ver más adelante) son también diferentes en función de la categoría del estímulo estresante. De manera general, los estímulos emocionales se procesarían en primera instancia por estructuras encefálicas superiores y acabarían activando el PVN a través de vías límbicas, mientras que los estímulos sistémicos no activarían vías límbicas y activarían el PVN mediante vías más directas de comunicación con el PVN desde el tronco encefálico o áreas circunventriculares (Herman y Cullinan, 1997). Este esquema se ha podido desarrollar gracias a diferentes aproximaciones metodológicas, como el uso de lesiones o el

estudio de la expresión de genes de activación temprana (IEG) combinado con el uso de marcadores anterógrados y retrógrados (Herman y Cullinan, 1997). Gracias a ellos sabemos que las respuestas a este tipo de estímulos emocionales provocan una activación de numerosas áreas del SNC, jugando la amígdala y el septum lateral papeles importantes, mientras que la respuesta a estímulos sistémicos estaría regulada sobre todo por áreas del tronco encefálico y estos estímulos inducirían la activación de un número más discreto de áreas encefálicas (Senba y Ueyama, 1997, Sawchenko et al., 2000).

Aunque esta clasificación general es muy parsimoniosa y heurística, tiende también a una simplificación excesiva. Cada estímulo estresante en función de sus características cualitativas provoca una activación de determinadas vías centrales, y se han descrito diferencias en cuanto a las vías o áreas activadas por distintos estímulos emocionales. Por citar tan sólo un ejemplo, en nuestro laboratorio hemos encontrado que estímulos estresantes de tipo emocional como la exposición a un ambiente nuevo, el nado forzado y la inmovilización, aunque comparten la activación de un gran número común de áreas, también difieren en otros aspectos: la exposición al ambiente nuevo causa una mayor activación de zonas relacionadas con la actividad exploratoria (por ejemplo, corteza piriforme) o la orientación espacial (formación hipocampal), que la exposición al nado forzado o a la inmovilización (Ons et al., 2004).

Como se intuye a través de lo explicado, desde la definición inicial de Selye, han habido numerosos intentos de redefinir, ampliar o concretar el concepto de estrés (para revisión ver Levine, 1985, Angelucci, 2000). Asumiendo en la terminología una distinción entre estímulo estresante (*stressor*), estrés (estado del organismo) y respuesta de estrés (Armario, 1998), durante el presente trabajo nos basaremos en el siguiente marco teórico: bajo el concepto de estrés se incluyen una amplia gama de cambios fisiológicos y conductuales, desarrollados a lo largo de la evolución, 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 (Vigas, 1984). La respuesta de estrés, vista desde el punto de vista de un proceso adaptativo positivo, comprende una serie de respuestas funcionales y conductuales que permiten afrontar situaciones desafiantes. Una respuesta adecuada y coordinada de los diferentes sistemas involucrados en la respuesta de estrés es crucial para la supervivencia del organismo y su normal funcionamiento. Sin embargo, cuando estas respuestas son exageradas, inapropiadas o duraderas, la respuesta de estrés parece estar muy ligada a una serie de alteraciones fisiológicas y psicológicas, como hipertensión y otros problemas cardiovasculares (Bohus y Koolhaas, 1993, Steptoe, 1993), trastornos del sueño (Kant et al., 1995), infertilidad (Moberg, 1985), trastornos del estado del ánimo y trastornos de ansiedad (Halbreich, 1987), alteraciones de la conducta alimentaria (Donohoe, 1984, Brambilla, 2001), propensión al consumo de drogas (Piazza y Le Moal, 1997) y neurodegeneración (Sapolsky, 1992). También se ha demostrado

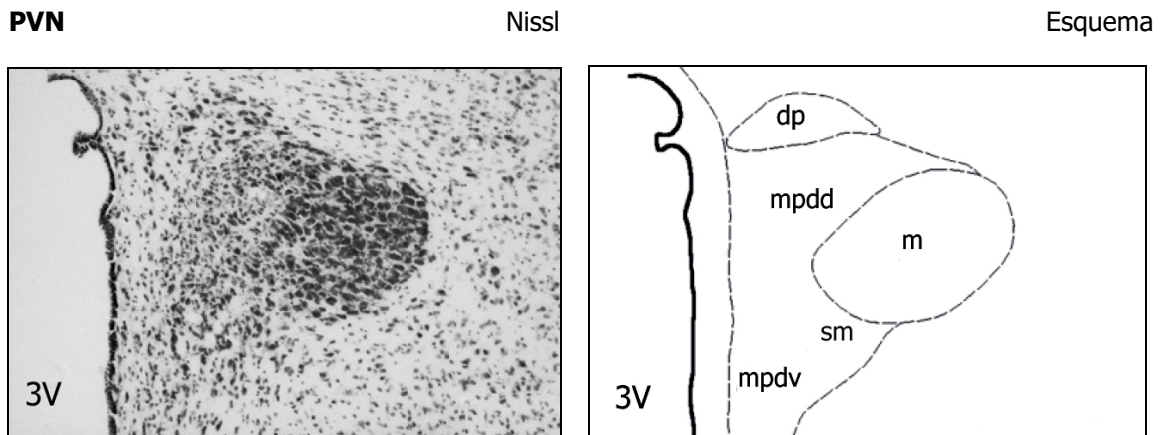
que el estrés incrementa la susceptibilidad de los individuos a padecer enfermedades de tipo inmunológico (Munck et al., 1984) o cáncer (Stefanski, 2001) .

### **1.2.- Eje hipotalámico-pituitario-adrenal:**

En mamíferos, los principales sistemas fisiológicos implicados en la respuesta al estrés son el sistema SMA y el eje HPA. El eje HPA juega un papel crucial en muchas de las consecuencias fisiopatológicas y psicopatológicas resultantes de la exposición a situaciones estresantes y por esta razón es uno de los sistemas mejor caracterizados desde un punto de vista nervioso y endocrino (Michelson et al., 1995).

Los estímulos estresantes se procesan en diversos niveles y estructuras del SNC pero la información acaba convergiendo en una población de neuronas neurosecretoras del PVN, donde tiene origen el inicio de la cascada de activación del eje HPA. En función de los datos de citoarquitectura, histoquímica y conectividad, el PVN puede dividirse en distintos subnúcleos (Herman et al., 2003) (Figura 1). En base al tamaño de las neuronas predominantes, este núcleo se ha diferenciado principalmente en las regiones parvocelular (pPVN) y magnocelular (mPVN). Las neuronas magnocelulares son células neurosecretoras grandes, que sintetizan principalmente arginina-vasopresina (AVP) y oxitocina (OXT), aunque también otros neuropéptidos. Envían sus axones a la neurohipófisis y liberan sus productos en la circulación periférica. El papel clásico de la AVP liberada desde estas neuronas magnocelulares es el mantenimiento del balance osmótico del organismo, mientras que la OXT es crítica en el parto y la lactancia. La región pPVN puede subdividirse a su vez en cinco partes diferentes: periventricular, anterior parvocelular, medial parvocelular (que se subdivide en la parte dorsal y la ventral), dorsal parvocelular (*dorsal cap*) y lateral parvocelular (*submagnocelular*) (Cullinan et al., 1995).

Las neuronas ubicadas en la región medial dorsal parvocelular sintetizan el factor o la hormona liberadora de corticotropina (CRF o CRH), molécula clave en la iniciación de la respuesta de estrés (ver más adelante). La región periventricular contiene también neuronas que sintetizan somatostatina (hormona inhibidora de la hormona del crecimiento) y dopamina (DA). La región medial dorsal contiene a su vez neuronas que sintetizan hormona liberadora de tirotropina (TRH). El resto de las regiones del PVN contienen neuronas que proyectan hacia el tronco encefálico y la médula espinal, y están implicadas en la regulación del sistema nervioso autónomo (Cullinan et al., 1995). Una pequeña porción de estas proyecciones descendentes deriva de neurona paraventriculares que secretan AVP, y otro pequeño grupo deriva de neuronas secretoras de OXT, pero la mayoría de ellas no han sido aún caracterizadas neuroquímicamente (Amstrong, 1995). Por todo lo expuesto, el PVN se considera un núcleo clave en la integración y regulación homeostática.



**Figura 1: Organización del núcleo paraventricular del hipotálamo.** Izquierda: tinción de Nissl. Derecha: esquema de las distintas regiones. Abreviaturas: 3V: tercer ventrículo; dp: región dorsal parvocelular; mpdd: subdivisión medial parvocelular dorsal; mpdv: subdivisión medial parvocelular ventral; m: región magnocelular; sm: región submagnocelular. Adaptado de V. Viau y Sawchenko (2002).

En respuesta al estrés se activan dentro del PVN un número discreto de neuronas localizadas sobretodo en la subdivisión medial parvocelular (Johnson et al., 1992, Cullinan et al., 1995, Herman et al., 2002). Muchas de estas neuronas parvocelulares expresan 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 (ME), desde donde entran en 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 que de ella se originan, entre ellos la ACTH. La acción periférica más destacable de la ACTH se produce en la corteza adrenal, activando la síntesis y secreción de glucocorticoides. Por último, los glucocorticoides ejercen múltiples acciones metabólicas en el organismo para mantenerlo en estado de alerta, lo que le permite responder vigorosamente a las amenazas del entorno durante un mayor periodo de tiempo. Por otro lado, los glucocorticoides son responsables de la mayoría de las consecuencias negativas del estrés (por ejemplo, infertilidad, inmunosupresión, psicopatologías), pero también de regular la propia actividad del eje HPA mediante una serie de mecanismos de retroalimentación negativa actuando a nivel hipofisario, hipotalámico y suprahipotalámico (Johnson et al., 1992, De Kloet et al., 1993, Whitnall, 1993). Los principales elementos y el mecanismo general de funcionamiento del eje HPA se hayan resumidos en la Figura 2.



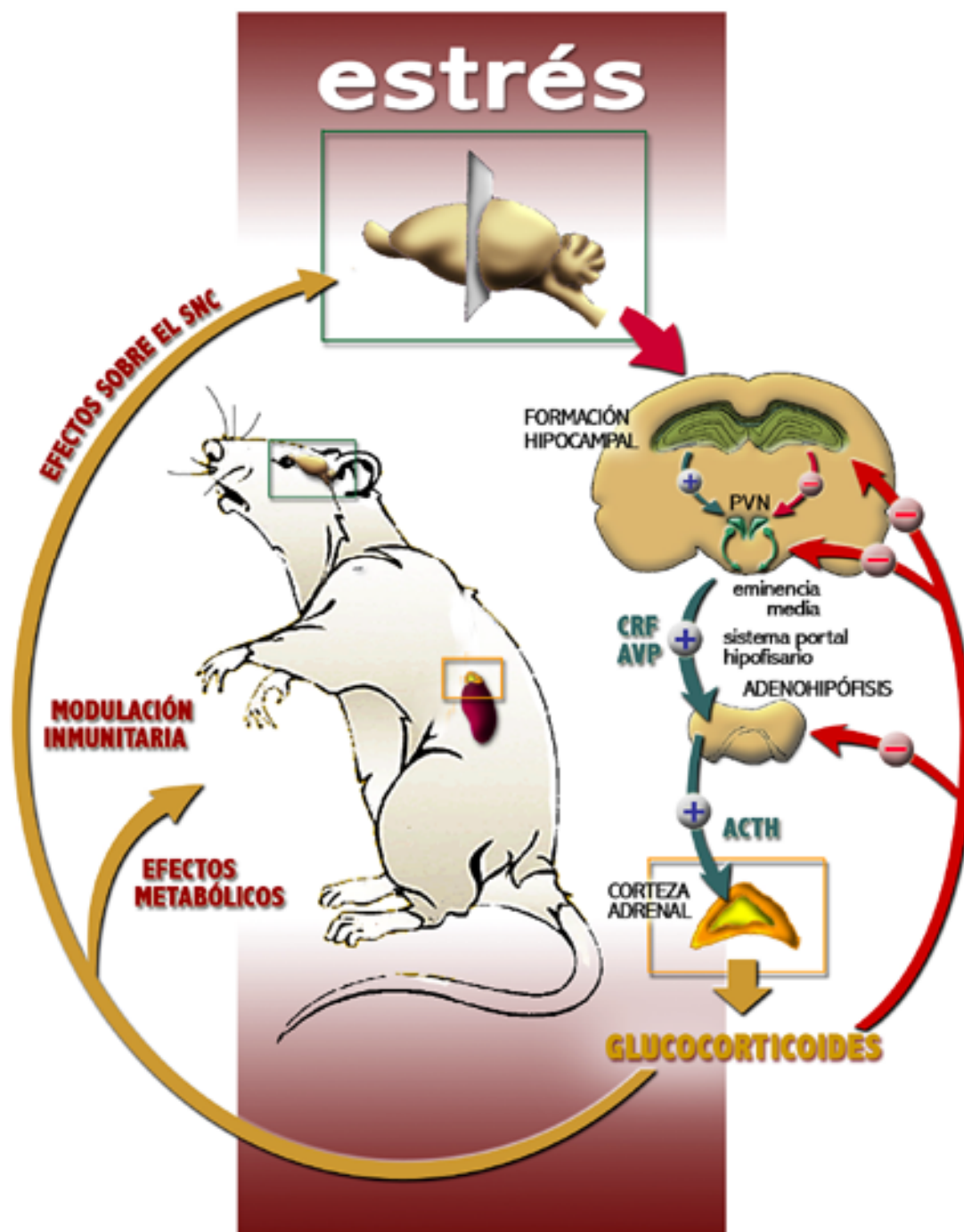


Figura 2: Esquema general del funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Abreviaturas: CRF: factor liberador de corticotropina; AVP: arginina-vasopresina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; SNC: sistema nervioso central

### 1.2.1.- Factores liberadores de ACTH: CRF y AVP

La existencia de un factor hipotalámico regulador de la liberación de ACTH fue sugerida por primera vez por Saffran y colaboradores en el año 1955, pero no fue hasta mucho más tarde cuando Vale y colaboradores (1981) aislaron y caracterizaron a partir de hipotálamos ovinos un péptido de 41 residuos aminoacídicos con actividad liberadora de ACTH, que fue denominado CRF. El papel del CRF en el control de la respuesta de estrés de todo el organismo se ha estudiado extensamente desde entonces y la mayoría de los datos más relevantes respecto a la neuroquímica del estrés corresponden al CRF (Turnbull y Rivier, 1997). La síntesis de CRF en la zona medial dorsal parvocelular del PVN se activa en respuesta a una amplia variedad de estímulos estresantes y es considerado como un componente clave en el eje HPA debido a que es el principal estimulador de la síntesis y liberación de la ACTH en la adenohipófisis. El estudio de la distribución de las neuronas y terminales inmunoreactivas de CRF sugiere que las neuronas de CRF intervienen al menos en tres sistemas funcionalmente diferentes (Swanson et al., 1983). En primer lugar, las neuronas de CRF del PVN envían terminales a la ME, que modulan la liberación de ACTH y otros péptidos relacionados en la adenohipófisis. En segundo lugar, neuronas de CRF en áreas del telencéfalo basal (amígdala central, núcleo del lecho de la estría terminal) o tronco encefálico (núcleo de Barrington, algunas zonas de los núcleos de rafe) podrían estar implicadas en la regulación de respuestas conductuales y autonómicas al estrés. Finalmente, se han localizado neuronas CRFérgicas de manera dispersa en muchas áreas de la corteza cerebral y en la formación hipocampal cuya función es aún poco conocida (Swanson et al., 1983, Sawchenko y Swanson, 1990, Champagne et al., 1998).

La acción del CRF está mediada por dos tipos de receptores: los CRFR<sub>1</sub> y CRFR<sub>2</sub> (con dos subtipos: CRFR<sub>2α</sub> y CRFR<sub>2β</sub>) (Dautzenberg et al., 2001), que se encuentran diferencialmente distribuidos en el SNC (Chalmers et al., 1995). El receptor CRFR<sub>1</sub> está ampliamente distribuido por todo el SNC, incluyendo el bulbo olfatorio, corteza cerebral, sistema límbico (amígdala y formación hipocampal), núcleo rojo, cerebelo e hipófisis (Potter et al., 1994). La distribución del receptor CRFR<sub>2α</sub> se restringe a estructuras límbicas (septum lateral, amígdala, núcleo hipotalámico ventromedial), mientras que el receptor CRFR<sub>2β</sub> se encuentra en elementos no neurales del SNC (v.g plexos coroideos) y en la periferia (músculos cardíacos y esqueléticos, pulmones, intestinos) (Lovenberg et al., 1995).

Ambos tipos de receptores del CRF están asociados a proteínas G acopladas positivamente a adenilato ciclasa (Reul y Holsboer, 2002). La activación de estos receptores provoca un aumento del AMPc intracelular, con la consecuente activación de la proteína-quinasa A (PKA) y la fosforilación de proteínas que, a su vez, estimulan la síntesis del gen de la POMC, la molécula precursora de la ACTH. Además de esta estimulación de la síntesis, el CRF tiene un papel estimulador de la liberación de ACTH a la circulación (Rivier et al., 1982). Otras proteínas con afinidad por los receptores de CRF son la urotensina (en peces), sauvagina (en anfibios) y las

urocortinas (UCN) I, II y III presentes en mamíferos (Dautzenberg y Hauger, 2002). De todos estos ligandos, el CRF presenta una afinidad mucho mayor por el receptor CRFR<sub>1</sub> que por el CRFR<sub>2</sub>, mientras que la UCN I tiene una afinidad similar por ambos tipos, y las UCN II y III se unen con mayor afinidad al receptor CRFR<sub>2</sub>. Por último, un componente más de este sistema es la *CRF-binding protein* (CRFBP), proteína a la que se unen con alta afinidad el CRF y la UCN I, y con menor afinidad las UCN II y III. La CRFBP puede modular la actividad de CRF y UCNs impidiendo la unión de estos factores a sus receptores (Berkowitz et al., 1996).

Se ha observado que la expresión del CRFR<sub>1</sub> en el SNC no es sensible al estrés, con limitadas excepciones. Así, aunque los niveles de este receptor son normalmente bajos o indetectables en el PVN, se ha observado que en esta zona, y en menor medida en el núcleo supraóptico, diversos estímulos estresantes incrementan la actividad transcripcional del gen de este receptor (Luo et al., 1994, Makino et al., 1995, Rivest et al., 1995). Además, la administración exógena de CRF causa, en el PVN, un incremento en la transcripción tanto de CRF (Parkes et al., 1993) como del CRFR<sub>1</sub> (Mansi et al., 1996), pero no del CRFR<sub>2</sub> (Makino et al., 1997). En función de estos datos se ha postulado la existencia de un mecanismo de retroalimentación positivo dentro del PVN, mediante el cual el CRF podría modular su propia síntesis a través del CRFR<sub>1</sub> (Imaki et al., 1996, Drolet y Rivest, 2001). En cambio, a nivel hipofisario, la exposición al estrés puede dar lugar a una regulación a la baja del CRFR<sub>1</sub>, que puede ser parcialmente bloqueada mediante la supresión experimental de los niveles de glucocorticoides (Hauger et al., 1988, Makino et al., 1995), sugiriendo un mecanismo adicional de retroalimentación negativa en el eje HPA.

Finalmente, y en concordancia con la amplia distribución cerebral del CRF, las funciones de este péptido no se restringen a su acción hipofisiotrópica, sino que está involucrado en el control de un gran número de respuestas tanto autonómicas como conductuales a situaciones estresantes, incluyendo alteraciones en la ansiedad, ingesta de comida, *arousal*, aprendizaje y memoria (Dunn y Berridge, 1990, Owens y Nemeroff, 1991, Schwartz et al., 1995, Croiset et al., 2000). En este sentido, se ha propuesto que el CRFR<sub>1</sub> estaría relacionado con funciones cognitivas y ejecutivas como los procesos de atención, aprendizaje y memoria, y con las emociones, mientras que los CRFR<sub>2</sub> estarían más relacionados con procesos más directamente implicados en funciones básicas como la ingesta de comida, la reproducción y la defensa (Smagin y Dunn, 2000). Se ha demostrado recientemente que el bloqueo de los CRFR<sub>1</sub> en la amígdala central o de los CRFR<sub>2</sub> en el septum lateral disminuyen las respuestas defensivas (*freezing*) inducidas por la exposición a una situación estresante (Bakshi et al., 2002), sugiriendo que ambos tipos de receptores jugarían papeles paralelos en la regulación de los comportamientos asociados a las respuestas de estrés, actuando a través de áreas diferentes.

Un segundo péptido con importante actividad hipofisiotrófica es la AVP, una molécula de 9 aminoácidos sintetizada sobre todo en las neuronas magnocelulares y parvocelulares del PVN y

en el núcleo supraóptico. Mientras que las neuronas magnocelulares que sintetizan AVP envían proyecciones a la neurohipófisis, la AVP sintetizada en neuronas del PVN que coexpresan CRF (parvocelulares) alcanza la ME y se libera en la circulación portal hipofisaria (Whitnall, 1993, Croiset et al., 2000, Carrasco y Van de Kar, 2003). Una cuestión fundamental es el origen de la AVP encontrada en los vasos portales. Para comprender mejor este problema tenemos que entender la organización del sistema circulatorio en la ME y la hipófisis. Existen evidencias de que la liberación de AVP en la neurohipófisis puede alcanzar los vasos portales largos de la ME, pero también la adenohipófisis, en este último caso a través de vasos portales cortos que permiten la circulación sanguínea en las dos direcciones (Bergland y Page, 1978, Bergland y Page, 1979). Por lo tanto, los neuropéptidos y otros factores medidos en los vasos portales largos podrían provenir de la liberación en las terminales axónicas de la parte externa de la eminencia media, pero también de la liberación en la neurohipófisis, lo que sugiere una contribución de las neuronas magnocelulares del PVN y del núcleo supraóptico en la regulación del eje HPA. De hecho, las concentraciones de AVP en el sistema portal-hipofisario son demasiado elevadas como para ser explicadas por una liberación desde los axones de las neuronas parvocelulares del PVN y además no muestran cambios tras la lesión del PVN (Antoni et al., 1990). Dificultades metodológicas y resultados contradictorios hacen que éste sea un aspecto aún no bien caracterizado.

La AVP no parece estimular la síntesis de ACTH y por sí misma presenta una débil actividad sobre su liberación, pero en cambio es capaz de potenciar los efectos del CRF sobre la liberación de ACTH, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rivier y Vale, 1983b). Tras el estrés prolongado o crónico se produce un aumento en el número de neuronas que expresan AVP en el PVN (de Goeij et al., 1991, de Goeij et al., 1992), lo que sugiere que la AVP podría contribuir a mantener la respuesta de ACTH en situaciones de estrés crónico, aunque este hecho sigue siendo también un tema controvertido (para revisión ver Aguilera et al., 1994, Makara et al., 2004). Se han caracterizado tres tipos de receptores de AVP (Birnbaumer, 2000, Itoi et al., 2004): V1a, V1b (ambos asociados a proteínas G acopladas positivamente a fosfolipasas) y V2 (asociado a proteína G acoplada positivamente a adenilato ciclasa). V1a se expresa principalmente en el endotelio vascular, V2 en el riñón y V1b (también denominado V3) en las células corticotropas de la hipófisis, siendo estos últimos los más relevantes respecto a la regulación del eje HPA.

### **1.2.2.- Hormonas periféricas: ACTH y glucocorticoides**

#### **Adenohipófisis y ACTH:**

El CRF estimula la síntesis y liberación de la ACTH, un péptido de 30 aminoácidos derivado de la POMC, de la cuál pueden derivarse otros péptidos, algunos de ellos con actividad opioide como las  $\beta$ -endorfinas (Vale et al., 1981). Considerada como la hormona periférica primaria en respuesta al estrés, se ha descrito la síntesis y secreción de ACTH en una amplia gama de situaciones estresantes. Diferentes metodologías, como la administración de antagonistas del

CRF (Rivier y Vale, 1983b, Rivier et al., 1984), la inmunoneutralización del CRF o la AVP (Rivier et al., 1982, Rivier y Vale, 1983a) y la lesión del PVN (Rivest y Rivier, 1991) reducen o eliminan la liberación de ACTH en respuesta al estrés, confirmando el papel crucial de CRF y AVP como cosegretagogos de la ACTH. Sin embargo, otras sustancias como catecolaminas y diversos neuropéptidos (Antoni, 1986) son capaces de estimular la liberación de ACTH y también existen evidencias de factores con un papel inhibitor (Engler et al., 1999).

Una vez en la circulación general, la ACTH actúa principalmente sobre la corteza adrenal estimulando la síntesis y liberación de glucocorticoides. La ACTH actúa en la adrenal mediante la interacción con un receptor de membrana perteneciente a la familia de los receptores de melanocortinas (el MC2-R) que se encuentra casi exclusivamente en células de la corteza adrenal (Adan y Gispen, 2000). La interacción de la ACTH con su receptor provoca en la célula una activación de la adenilato ciclasa, con el consecuente aumento de la concentración intracelular de AMPc y la activación de la PKA, aunque también activa otras vías intracelulares, como el  $Ca^{++}$  (Gallo-Payet y Payet, 2003). Estas vías de activación pueden inducir tanto la activación de enzimas relacionadas con la síntesis de glucocorticoides, que afectan al transporte de colesterol mitocondrial y regulan la escisión de colesterol a pregnenolona (paso limitante de la estereoidogénesis), como la actividad transcripcional de las células adrenocorticales (Gallo-Payet y Payet, 2003, Sewer y Waterman, 2003) provocando cambios más complejos y más duraderos, como efectos tróficos. Consecuentemente, el principal efecto fisiológico a corto plazo de la activación provocada por la ACTH es la estimulación de la síntesis y liberación de glucocorticoides, pero la importancia de los efectos tróficos de la ACTH se hace evidente tras la administración crónica de ACTH o su supresión mediante la administración exógena de glucocorticoides.

### **Corteza adrenal y glucocorticoides:**

La corteza de la glándula adrenal está dividida en tres partes diferenciadas. De la capa más externa a la más interna, nos encontramos con las regiones glomerular, fasciculada y reticular. La región glomerular representa un 10-15 % de la corteza adrenal y libera mineralocorticoides, principalmente aldosterona, involucrada en la retención de sodio y en la homeostasis electrolítica. La región fasciculada, que ocupa el 75-80 % de la glándula adrenal es la responsable de la síntesis y liberación de los glucocorticoides. Por último, la región reticular libera pequeñas cantidades de andrógenos.

Existen evidencias que sugieren que la ACTH no es el único estimulador de la secreción de glucocorticoides, aunque es evidentemente el más importante. Se han observado niveles altos de glucocorticoides tras exposiciones a estímulos estresantes continuos y de larga duración (entre 8 y 48 horas), a pesar de niveles de ACTH aproximadamente basales (Rivier y Vale, 1987, Hauger et al., 1988). Este hecho sugiere una disociación entre ACTH y glucocorticoides y apoya la existencia de otros factores en el control de la secreción de glucocorticoides. Sin

embargo, el mecanismo preciso responsable de esta disociación entre ACTH y corticosterona no está bien establecido hoy en día. Algunos de los factores propuestos para la regulación extra-ACTH de la liberación de glucocorticoides en respuesta al estrés podrían ser: (i) sustancias como la Angiotensina II que causa incrementos dosis dependientes en los niveles de corticosterona sin afectar a los niveles de ACTH (Keller-Wood et al., 1986); y (ii) citoquinas como la interleukina-1 que parece tener un efecto directo sobre la glándula adrenal (Andreis et al., 1991a). Sumándose a estos factores sistémicos, se ha demostrado una regulación neural de la corteza adrenal (Vinson et al., 1994). Existen evidencias que indican una presencia de terminales nerviosas en la adrenal de dos tipos diferentes (Charlton, 1990, Vinson et al., 1994): (i) una con los cuerpos celulares situados fuera de la adrenal, que van en paralelo a los vasos sanguíneos y que se muestra independiente de la estimulación del nervio esplácnico, y (ii) otra con los cuerpos celulares dentro de la médula adrenal que parece estar bajo el control del nervio esplácnico. Además, se ha descrito la existencia de células cromafines dentro de la corteza adrenal. Se ha observado la presencia de catecolaminas y numerosos neuropéptidos en estas terminales nerviosas, lo que es de gran importancia, ya que algunos de ellos (por ejemplo el péptido intestinal vasoactivo, VIP) tienen propiedades vasodilatadoras y la regulación del riego sanguíneo de la adrenal es crítica para la actividad secretora de la corteza adrenal. Es interesante que uno de esos péptidos sea el CRF. Parece ser que el CRF ejerce un efecto estimulador en la esteroidogénesis adrenocortical, que se ha observado *in vivo* (Van Oers y Tilders, 1991, Andreis et al., 1992, van Oers et al., 1992) e *in vitro*, utilizando rodajas (*slices*) de tejido adrenocortical y cromafín (Andreis et al., 1991b, Andreis et al., 1992) o la perfusión de glándulas adrenales aisladas (van Oers et al., 1992). Por el contrario, el CRF no muestra efecto en células adrenocorticales dispersas (Andreis et al., 1992, van Oers et al., 1992). Por tanto, parece ser que el CRF ejerce su efecto estimulador sobre la secreción adrenocortical por mecanismos indirectos, aunque sigue sin estar claro si los principales efectos se deben a cambios en el flujo sanguíneo de la adrenal o a la estimulación de la liberación de ACTH local por las células cromafines (Andreis et al., 1991b, van Oers et al., 1992). A modo de ejemplo del posible papel de la inervación esplácnica de la adrenal, la privación de agua durante dos días provocó un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona sin modificar los de ACTH y este incremento se suprimió tras la denervación adrenal (Ulrich-Lai y Engeland, 2002).

Los glucocorticoides ejercen múltiples acciones en el organismo. Al objeto de clarificar el papel de los glucocorticoides en respuesta al estrés se ha establecido una clasificación de sus acciones en dos categorías fundamentales: moduladoras y preparatorias (Sapolsky et al., 2000). Las acciones moduladoras de los glucocorticoides son aquellas que alteran la respuesta del organismo ante la situación estresante y se han subclasificado en tres categorías: permisivas, supresivas y estimuladoras. Las acciones permisivas de los glucocorticoides se manifiestan durante la fase inicial de la respuesta de estrés y preparan a los mecanismos de defensa del organismo para afrontar el estrés. Las acciones supresivas se dan tras una hora o más del inicio

del estrés y previenen al organismo de las consecuencias negativas de una respuesta excesiva al estrés. Por el contrario, las acciones estimuladoras, aunque también ocurren tras una o más horas desde el inicio de la situación estresante, aumentan los efectos de las hormonas liberadas durante el estrés. Por último, las acciones preparatorias de los glucocorticoides, que pueden ser mediadoras o supresivas, son capaces de modular futuras respuestas del organismo al estrés.

La mayoría de los efectos metabólicos que ejercen los glucocorticoides en la periferia parecen estar encaminados a la redistribución de la energía dentro del organismo (Munck et al., 1984). Estos efectos incluyen un aumento de la gluconeogénesis en el hígado, un aumento de la concentración de glucosa en sangre causado indirectamente por sus efectos sobre la gluconeogénesis y sus efectos lipolíticos, y un aumento de la presión arterial (Michelson et al., 1995). Los glucocorticoides también afectan a la actividad de un amplio número de enzimas y proteínas no enzimáticas, y juegan un papel inhibitorio fundamental en el control de las respuestas inflamatoria e inmune. Finalmente, los glucocorticoides poseen un papel clave en la regulación de la actividad del eje HPA a través de mecanismos de retroinhibición.

### **1.2.3.- Receptores de glucocorticoides y mecanismos de retroinhibición**

Las acciones genómicas de los glucocorticoides están mediadas por dos tipos de receptores: el tipo I (o mineralocorticoide, MR) y el tipo II (o glucocorticoide, GR) (Reul y de Kloet, 1985). Ambos tipos de receptores poseen un dominio de unión a esteroides y un dominio de unión al ADN, y se encuentran en el citosol asociados a otras proteínas, principalmente proteínas de *shock* térmico (Pratt, 1993). Cuando se produce el reconocimiento del ligando, estos complejos se disocian y la hormona unida al receptor se trasloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción en algunos genes que poseen en su región promotora elementos de respuesta a glucocorticoides. MRs y GRs se diferencian en su afinidad por algunos ligandos y en su distribución (Reul y de Kloet, 1985, De Kloet, 1991).

Los MRs se ubican principalmente en neuronas de la capa II de la corteza, la formación hipocámpal, los núcleos central y medial de la amígdala y neuronas motoras y sensoriales del tronco encefálico. Por su parte, los GRs se encuentran en la hipófisis y presentan una distribución amplia en el SNC, incluyendo la corteza piriforme, la formación hipocámpal, el septum, el PVN, el núcleo supraóptico y, en menor grado, los núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico. También se encuentran niveles moderados de GRs en numerosos núcleos del tálamo, áreas del estriado, la amígdala central y otras zonas de la corteza cerebral. En cuanto a su afinidad por el ligando, se ha determinado para los MRs una  $K_d$  de un orden de magnitud menor que la de los GRs (Veldhuis et al., 1982). Una de las consecuencias de esta diferencia de afinidad por el ligando es que en rata, más del 80% de los MRs están ocupados por la corticosterona en condiciones basales, mientras que el grado de ocupación de los GRs varía en paralelo con el incremento en los niveles plasmáticos de glucocorticoides, bien durante el ritmo circadiano o bien en respuesta al estrés. En base a estas diferencias se ha sugerido que MRs y

GRs tienen funciones diferentes en la regulación de la respuesta del eje HPA (Ratka et al., 1989): los efectos tónicos de los glucocorticoides estarían mediados por los MRs, en tanto que los GRs estarían sobre todo implicados en el retorno a las condiciones basales después de la activación.

Además de los efectos genómicos mediados por MRs y GRs, existen muchas pruebas de la existencia de efectos rápidos de los glucocorticoides, incompatibles con el tiempo requerido para la transcripción génica (Makara y Haller, 2001). Se ha propuesto, por lo tanto, la existencia de mecanismos no genómicos, probablemente mediados por receptores de membrana aún no caracterizados.

Dependiendo de su velocidad de acción, los mecanismos de retroinhibición del eje HPA ejercidos por glucocorticoides han sido divididos en tres categorías: rápido, intermedio y lento (Keller-Wood y Dallman, 1984). La retroinhibición rápida se manifiesta ya dentro de los diez minutos del comienzo de la respuesta al estrés. Por su velocidad, este efecto es incompatible con los mecanismos de transcripción génica mediados por receptores GR y MR. Muy recientemente se han aportado evidencias de que los cannabinoides endógenos (o endocannabinoides) podrían participar en el *feedback* rápido de los glucocorticoides ejerciendo un efecto inhibitorio rápido sobre la liberación de glutamato en las sinapsis excitadoras que contactan con las neuronas parvocelulares del PVN (Di et al., 2003). Según el modelo propuesto, los glucocorticoides interactuarían a través de un receptor de membrana acoplado a proteína G presente en células del pPVN, activando la liberación al medio de endocannabinoides. Los endocannabinoides liberados interactuarían sobre receptores de membrana presinápticos (también acoplados a proteína G), inhibiendo la liberación de glutamato. Los mecanismos retroinhibidores de velocidad intermedia se desarrollan una vez transcurridos 30-60 minutos del comienzo de la respuesta, e involucran mecanismos de transcripción génica mediada por receptores GR y MR. Finalmente, los mecanismos de retroinhibición lenta también comienzan tras 30-60 minutos del inicio de la respuesta, pero a diferencia de los mecanismos intermedios pueden durar muchas horas. Los efectos de los mecanismos lentos de retroinhibición incluyen el bloqueo de la transcripción de los genes de CRF, AVP y POMC inducida por el estrés.

Otro parámetro importante en la regulación de los efectos de los glucocorticoides en el organismo es la transcortina (*corticosteroid-binding globulin*, CBG), a la cual se encuentran ligados una alta proporción de los glucocorticoides circulantes en situación basal (Johnson et al., 1992). En cambio, los niveles de corticosterona libre aumentan tras la exposición al estrés. Se considera que la hormona unida a la transcortina no tiene acceso al receptor y, por lo tanto, es solamente la fracción libre la que se encuentra disponible para ejercer la actividad biológica en la célula. Este hecho es importante porque los niveles de transcortina no suelen medirse



pero pueden dar lugar a cambios en la fracción libre, sin cambios en los niveles totales de glucocorticoides en sangre.

### **1.2.4.- Eje HPA e intensidad de los estímulos estresantes**

Las situaciones estresantes difieren en cuanto a su naturaleza, lo que implica un procesamiento diferencial por el SNC. Sin embargo, independientemente de las cualidades de la situación estresante, éstas también pueden diferir en otra dimensión: la intensidad o grado de severidad. Es de esperar que las consecuencias fisiológicas y eventualmente patológicas de la exposición a situaciones estresantes se encuentre relacionada con su severidad. Por lo tanto, una evaluación detallada y fiable de la intensidad del estrés es de gran relevancia tanto a nivel básico como clínico. Para poder trabajar en este sentido necesitamos saber qué respuestas ante una situación estresante son proporcionales a su intensidad.

Es interesante que aunque existe un gran número de variables fisiológicas que responden ante la exposición a estímulos estresantes, sólo unas pocas parecen ser sensibles a su intensidad. En este sentido, es importante por tanto distinguir conceptualmente entre los términos de marcador de estrés, que indicaría si una variable determinada es sensible al estrés, y el concepto de marcador de la intensidad de estrés, que se referiría al hecho que la magnitud de la respuesta de una variable determinada es proporcional a la intensidad de la situación estresante. La investigación en este sentido sólo se ha llevado a cabo de una manera sistemática en ratas. La conclusión general sería que de entre las muchas variables sensibles al estrés, sólo unas pocas pueden considerarse como buenos marcadores de la intensidad del estrés, como por ejemplo los niveles plasmáticos de catecolaminas (particularmente adrenalina), glucosa, prolactina y hormonas del eje HPA o la reducción en los niveles de ingesta (Martí y Armario, 1998). Datos de nuestro laboratorio pueden ilustrar la diferencia entre marcadores de estrés y marcadores de intensidad de estrés (Armario et al., 1986a): cuando se introdujeron cambios progresivos (estresantes) en el ambiente de los animales, los niveles de corticosterona y prolactina aumentaron en función del grado de perturbación causado, mientras que otras hormonas de la adenohipófisis como la hormona luteinizante (LH) o la hormona estimulante de tiroides (TSH) aumentaron en la misma medida frente a todos los estímulos, sin reflejar la intensidad de la situación estresante.

Pero, ¿qué características debemos tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados que nos aportan estos marcadores de intensidad de estrés? En este sentido, tenemos que evaluar: (i) el grado mínimo de intensidad de estrés que una variable particular es capaz de detectar de manera fiable y consistente (umbral); (ii) el rango de variación en el marcador cuando variamos la intensidad del estrés; y (iii) el rango de intensidades de estrés que una variable es capaz de detectar.

El estudio de las características de los marcadores de intensidad de estrés es uno de los objetivos del presente trabajo y será discutido en profundidad en el primer capítulo de resultados, pero para ilustrar de una manera más clara el sentido de estas características, podemos comparar las particularidades de diferentes marcadores. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de adrenalina, ACTH, corticosterona y prolactina tienen bajos umbrales de respuesta, por lo que perturbaciones mínimas son capaces de activarlos (Hennessy y Levine, 1978, Natelson et al., 1981, Kant et al., 1983, Armario et al., 1986a, Armario et al., 1986b). Por el contrario, los cambios en los niveles de glucosa tienen un umbral de activación mayor y sólo se pueden considerar fiables ante exposiciones a estímulos estresantes de intensidad intermedia o alta (Armario et al., 1986b, Armario et al., 1990b). Por último, la inhibición de la ingesta de comida tras la exposición al estrés, evaluada 24 horas tras la exposición al estrés, tiene un umbral de activación elevado y se puede observar sólo tras situaciones estresantes relativamente severas (Armario et al., 1990b, Martí et al., 1994b). La capacidad de una variable para discriminar entre diferencias en intensidad depende de la pendiente de la relación entre el cambio en la variable de interés y la intensidad de la situación estresante. Mientras que esta pendiente es pronunciada en el caso de las primeras hormonas comentadas, no lo es en el caso de la glucosa y menos aún en el de la ingesta de comida. Por último, es importante si se produce un efecto techo en la variable de interés. Este hecho es de particular importancia en el caso de los niveles plasmáticos de corticosterona, el marcador de intensidad de estrés más comúnmente utilizado. En las condiciones de nuestro laboratorio, los niveles basales de corticosterona plasmática en ratas macho durante las horas de la mañana son de alrededor de 10 ng/ml, mientras que tras la exposición a estímulos estresantes suaves pueden alcanzar niveles de alrededor de 100 ng/ml y tras situaciones estresantes moderadas alrededor de los 250 ng/ml. Niveles de corticosterona de 200 y 400 ng/ml se pueden alcanzar con unos niveles plasmáticos de ACTH de entre 500-1000 ng/ml, niveles que están muy lejos de los máximos que puede alcanzar la ACTH tras la exposición a estímulos severos como la IMO. Por tanto, es obvio que los niveles plasmáticos de corticosterona sólo se deberían utilizar como marcadores de intensidad de estrés ante situaciones estresantes de intensidad baja a moderada, como por ejemplo exposiciones a ambientes nuevos (Kant et al., 1983). Si hacemos una revisión de la literatura podemos observar que en muchos de los estudios realizados este hecho no se ha tenido en cuenta, lo que ha llevado a interpretaciones erróneas. Aunque los niveles de corticosterona medidos justo al finalizar la exposición a situaciones estresantes relativamente severas no son capaces de reflejar la intensidad del estrés, una alternativa posible es la evaluación de la dinámica de los niveles de corticosterona una vez terminada la exposición al estrés (ver capítulo 1 del presente trabajo).

La validez de las hormonas del eje HPA en la evaluación de la intensidad de las situaciones estresantes es aplicable no sólo a estímulos de tipo emocional, sino también de tipo sistémico. La respuesta plasmática de la ACTH parece estar relacionada positivamente con la magnitud de

la hemorragia en gatos (Bereiter et al., 1984), la intensidad del ejercicio o la hipoglucemia inducida por insulina en perros (Keller-Wood et al., 1981, Radosevich et al., 1989), y con la dosis de endotoxina y citoquinas en ratas (Sapolsky et al., 1987, Sharp et al., 1989, Derijk et al., 1991). Sin embargo, otras variables, entre ellas los niveles plasmáticos de catecolaminas, no se han estudiado tan detalladamente, siendo posible que los resultados no vayan en el mismo sentido.

Por último nos queda abordar el tema de si, como ocurre en animales de laboratorio, las hormonas del eje HPA y SMA son también buenos índices de intensidad de estrés en humanos. Se ha descrito que los niveles de ACTH y cortisol parecen estar relacionados positivamente con la intensidad del ejercicio (Dimsdale y Moss, 1980, Farrell et al., 1983). Además, la respuesta endocrina a situaciones estresantes en humanos es en la mayoría de los casos cualitativamente similar a la de otros animales, con aumentos en los niveles de catecolaminas, ACTH, cortisol y prolactina (Dimsdale y Moss, 1980, Meyerhoff et al., 1988, McCann et al., 1993). Sin embargo, se han realizado pocos estudios en relación a la evaluación de estas hormonas como marcadores de intensidad de estrés. En un experimento encaminado a este objetivo, se estudiaron los niveles de ansiedad de estado y los niveles plasmáticos de hormonas en estudiantes de Medicina en tres situaciones: durante su actividad cotidiana y justo antes de dos exámenes que diferían en dificultad y en intensidad, evaluada precisamente por la ansiedad que provocaban (Armario et al., 1996). Tanto la ansiedad subjetiva como las variables fisiológicas se incrementaron en los días de examen respecto a los días normales, pero además, la ansiedad y los niveles de prolactina discriminaron entre las tres situaciones, mientras que los cambios en el cortisol, aunque iban en la misma dirección, aportaron un menor grado de discriminación entre las situaciones, y por último, aunque los niveles de glucosa aumentaron con el estrés lo hicieron independientemente de la situación. Por tanto, los resultados obtenidos en humanos van en la misma dirección que los realizados con animales de laboratorio, aunque faltan estudios al respecto.

### **1.2.5.- Dinámica del eje HPA en respuesta al estrés**

Tras la exposición aguda al estrés se pueden detectar cambios en todos los niveles del eje HPA, siendo fundamental conocer la dinámica temporal. La activación de las neuronas parvocelulares del PVN se puede detectar rápidamente mediante la inducción de IEG tales como el *c-fos*, con un incremento en los niveles de mRNA que suele ser significativo a partir de los 15 min del inicio de la situación estresante, pero que alcanzan el máximo alrededor de los 30 min (Honkaniemi et al., 1992, Imaki et al., 1992, Senba et al., 1994, Kovacs y Sawchenko, 1996). Se observa también un rápido aumento de la expresión del gen de CRF en el PVN que se puede detectar mediante el estudio de su transcrito primario (heteronuclear, hnRNA) (Kovacs y Sawchenko, 1996, Ogilvie et al., 1998, Ma y Aguilera, 1999, Vallès et al., 2003). La sonda intrónica del CRF es una herramienta mucho más adecuada para el estudio de la respuesta

central del eje HPA, ya que los niveles del hnRNA del CRF a nivel basal son casi indetectables y muestran un aumento pronunciado en respuesta a situaciones estresantes de diferente intensidad. Por el contrario, los aumentos en el mRNA del CRF sólo se observan de forma consistente tras 3 o 4 horas del inicio de la exposición al estrés (Suda et al., 1988, Harbuz y Lightman, 1989, Darlington et al., 1992) y el incremento observado no suele ser sensible a estímulos de intensidad suave, debido a los altos niveles que ya se observan en condiciones basales. La activación transcripcional del gen de la AVP en las neuronas parvocelulares del PVN es mucho más lenta que la del CRF, con un pico del hnRNA de la AVP alrededor de 1 hora tras el inicio de la exposición al estrés (Herman, 1995, Kovacs y Sawchenko, 1996, Ma y Aguilera, 1999, Vallès et al., 2005). La exposición al estrés también puede aumentar la actividad transcripcional en las células que expresan POMC en la hipófisis anterior, aunque de nuevo el incremento en el mRNA sólo se detecta ante situaciones estresantes severas (Harbuz y Lightman, 1989). El estudio de los niveles de mRNA de POMC permite detectar incrementos a los 15 minutos de exposición al estrés (Ginsberg et al., 2006).

La exposición a estímulos estresantes causa una rápida liberación de ACTH que se observa claramente a partir de los 5 minutos del inicio de la exposición. Si esta exposición a la situación estresante continúa, el máximo de liberación se suele observar a partir de los 15 minutos y se mantiene durante 30-60 minutos (García et al., 2000). A partir de este momento, se observa un descenso progresivo (Rivier y Vale, 1987, García et al., 2000) que puede acabar en niveles muy próximos a los basales a pesar de la persistencia del estímulo (10-24 horas) (Kant et al., 1987, Hauger et al., 1988, Armario et al., 1990a). Esta disminución progresiva se ha descrito incluso durante exposiciones a estímulos estresantes severos. Por tanto, la evaluación de los niveles plasmáticos de ACTH tras la primera hora de exposición al estrés no sería apropiada para valorar la intensidad del estrés, ya que podría dar lugar a interpretaciones erróneas. La razón por la que se produce esta disminución progresiva no está totalmente establecida, pero parece debida, en parte a la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides y en parte a la incapacidad de las células corticotropas de mantener una elevada liberación de la ACTH durante horas (Rivier y Vale, 1987, Martí et al., 1999).

La dinámica de liberación de los niveles de corticosterona plasmática es muy diferente a la de la ACTH. En primer lugar, aunque la exposición a la situación estresante sea breve (pocos minutos), el momento apropiado para la determinación de la liberación de corticosterona será a los 15-20 minutos desde el inicio de la exposición, debido al tiempo requerido por la corteza adrenal para alcanzar el máximo de síntesis de glucocorticoides. Sin embargo, si la exposición continúa 15 minutos o más, el máximo de corticosterona se alcanza alrededor de los 30-60 minutos tras el inicio de la exposición a estímulos de intensidad relativamente elevada (Levin et al., 1989, Dhabhar et al., 1997, Dal-Zotto et al., 2004). El periodo de 15-20 minutos parece ser un tiempo de compromiso si nuestro objetivo es medir los niveles de ACTH y corticosterona

simultáneamente tras un estrés de intensidad baja o moderada. En segundo lugar, la capacidad de la adrenal de liberar glucocorticoides se satura con niveles relativamente bajos de ACTH (Kant et al., 1983, Keller-Wood et al., 1983). En tercer lugar, el progresivo descenso de los niveles de ACTH cuando la exposición al estrés es duradera no se observa en los niveles de corticosterona, como ya se ha comentado previamente. Estos resultados no se pueden explicar por el mantenimiento de una secreción prolongada de glucocorticoides como consecuencia de un pico intenso de liberación de ACTH, dado que no se observa con la inyección endógena de ACTH. Por lo tanto, parece que bajo ciertas condiciones, podemos encontrar niveles elevados de corticosterona a pesar de niveles casi basales de ACTH. Otro ejemplo de esta disociación entre las dos hormonas es el caso del ritmo circadiano. Ratas a las que se les ha restringido el acceso a la comida durante unas horas en la mañana muestran un marcado pico anticipatorio de corticosterona justo antes del acceso diario a la comida y un marcado descenso tras la comida, con cambios sutiles en los niveles de ACTH (Wilkinson et al., 1979).

### **1.2.6.- Eje HPA y adaptación al estrés**

Las consecuencias de una exposición crónica o repetida a estímulos estresantes han sido ampliamente estudiadas, debido a su posible implicación en las patologías asociadas al estrés. Los cambios observados tras el estrés crónico dependen de muchos factores como el tipo, duración e intensidad del estímulo, haciendo difícil una generalización. Sin embargo, generalmente se acepta (Martí y Armario, 1998) que tras exposición crónica a situaciones estresantes de cierta severidad los principales cambios producidos son: (i) reducción de la ingesta de comida y del incremento del peso corporal; (ii) hipertrofia adrenal y aumento de la respuesta adrenocortical al ACTH; (iii) aumento de los niveles basales de corticosterona, acompañados generalmente de niveles normales de ACTH; (iv) incrementos en la expresión de POMC en la adenohipófisis; (v) regulación a la baja de receptores de CRF y aumento de la respuesta a la administración *in vivo* de CRF exógeno; (vi) aumento de la expresión de CRF y AVP en el PVN; y (vii) regulación a la baja de los receptores de GR, y no de los de MR, en la formación hipocampal.

A pesar de que uno de los fenómenos más característicos de la adaptación al estrés crónico es la progresiva disminución de los niveles de ACTH, la reducción de la respuesta de la corticosterona es poco consistente, probablemente debido a la hipertrofia adrenal y al aumento de la respuesta de la corteza adrenal a la ACTH que acompaña a muchas situaciones de estrés crónico. Datos previos de nuestro laboratorio (García et al., 2000) y el presente trabajo (ver capítulo 2) aportan claridad a este respecto al estudiar las dinámicas hormonales durante el período posterior a la finalización de la sesión de estrés.

Sin embargo, la adaptación del eje HPA al estrés repetido no es un fenómeno universal. Así, no se ha observado adaptación después de la exposición repetida de ovejas a hemorragia (Smith et al., 1988) o de ratas al nado forzado en agua a una temperatura de 25° C (Dal-Zotto et al.,

2000). Cabe destacar que en este último caso, aunque no se observó adaptación de la respuesta del eje HPA, sí que se observó en otras variables: la exposición repetida al nado forzado redujo tanto el grado de hiperglucemia como la hipotermia causada por una última exposición al mismo estímulo. La razón exacta de esta ausencia de adaptación del eje HPA en algunos casos no está clara, aunque es posible que bajo ciertas condiciones estresantes particulares que presentan una componente física importante, la activación del eje HPA (así como la de otros sistemas de respuesta al estrés) pueda ser crítica para mantener la homeostasis y, por lo tanto, se mantendría íntegramente la respuesta a pesar de la familiarización con el estímulo.

Los mecanismos fisiológicos involucrados en la adaptación al estrés repetido no son aún bien conocidos. Algunos trabajos han dirigido su atención al papel de los glucocorticoides en este fenómeno. Se ha observado un menor grado de reducción de la respuesta de ACTH tras la administración repetida de endotoxina en ratas adrenalectomizadas (ADX) suplementadas con la implantación de un *pellet* subcutáneo de corticosterona (ADX+B), comparadas con ratas intactas (Chautard et al., 1999), indicando que la liberación de glucocorticoides inducida por el estímulo estresante puede contribuir de manera parcial al desarrollo de la adaptación. Resultados similares se han observado en nuestro laboratorio tras la exposición repetida a la inmovilización (Dal-Zotto et al., 2002). Por otro lado, tras la inmovilización en tubo repetida diariamente se ha observado la disminución esperada en la inducción del gen del CRF ante una nueva presentación del estímulo en ratas intactas, pero no en ratas ADX mantenidas con una dosis baja de corticosterona (Pinnock y Herbert, 2001). En un grupo adicional de ratas ADX suplementadas con una dosis baja de corticosterona se pudo observar una reducción en la expresión del gen del CRF, lo que sugiere un papel importante de la corticosterona plasmática en los cambios en la expresión de este gen. Por lo tanto, los glucocorticoides podrían jugar un papel tan sólo parcial en la adaptación de los componentes periféricos del eje HPA al estrés repetido, pero su papel podría ser más importante en los cambios celulares que llevan a las modificaciones en la expresión del gen del CRF.

La adaptación al estrés repetido que se ha descrito a nivel periférico se ha observado también a nivel de activación del SNC, según se desprende de numerosos estudios de expresión de IEG como el *c-fos* (Umemoto et al., 1994a, Umemoto et al., 1994b, Watanabe et al., 1994, Umemoto et al., 1997, Bonaz y Rivest, 1998). La adaptación total o parcial descrita para *c-fos* en respuesta a la presentación repetida de un estímulo se observa tanto en el PVN como en otras áreas del SNC, incluyendo el tronco encefálico, por lo que la disminución en la activación del PVN podría ser una consecuencia de cambios en las señales provenientes de otras regiones. Es interesante destacar, sin embargo, que existen diferencias en la adaptación de la expresión de *c-fos* en respuesta al estrés repetido según se midan los niveles del mRNA o de la proteína. Mientras que la adaptación en la expresión del mRNA es consistente en la literatura y muy generalizada dentro del SNC, esto no siempre se refleja en una disminución en el número de

neuronas que expresan la proteína de *Fos*, analizadas mediante técnicas inmunohistoquímicas (Ons, 2005).

Tras un protocolo de estrés repetido, la respuesta fisiológica al estímulo homotípico se encuentra habitualmente reducida, mientras que la respuesta a un estímulo heterotípico es normal o está incluso aumentada (Martí y Armario, 1998). Esto indicaría que la capacidad de respuesta del eje HPA se mantiene y que la adaptación al estímulo heterotípico no es atribuible simplemente a la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides liberados durante la precedente presentación del estímulo. Otros autores (Dallman et al., 1992) han postulado que la exposición a una situación estresante induce una sensibilización del SNC a posteriores estímulos estresantes, que compensaría la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides, manteniendo así la capacidad de respuesta del eje. Existen pruebas directas de esta sensibilización del eje HPA tanto en situaciones de estrés agudo (Andres et al., 1999) como crónico (Martí et al., 1994a). Además, el estrés crónico induce una resistencia parcial del eje HPA a la retroinhibición por glucocorticoides (Vernikos et al., 1982, Young et al., 1990, Mizoguchi et al., 2003), reduciendo el impacto de los glucocorticoides liberados en presentaciones previas del estímulo. Todos estos datos sugieren que la adaptación al estímulo estresante homotípico sería el resultado de factores distintos a la retroalimentación negativa ejercida por glucocorticoides. La contribución de los glucocorticoides al fenómeno de la adaptación podría estar más relacionada con los procesos de aprendizaje asociados a la adaptación que con los mecanismos de retroinhibición.

En este sentido, es de destacar que aquellos casos en los que se ha observado adaptación al estrés repetido, ésta sigue las reglas de la habituación definidas por Groves y Thompson (1970): la reducción de la respuesta es directamente proporcional a la frecuencia y la duración de la exposición al estímulo e inversamente proporcional al intervalo de tiempo entre las sucesivas exposiciones al estímulo. Una excelente demostración de lo anterior la proporcionó De Boer y colaboradores (1990), quienes expusieron a ratas diariamente a un estrés por inmersión en un tanque con agua a 35° C. Estudiando las concentraciones plasmáticas de adrenalina, noradrenalina, glucosa y corticosterona, observaron una progresiva reducción de la respuesta para todas las variables analizadas entre la primera y la quinta exposición cuando el intervalo entre estímulos era de 24 horas, pero no cuando fue de 72 horas. Resultados que cuadran perfectamente con el proceso de habituación han sido también descritos tras exposición repetida a la inmovilización en tubo (Ma y Lightman, 1998).

La habituación se considera una forma primitiva de aprendizaje a nivel filogenético, que no involucra procesos asociativos como los implicados en otros tipos de aprendizaje como el condicionamiento clásico. Sin embargo, la adaptación al estrés repetido, aunque sigue las leyes de la habituación, parece involucrar mecanismos más complejos que aquellos implicados en otros procesos de habituación como el reflejo de orientación. En este sentido, se ha observado

que la hipotermia causada en ratas por inmovilización en tubo seguida de la inmersión parcial en agua fría se veía progresivamente reducida por la repetición diaria de la experiencia con el estímulo (Riccio et al., 1991). Sin embargo, cuando cambiaron el color del tubo de inmovilización y las características del contexto, la habituación desapareció y la hipotermia provocada resultó similar a la de los animales expuestos al estímulo por primera vez. En consonancia con estos resultados, pero trabajando con la respuesta de los ejes HPA y SMA, se ha observado (Dobráková et al., 1993) que la adaptación al estrés por manipulación repetida diariamente en ratas desaparecía al cambiar la persona que manipulaba a los animales. Los resultados anteriores favorecen la hipótesis de que en la adaptación al estrés repetido hay involucrados ciertos procesos asociativos. Sin embargo, es necesario un mayor esfuerzo experimental en este campo para determinar el tipo de aprendizaje subyacente a la adaptación al estrés crónico o repetido.





## **2: DIFERENCIAS INDIVIDUALES Y ESTRÉS**

### **2.1.- Diferencias individuales y estructura de la personalidad**

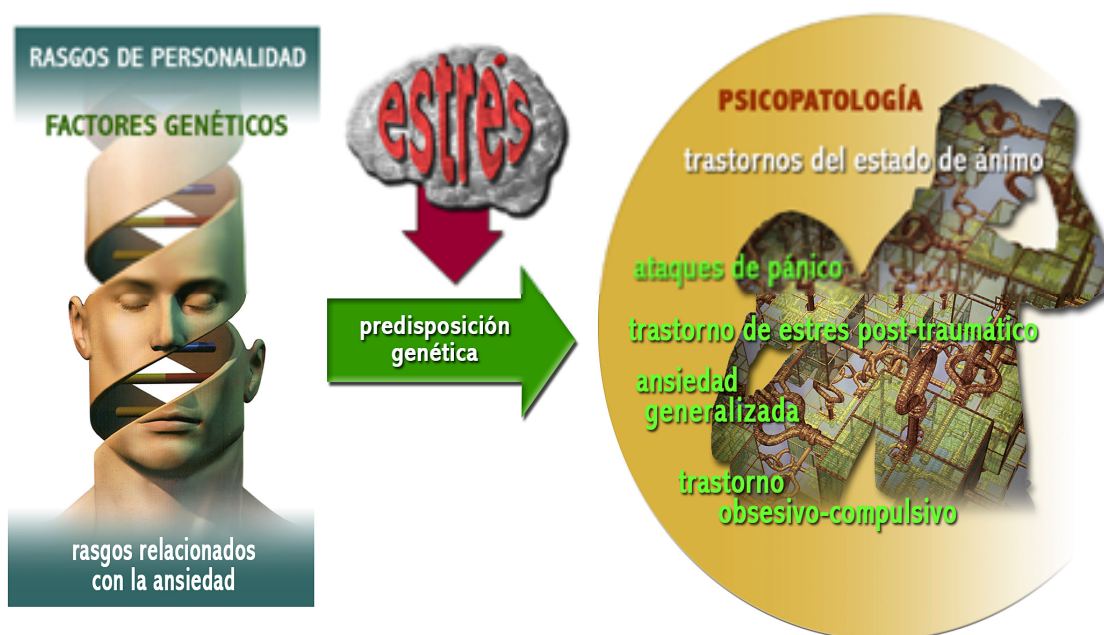
#### **2.1.1. Introducción**

Los sistemas biológicos tienden particularmente a la variación y encontramos variaciones notables en la mayoría de las funciones. En los estudios experimentales, incluyendo el estudio de los fundamentos biológicos de procesos mentales, esta variabilidad suele interpretarse como "ruido"; es decir, como algo que debe ser minimizado al máximo y si es posible, eliminado (Plomin y Kosslyn, 2001). Sin embargo, existe una buena razón para no ignorar esta variabilidad sino utilizarla, ganando así potencia a la hora de formular y evaluar hipótesis: el estudio de las diferencias individuales representa una oportunidad para la evaluación de ciertas teorías al nivel psicológico y neurobiológico (Lamiell, 1981). Se ha propuesto que las diferencias individuales que de forma natural aparecen entre los individuos pueden ser útiles porque (i) revelan la estructura de funciones psicológicas, (ii) pueden aportar nuevos puntos de vista respecto a la aproximación metodológica basada en la comparación de medias, y (iii) pueden tener un papel crucial cuando intentamos entender la conexiones entre determinados procesos psicológicos y su substrato neurobiológico (Kosslyn et al., 2002).

Aunque los miembros de una misma especie comparten los mismos mecanismos fundamentales, los sistemas biológicos son redundantes y complejos, permitiendo por tanto diferentes caminos para la obtención de una misma meta o para la activación de un determinado proceso (Kosslyn et al., 2002). Por tanto, los humanos (así como otros animales) podrían diferir no sólo en la eficacia de un determinado mecanismo, sino también en la frecuencia con la que un mecanismo particular es activado. Si un grupo de individuos tiende a utilizar una determinada estrategia (fruto de la combinación de determinados procesos), mientras que otro grupo de individuos se basa en otro tipo diferente de estrategias, el analizar los datos utilizando una aproximación estadística de comparación de medias nos llevaría a

perder información y, en el peor de los casos, a interpretaciones erróneas. La comparación de medias, partiendo de una población heterogénea, puede ser un buen inicio para la caracterización de determinados procesos, pero no debemos olvidar la importancia de las diferencias individuales para poner en marcha mecanismos alternativos. La combinación de ambas aproximaciones puede mostrarse como más potente y heurística para el estudio de las bases neurales de procesos psicológicos (Kosslyn et al., 2002). Este tipo de enfoque se ha visto beneficiado por los avances y la aplicación de métodos estadísticos (correlación, análisis de regresión, factoriales, discriminantes o de *clusters*).

El reconocimiento de que las patologías asociadas al estrés son el resultado de la interacción entre la exposición a los estímulos estresantes y la existencia de características individuales (que hacen a unos sujetos mucho más sensibles que otros al desarrollo de determinadas patologías) ha sido de enorme importancia en la medicina psicosomática. Por ello, se ha dedicado un enorme esfuerzo a la posible relación entre determinados rasgos psicológicos en humanos o rasgos conductuales en animales y la respuesta fisiológica al estrés, casi siempre centrada en los ejes SMA y HPA (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema de la hipótesis sobre la relación entre los rasgos de personalidad y el estrés como elemento precipitante de determinadas psicopatologías, aplicado al rasgo de ansiedad.

En los últimos años, ha resurgido el interés en las Neurociencias por el estudio de la personalidad y su substrato biológico (Davidson, 1999, Depue y Collins, 1999). Se ha intentado abordar el estudio de las diferencias individuales considerando que existen dimensiones o factores independientes de personalidad. Una de las dimensiones más estudiadas ha sido la ansiedad, que podría corresponder aproximadamente a lo que Eysenck denomina neuroticismo (Eysenck y Eysenck, 1987), Gray inhibición conductual (Gray y McNaughton, 2000) o Cloninger

evitación del daño (Cloninger, 1986). Por otra parte, se ha propuesto por parte de autores como Zuckerman o Cloninger otra dimensión de personalidad: la búsqueda de sensaciones o de novedad (*sensation/novelty seeking*) (Cloninger, 1987, Cloninger et al., 1993, Cloninger, 1994, Zuckerman y Kuhlman, 2000). Se ha definido la búsqueda de novedad como "la necesidad de sensaciones y experiencias variadas, nuevas y complejas, a pesar de posibles riesgos sociales y físicos" (Zuckerman, 1986). Los modelos actuales sobre la personalidad, como el llamado *Big Five* (Costa y McCrae, 1997, Funder, 1997, McCrae y Costa, 1997), incluyen dentro de la estructura de la personalidad la ansiedad y la búsqueda de sensaciones, rasgos que serán objeto de estudio en el presente trabajo (ver capítulo 5).

### **2.1.2.- Modelos de personalidad en humanos**

En los años 30 del siglo XX, Allport y Murray asientan las bases para el estudio de la personalidad en Psicología. Según Allport la personalidad se define como "la organización dinámica intraindividual de aquellos sistemas que determinan un ajuste único a su ambiente" (Allport y Odbert, 1936). En los años 40-50 se da una proliferación de las teorías estructuralistas y factorialistas, basadas en la concepción de la personalidad como estructuras de rasgos (ver más adelante), lo que provoca en los 50-60 un gran desarrollo de las pruebas psicométricas de personalidad como herramientas de trabajo. Estas posiciones fueron muy criticadas en los años 70 por el movimiento situacionista, que no compartía el concepto de rasgo, lo que provocó en los 80 la aparición del interaccionismo, una postura de síntesis entre posiciones más ambientalistas y las estructuralistas. A partir de los años 90 se ha dado una revitalización del estudio de la personalidad bajo el concepto de rasgo y actualmente la personalidad se define como aquellas características de la persona que dan cuenta de los patrones consistentes de sentir, pensar y actuar (Sánchez-Elvira y Paniagua, 2003). Estos patrones conductuales cumplen la función de adaptación al medio y por tanto muestran la manera habitual de afrontar las situaciones. Hoy en día las posiciones más aceptadas son las estructuralistas o factorialistas que basan la estructura de la personalidad en unidades disposicionales o rasgos.

El rasgo es la unidad fundamental de análisis que permite distinguir a los individuos entre sí desde una perspectiva descriptiva y estructural (Sánchez-Elvira y Paniagua, 2003). Los rasgos tienen un carácter subyacente, es decir, se infieren a partir de indicadores conductuales, y tienen carácter disposicional ya que no están activos en todo momento, sino que deben ser entendidos como disposiciones o tendencias latentes. Se manifestarán si la situación es relevante para un determinado rasgo. Por otro lado, los rasgos tienen un carácter general ya que se manifiestan en un amplio abanico conductual. Podremos afirmar que una determinada conducta es un buen indicador de un determinado rasgo en función de la estabilidad temporal y la consistencia transituacional de ésta. Otro aspecto importante en relación a la concepción de la personalidad a través de rasgos es el carácter dimensional que éstos tienen: los rasgos se

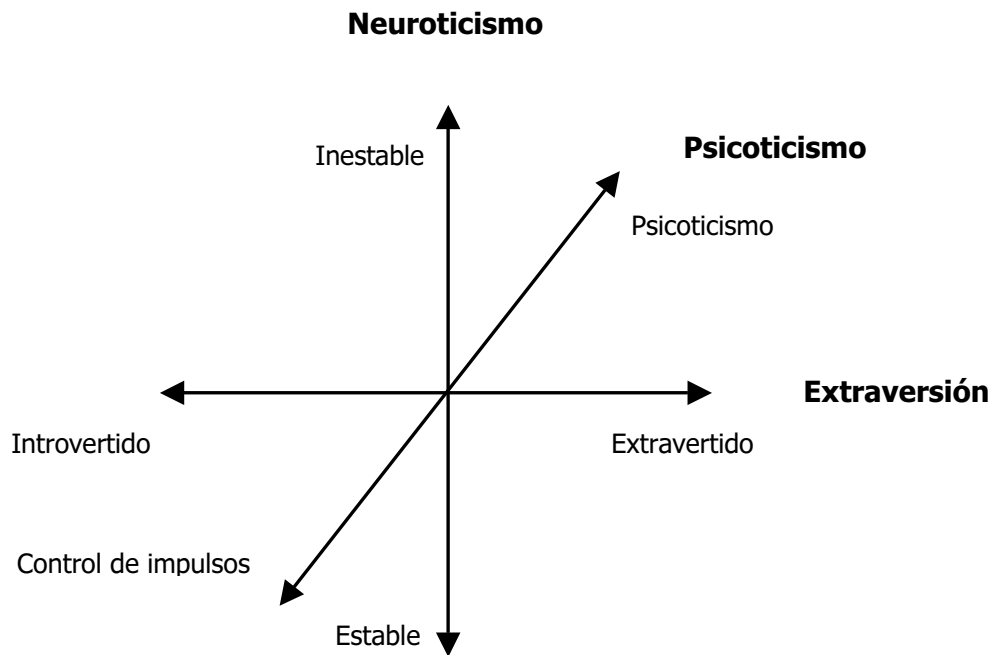
operativizan en dimensiones cuantitativas, por lo que podemos situar a un individuo con una determinada puntuación para un rasgo determinado. A mayor puntuación obtenida en un rasgo determinado, encontraremos una mayor probabilidad de ocurrencia y/o una mayor intensidad de la respuesta.

En cuanto a la naturaleza y el origen del rasgo encontramos diferentes posturas, que dependen de la orientación de los autores. Los modelos estructurales de Eysenck y Gray vienen precedidos por una orientación teórica previa, que marca el tipo de datos a los que se presta atención. A partir de concepciones previas, se intenta crear un modelo explicativo de la personalidad y posteriormente se contrasta mediante metodología correlacional. Los datos originales suelen provenir de la utilización de cuestionarios de personalidad que evalúan contenidos teóricos que se estiman de interés.

### Un modelo de tipos: el modelo de tres factores de Eysenck (Modelo PEN)

Ha sido la propuesta más influyente del siglo XX en cuanto a estructura de la personalidad. No sólo propone una estructura de personalidad, sino también un paradigma de cómo investigar en diferencias individuales. Propone que el estudio de las diferencias individuales ha de tener dos fases: una primera de tipo taxonómico y una posterior en la que se establezcan relaciones causales y explicativas. Para Eysenck la personalidad tiene, en gran parte, carácter innato (genético) y las diferencias individuales deben reflejarse en mecanismos fisiológicos y bioquímicos del sistema nervioso (Eysenck y Eysenck, 1987). A partir del análisis factorial, este autor propone tres dimensiones-tipo, de carácter continuo, supuestamente independientes (Figura 4):

- (1) **EXTRAVERSIÓN/INTROVERSIÓN:** incluye rasgos primarios como el grado de sociabilidad, actividad, vitalidad, asertividad, dominancia o búsqueda de sensaciones.
- (2) **NEUROTICISMO/ESTABILIDAD:** grado de activación y labilidad (estabilidad-inestabilidad) emocional, representada por rasgos primarios como la ansiedad y el estado de ánimo deprimido, sentimientos de culpa, baja autoestima, tensión o timidez, en el polo negativo de la dimensión (Neuroticismo).
- (3) **PSICOTICISMO/CONTROL DE IMPULSOS:** dimensión representativa del continuo normalidad-psicoticismo, centrada en rasgos relativos a la agresividad, egocentrismo, impulsividad, carácter antisocial, falta de empatía o frialdad de afectos, en la polaridad negativa.



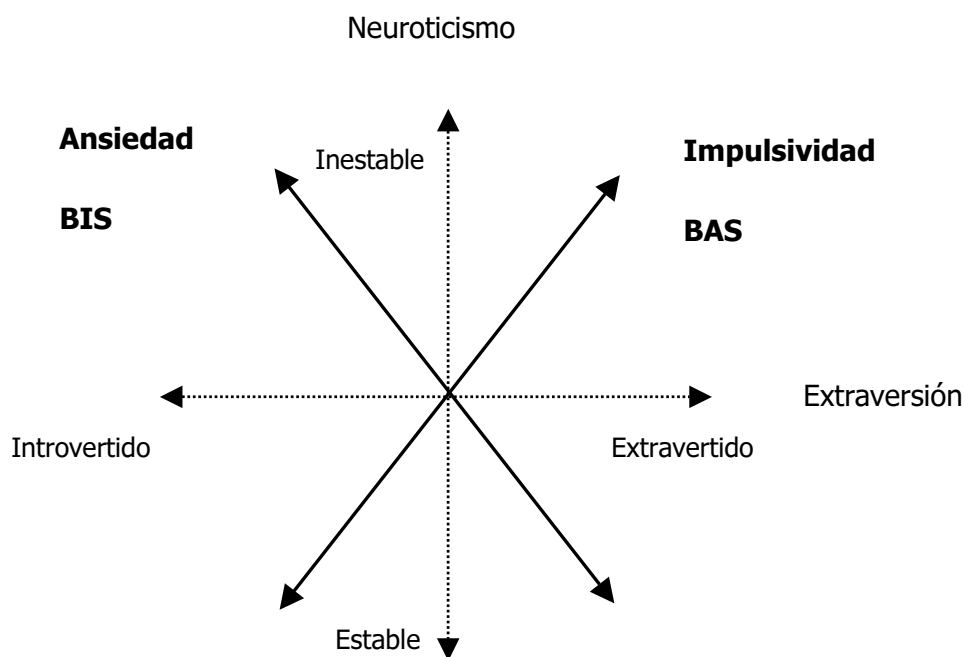
**Figura 4:** Esquema del modelo de tres factores de Eysenck. En negrita se presentan los nombres de las 3 dimensiones de personalidad que este autor propone. En los polos de cada uno de estas dimensiones se encuentran los adjetivos que describirían cada uno de los extremos.

#### Un modelo alternativo de dos factores: el modelo de Gray

Gray propone dos factores o dimensiones principales unipolares (Figura 5):

- (1) **ANSIEDAD:** es una dimensión resultante de la confluencia del polo Introversión y de la inestabilidad emocional (alto Neuroticismo según Eysenck).
- (2) **IMPULSIVIDAD:** surge de la confluencia de Extraversión y la inestabilidad emocional (alto Neuroticismo según Eysenck).

Gray propone dos sistemas opuestos de control en el SNC, que estarían en la base de dos posibles formas de comportamiento del organismo (Gray y McNaughton, 2000). Cada uno de estos sistemas se constituiría en el mecanismo biológico subyacente a cada una de las dos dimensiones del temperamento propuestas: (i) Sistema de Activación Conductual (BAS: *Behavioral Activation System*), responsable de las conductas de aproximación y fundamento biológico de la impulsividad y la susceptibilidad al refuerzo positivo; y (ii) Sistema de Inhibición Conductual (BIS: *Behavioral Inhibition System*), responsable de las conductas de evitación y fundamento biológico de la ansiedad y la susceptibilidad al castigo.



**Figura 5:** Esquema del modelo de dos factores de Gray. En negrita se presentan los nombres de las dimensiones de personalidad que este autor propone.

Un modelo comprehensivo de factores: el modelo de los cinco grandes (McCrae y Costa)

Se trata de un modelo comprehensivo, de origen léxico. Es decir, a partir de la búsqueda de adjetivos y participios que puedan describir personas se lleva a cabo una selección de descriptores (diccionario), una depuración y reducción de términos y, a partir de una muestra de sujetos se realizan autoinformes, cuestionarios o informes de terceras personas para realizar, por último, un análisis factorial.

Se le conoce por su acrónimo como el OCEAN de la personalidad, por su carácter amplio y descriptivo de la personalidad y en base a las siglas de los factores propuestos (Funder, 1997):

- (1) OPENNESS (apertura a la experiencia): evalúa la búsqueda activa y aprecio por la experiencia, la tolerancia y la exploración de lo no familiar;
- (2) CONCIENIOUSNESS (voluntad o minuciosidad): evalúa el grado de organización, persistencia y motivación para la conducta dirigida a metas. Diferencia a las personas serias, formales, exigentes, con aquellas que no se consideran formales, descuidadas, indiferentes, y poco rigurosas;
- (3) EXTRAVERSIÓN: evalúa la cantidad e intensidad de las interacciones interpersonales, el nivel de actividad, la necesidad de estimulación y la capacidad para el disfrute;

- (4) AGREEABLENESS (sensibilidad a las relaciones interpersonales): evalúa la calidad de la orientación interpersonal a lo largo de un continuo que va desde la compasión hasta el antagonismo (oposicionismo) en los pensamientos, los sentimientos y las conductas;
- (5) NEUROTICISMO: evalúa el ajuste o la inestabilidad emocional. Identifica a individuos con tendencia al malestar psicológico, ideas irreales, excesiva vehemencia o ansiedad y respuestas de afrontamiento desadaptativas.

La solución factorial propuesta, además de haber sido contrastada por diferentes métodos (léxico, cuestionarios) también lo ha sido por diferentes métodos de extracción y rotación factoriales, habiéndose validado en diferentes idiomas (McCrae y Costa, 1997).

## **2.2.- Concepto de emoción y su relación con la respuesta al estrés**

Considerando que la exposición a situaciones de estrés va acompañada en la naturaleza de alteraciones emocionales, las diferencias individuales en la emotividad son de especial interés en el presente trabajo. Las emociones se pueden considerar estados causados por estímulos interoceptivos o exteroceptivos que se reflejan en una experiencia subjetiva (sentimientos) y en cambios tanto fisiológicos como conductuales. La posible relación causal entre la experiencia subjetiva y las respuestas observables frente a estímulos emocionales, así como la dirección de esta causalidad, sigue siendo una cuestión controvertida hoy en día. Aunque no existe una taxonomía universalmente aceptada de los distintos tipos de emociones, sí suele distinguirse entre las de valencia positiva o negativa. Para algunos autores, las emociones negativas serían las resultantes de la presentación (o la probabilidad de presentación) de un estímulo aversivo (v.g. miedo) o, también, de la omisión de un refuerzo positivo esperado (frustración). Por el contrario, las emociones positivas serían el resultado de la presentación de un refuerzo positivo o la eliminación de un estímulo aversivo (Domjan y Burkhanrd, 1993).

La emotividad puede considerarse como una característica individual, relativamente estable en el tiempo, que definiría cuan intensa es la reacción de un sujeto frente a situaciones emocionales. Implícitamente estamos asumiendo que un sujeto clasificado como de alta emotividad reaccionará claramente a estímulos emocionales, independientemente de las características de la emoción provocada por el estímulo o situación. Sin embargo, se asume también que la reactividad a emociones positivas o negativas puede estar disociada, por lo que sería más adecuado indicar a qué tipo de situación emocional nos referimos cuando estamos hablando de emotividad.

Los conceptos de emotividad y reactividad emocional están muy relacionados, ya que inferimos diferencias en la emotividad en función de la evaluación de la respuesta a la situación. Sin embargo, debemos tener en cuenta una serie de consideraciones. En primer lugar, todas las



situaciones emocionales negativas provocan una serie de respuestas conductuales y fisiológicas, y es importante conocer si este repertorio de respuestas es dependiente o no del tipo de situación estudiada. En segundo lugar, la respuesta emocional a una situación en particular está enormemente influida por el procesamiento cognitivo de la situación (*appraisal*) y por las estrategias de afrontamiento (*coping styles*), es decir, por el repertorio conductual utilizado por el sujeto para escapar de la fuente de experiencias aversivas o para reducir el impacto de la situación. Se considera como estrategia de afrontamiento una serie de respuestas coherentes de tipo conductual o fisiológico que el sujeto desarrolla en respuesta a estímulos aversivos (Koolhaas et al., 1999). Se han definido dos tipos de estrategias de afrontamiento: las proactivas (o activas) y las reactivas (o pasivas), caracterizadas por la utilización de estrategias activas o pasivas, respectivamente, para afrontar la situación. Algunos autores consideran que las estrategias de afrontamiento serían una dimensión de personalidad independiente de la ansiedad (Steimer et al., 1997, Koolhaas et al., 1999), pero no conviene olvidar que las estrategias de afrontamiento pueden influir en el éxito para resolver una determinada situación y, por lo tanto, aunque indirectamente, pueden modificar las respuestas tanto conductuales como fisiológicas a la situación.

La medida en la que la emotividad es un concepto unitario o multifactorial es otro punto importante a tener en cuenta. Sobre la base del estudio de las respuestas conductuales y fisiológicas a estímulos emocionales, se podría concluir que la respuesta emocional es claramente multifactorial, ya que ni la respuesta conductual ni la fisiológica (ambas presuntamente relacionadas con este concepto), siguen un patrón uniforme cuando se comparan diferentes cepas de ratas o ratones (Trullas y Skolnick, 1993, Armario et al., 1995, Ramos et al., 1997). Estos datos y otros muchos de la literatura sugieren que es difícil concluir que un sujeto es más reactivo emocionalmente que otros a una situación particular, dado que las conclusiones dependen de la variable particular que se utilice como índice de reactividad emocional. Para ilustrar el problema comentaremos los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con estudiantes de Medicina en respuesta a dos exámenes que generaban un nivel diferente de ansiedad (Armario et al., 1996). Como era de esperar, ambos exámenes generaron un nivel diferente de ansiedad subjetiva y las tres variables fisiológicas evaluadas (glucosa, cortisol y prolactina) se incrementaron con las situaciones de estrés, siguiendo un patrón relativamente similar, aunque la prolactina fue la más sensible a la intensidad de la situación. Pero, sorprendentemente, sólo se observó una correlación significativa entre los niveles de ansiedad subjetiva y los de glucosa. Por lo tanto, a pesar de un comportamiento bastante similar, en términos de media, entre la ansiedad subjetiva y la prolactina, no se observó ninguna correlación entre ambas variables. De nuevo, la conclusión más obvia es que la emotividad es un concepto complejo y multifactorial (Ramos et al., 1997, Ramos y Mormède, 1998), aunque queda por explicar por qué aparece la disociación entre variables que todas ellas responden a las situaciones emocionales. Una posible explicación es que las vías nerviosas que

conducen a las distintas respuestas, aunque puedan inicialmente tener aspectos en común, van procesándose paralelamente en circuitos diferentes, lo que lleva a respuestas finales que correlacionan poco entre sí. Si esto es así, es siempre conveniente evaluar la reactividad emocional estudiando simultáneamente varias variables, siendo los datos fácilmente interpretables cuando todas ellas van en la misma dirección.

### **2.3.- Variables de personalidad en humanos y eje HPA**

El estudio de las diferencias individuales es especialmente relevante para explicar por qué un mismo estímulo puede provocar diferentes respuestas en diferentes individuos. Concretamente, en relación a las emociones, por qué un mismo estímulo estresante puede provocar una amplia gama de respuestas fisiológicas y/o conductuales en los individuos (Frijda, 1986, Ekman y Davidson, 1994, Scherer, 1999).

Se asume que ciertos factores de personalidad, como los propuestos por los diferentes modelos anteriormente explicados, pueden predisponer al estrés o modular la respuesta ante situaciones estresantes (Schommer et al., 1999, Lesch, 2001). En general, sin embargo, los resultados son confusos, incluyendo aquellos centrados en el eje HPA. Una de las posibles razones es hasta qué punto la actividad basal del eje HPA o la respuesta a determinados fármacos puede estar relacionada con la reactividad del eje HPA al estrés. Otra es que los estudios en poblaciones psiquiátricas pueden dar lugar a una información muy distinta de la que nos puede aportar el estudio de poblaciones normales. Pero incluso centrándonos en los estudios de reactividad del eje HPA a situaciones de estrés en poblaciones normales, los datos también son contradictorios, a pesar de la amplia aceptación de la idea de que la ansiedad como rasgo está muy relacionada con las respuestas de estrés (Landgraf et al., 1999).

Algunos de los estudios en humanos han valorado el rasgo más general de neuroticismo, mientras que otros han valorado más específicamente la ansiedad. Pero en ambos casos, los resultados son controvertidos. Por ejemplo, se ha descrito una relación nula (Schommer et al., 1999) o incluso negativa (McCleery y Goodwin, 2001) entre neuroticismo y respuesta del cortisol al estrés. Igualmente, respecto a la ansiedad se ha descrito una relación positiva (van Eck et al., 1996), nula (Takahashi et al., 2005) o, de forma más consistente, negativa (Jezova et al., 2004, Hubert y de Jong-Meyer, 1992, Salmon et., 1989).

Otros autores han estudiado la relación entre personalidad y reactividad del eje HPA desde las teorías de Cloninger y Zuckerman, si bien en el único estudio realizado hasta el momento en poblaciones normales no se ha encontrado relación alguna (Gerra et al., 1999).

## 2.4.- Estudios de las bases biológicas de las diferencias individuales en animales

### 2.4.1. Problemas metodológicos

La existencia de amplias diferencias en humanos en la respuesta a las situaciones emocionales es un hecho ampliamente aceptado que queda reflejado en las diversas teorías de la personalidad. Sin embargo, mucho más complejo es el estudio del posible substrato neurobiológico de estas diferencias. Teniendo en cuenta que el substrato nervioso que regula la respuesta fisiológica y conductual a las emociones es en gran parte común a todos los mamíferos, el estudio en profundidad del substrato neurobiológico de las emociones parece factible utilizando modelos animales. Estos modelos pueden aportar información acerca de la relación entre determinados aspectos biológicos y rasgos conductuales, tanto en una población normal como en líneas seleccionadas genéticamente que pueden mostrar rasgos conductuales análogos a los observados en determinadas psicopatologías, como los trastornos de ansiedad. Es importante destacar que la información aportada por el estudio de algunos modelos animales de psicopatología, por ejemplo de ansiedad, puede ser relevante para explicar el rango normal de variabilidad de la ansiedad, pero también es posible que los datos no sean extrapolables.

Por otro lado, cuando se estudia la relación entre conducta (comportamiento emocional) y variables biológicas, es importante ser consciente de los problemas metodológicos que pueden conducir a hipótesis erróneas. Este problema es particularmente importante cuando comparamos cepas de animales seleccionados genéticamente. Durante el proceso de selección genética que puede conducir por ejemplo a la obtención de líneas de animales con un alto o bajo nivel de ansiedad, se va reduciendo la variabilidad genética de forma parcial (y por lo tanto seguimos teniendo animales *outbred*) o bien de forma total (consanguíneos, *inbred*). Si el control de la ansiedad es poligénico, con un determinado número de genes implicados en las diferencias individuales en ansiedad (Lesch, 2001) y lo mismo cabe asumir de la respuesta del eje HPA al estrés, el proceso de selección para crear líneas de alta o baja ansiedad habrá conducido a reducir o abolir totalmente (si son consanguíneas) la variabilidad genética dentro de cada una de las líneas. Aunque el criterio de selección haya sido el nivel de ansiedad, también se habrán seleccionado al azar determinados alelos (uno solo de cada uno de los genes, si son consanguíneas) del conjunto de genes que regulan la reactividad del eje HPA. Por consiguiente, si la relación entre ansiedad y reactividad del eje HPA al estrés no es muy estrecha, cuando se pretenda estudiar si las diferencias de ansiedad entre las dos líneas están relacionadas con una reactividad diferencial del eje HPA al estrés, pueden obtenerse todo tipo de resultados, consecuencia de la selección al azar de las variantes alélicas de los genes que controlan el eje HPA.

Cuando el interés se centra en la psicopatología, el primer aspecto relevante para el estudio de su substrato biológico es disponer de un buen modelo animal capaz de captar sus síntomas esenciales. El término endofenotipo (Bakshi y Kalin, 2002) hace referencia a una serie de síntomas que incluyen aspectos genéticos, conductuales, fisiológicos y neuroendocrinos que acompañan un proceso básico que está alterado en relación a la patología objeto de estudio. Por ejemplo, un endofenotipo ansioso debería mostrar aspectos esenciales de la ansiedad y aspectos relacionados con la patología ansiosa, como estrategias particulares de afrontamiento del estrés o reacciones neuroendocrinas concomitantes con la ansiedad. Por lo tanto, estudiando detalladamente este endofenotipo ansioso, sería posible encontrar los correlatos genéticos y neurobiológicos subyacentes al desarrollo y expresión de la psicopatología ansiosa. Es por lo tanto muy útil la generación de modelos animales que mimeticen diferentes grupos de síntomas. En general, un modelo animal particular puede capturar un síntoma o mecanismo específico que formaría parte de la psicopatología, pero no modelar otros procesos o funciones anormales en los pacientes estudiados. Si el síntoma específico contribuye a la patología, la identificación y caracterización de los correlatos asociados con este síntoma puede ser muy prometedora, ya que probablemente estará influida por un número pequeño de genes, mientras que el síndrome completo estaría causado por un número mayor (Lesch, 2001, Bakshi y Kalin, 2002). Por lo tanto, la generación y establecimiento de diferentes endofenotipos de una psicopatología particular podría sentar las bases para el estudio de los correlatos neurobiológicos y genéticos de esos procesos parciales y así poder identificar los mecanismos implicados en una determinada enfermedad (Landgraf y Wigger, 2003).

Habitualmente, este tipo de investigaciones se ha llevado a cabo utilizando cepas de animales seleccionadas genéticamente en función de una determinada conducta, lo que permite centrarse en endofenotipos extremos que modelan la patología mostrando de manera innata determinados síntomas esenciales relacionados con el diagnóstico clínico. Sin embargo, para el estudio de los factores relacionados con niveles más normales del rasgo (ansiedad) puede ser preferible el uso de poblaciones de animales no seleccionadas genéticamente. Es evidente que ambas aproximaciones tienen sus ventajas y desventajas (ver Tabla 1) y la elección de una de ellas no invalida la otra, sino que se pueden considerar como aproximaciones paralelas e igualmente válidas en el estudio de las bases neurobiológicas de determinadas funciones. La utilización de cepas de animales seleccionados genéticamente nos procura fenotipos extremos y claramente definidos, lo que suele venir acompañado de resultados más claros y reproducibles. Además, la escasa o poca variabilidad genética de estos animales puede ser útil para caracterizar algunos de los genes que pueden estar implicados en la función o proceso objeto de estudio, pero puede descartar otros potencialmente importantes.

Este tipo de problemas se pueden solucionar si realizamos nuestros estudios utilizando poblaciones de animales "normales" o *outbred* no seleccionados genéticamente, ya que

presentan una alta variabilidad genética y muestran una variedad de alelos representativos de la población total. Sin embargo, de este hecho surgen otro tipo de problemas. Esta alta variabilidad genética se traduce también en un alta variabilidad fenotípica así como posibles variaciones entre experimentos, haciéndose necesario la replicación de los datos obtenidos. Indirectamente, por tanto, aumentará el número de animales con los que trabajar, con las consecuencias éticas y prácticas que ello comporta. En el presente trabajo hemos optado por la aproximación metodológica de estudios con animales *outbred* no seleccionados genéticamente.

Un ejemplo que ilustra el problema de las cepas consanguíneas es el de las cepas de ratas histocompatibles Fischer y Lewis. Estas son las dos cepas de animales que más consistentemente han mostrado una respuesta alterada del eje HPA ante situaciones estresantes, las ratas Fischer incrementada y las Lewis reducida (Sternberg et al., 1989, Dhabhar et al., 1993, Armario et al., 1995). Se ha descrito que las ratas Fischer, tanto machos como hembras, muestran un aumento de la síntesis de CRF en el PVN tras la exposición a una situación estresante (inmune, inflamatoria o emocional) (Sternberg et al., 1989, Dhabhar et al., 1993, Stohr et al., 2000), produciendo una mayor y más prolongada liberación de ACTH y corticosterona (Armario et al., 1995, Marti y Armario, 1996, Grota et al., 1997, Jongen-Relo et al., 2002). Además de mostrar una respuesta alterada al estrés, estas cepas de ratas muestran también diferencias en cuanto al ritmo circadiano del eje HPA: las ratas Fischer macho muestran mayores niveles de corticosterona en plasma durante la fase nocturna mientras que no se encuentran diferencias en los periodos en los que los niveles de corticosterona son bajos (Dhabhar et al., 1993, Ortiz et al., 1995); en cuanto a las hembras, las ratas Lewis muestran una variación circadiana más pronunciada mientras que las Fischer mantienen niveles basales altos de corticosterona a lo largo de todo el periodo de luz (Smith et al., 1992, Windle et al., 1998). Estas diferencias no se explican por alteraciones en la expresión de mRNA para los MR en la formación hipocampal, ni por diferencias en la expresión de GR en el PVN, pero parecen estar asociadas a diferencias en la expresión de mRNA de los GR en el giro dentado (GD) y en las diferentes regiones del CA de la parte rostral de la formación hipocampal (Jongen-Relo et al., 2002). Por otro lado, se ha descrito también que las ratas Fischer, además de mostrar una mayor y más prolongada liberación de glucocorticoides tras un estrés agudo, se caracterizan también por una capacidad de adaptación reducida en un protocolo de estrés repetido, cuando se les comparaba con las ratas Lewis, o las Sprague-Dawley (Dhabhar et al., 1997). Aunque las ratas Fischer muestran menor conducta exploratoria y más conductas relacionadas con la ansiedad (Martí y Armario, 1996, Rex et al., 1999), la relación entre conducta y eje HPA puede ser irrelevante, por los problemas ya comentados con las cepas consanguíneas.

**Tabla 1: Ventajas y desventajas de la utilización de cepas seleccionadas genéticamente versus poblaciones *outbred*.**

	<b>Cepas seleccionadas</b>	<b>Poblaciones <i>outbred</i></b>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Poca o nula variabilidad</li> <li>▪ Fenotipos bien definidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alta variabilidad genética</li> <li>▪ Presencia de una gran parte de los alelos representativos de la población total</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Selección aleatoria y desconocida de cada uno de los alelos relacionados con el proceso objeto de estudio</li> <li>▪ Relaciones espurias entre diferentes tipos de funciones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fenotipos variables</li> <li>▪ Alta variabilidad entre experimentos</li> <li>▪ Necesidad de un mayor número de animales</li> </ul>

#### **2.4.2.- El origen de las diferencias individuales en relación a la emotividad**

Aunque existen pruebas de la contribución de factores genéticos para explicar las diferencias individuales en emotividad o en la reactividad del eje HPA al estrés, también se ha estudiado en las últimas décadas la contribución de factores ambientales. En este sentido, se ha prestado especial atención a la etapa post-natal y a la contribución del comportamiento materno. Así, está relativamente bien establecido que la exposición de los animales de laboratorio a diferentes tipos de manipulaciones durante la etapa post-natal puede inducir alteraciones en el SNC y en la conducta, muchas de las cuales pueden persistir en la etapa adulta (Meaney et al., 1996, Fernandez-Teruel et al., 2002). Entre todos estos cambios, los más relevantes incluyen la modificación de las conductas relacionadas con la ansiedad y la alteración de la respuesta del eje HPA al estrés. La dirección exacta de estos cambios (incrementos o disminuciones) en la ansiedad o en la respuesta del eje HPA depende de la naturaleza de la manipulación que el animal recibe durante las primeras etapas de su vida (Meaney et al., 1996, Liu et al., 1997). Se ha demostrado que tanto la manipulación (*handling*) post-natal como el nivel de cuidados maternos causan una reducción de la respuesta al estrés del eje HPA en la etapa adulta. Por el contrario, la exposición a situaciones estresantes en la etapa post-natal, como la privación materna, traumas físicos o administración de endotoxina, la aumentan (Meaney et al., 1996).

De hecho, es de destacar que uno de los mecanismos a través del cuál el *handling* post-natal ejerce un efecto beneficioso sería acentuando la conducta materna de cuidado de las crías (Liu

et al., 1997). Se ha descrito que tanto el *handling* post-natal como un alto nivel de conducta maternal inducen, durante la etapa adulta, una reducción de la expresión basal del gen para el CRF en el núcleo PVN del hipotálamo, así como un descenso de los niveles de CRF y AVP en la eminencia media, en concordancia con la ya comentada reducción de la reactividad periférica del eje HPA al estrés. Por el contrario, situaciones estresantes en las primeras etapas de la vida del animal inducen durante la etapa adulta un aumento en la expresión basal del gen del CRF en el PVN y, a menudo, en el de la AVP, en concordancia con la respuesta aumentada del eje HPA en respuesta al estrés (Meaney et al., 1996). Las alteraciones en la expresión génica a nivel del PVN estarían parcialmente relacionadas con la regulación diferencial de la expresión de GR en la formación hipocampal, observándose habitualmente una relación inversa entre los niveles de receptores GR en esta zona y la magnitud de la respuesta del eje HPA al estrés (Meaney et al., 1996).

### **2.4.3.- Valoración de los rasgos conductuales de interés**

Cuando se expone una rata (o ratón) a un ambiente nuevo, que constituye una situación potencialmente peligrosa, el animal puede experimentar miedo innato a este ambiente nuevo, en especial si es un espacio abierto y desprotegido. Pero los mamíferos poseen también una tendencia innata a explorar ambientes nuevos (curiosidad), que se podría relacionar con las ventajas evolutivas de explorar nuevos ambientes y encontrar nuevas fuentes de alimento. Por ello, se genera un conflicto entre ambas tendencias que se traduce en ansiedad. Sin embargo, el miedo y la ansiedad no es el único factor a considerar para explicar el comportamiento en ambientes nuevos. Otro factor potencialmente importante en estas situaciones es el desarrollo de estrategias activas o pasivas frente a la situación. Por lo tanto, la actividad en un ambiente nuevo sería el resultado de la interacción de diferentes factores subyacentes.

La aproximación general a la caracterización de estos factores subyacentes o rasgos de "personalidad" en animales se ha realizado clásicamente mediante análisis correlacionales y factoriales del repertorio conductual de éstos. La validez de algunos de estos rasgos viene apoyada por estudios farmacológicos. Por ejemplo, muchos análisis factoriales de la conducta en ambientes nuevos, como la tabla de agujeros o el laberinto elevado en cruz, han proporcionado consistentemente dos factores: uno relacionado con la actividad/exploración y otro con el miedo/ansiedad. Aunque si nos detenemos en la revisión de la literatura, el significado del concepto de actividad no está bien definido. Algunos autores la consideran como un factor con poco significado etológico, solamente relevante en el sentido que podría estar influyendo inespecíficamente determinados comportamientos. Sin embargo, este factor podría estar reflejando una característica importante del repertorio conductual del animal, como la tendencia a explorar, o también, la tendencia a afrontar activa o pasivamente las diferentes situaciones, lo que sería de gran relevancia en relación a la susceptibilidad a desarrollar síntomas relacionados con la depresión. Diversos estudios indican que la ansiedad y la

exploración/actividad en ambientes nuevos, representan dos dimensiones independientes del concepto más global de emotividad (Ramos et al., 1997, Ramos et al., 1998).

Existe una amplia gama de modelos animales para estudiar la ansiedad (Ohl et al., 2001) que incluyen tanto pruebas de conducta abierta (laberinto elevado en cruz, interacción social, transiciones entre zonas iluminadas y oscuras) como pruebas de conducta controlada por programa (conflicto, castigo, discriminación o extinción). Todas ellas han sido utilizadas para validar la potencia ansiolítica o ansiogénica de fármacos y estudiar el substrato neurobiológico de la ansiedad. El laberinto elevado en cruz es una de las pruebas más ampliamente aceptadas y utilizadas como medida de ansiedad (Pellow y File, 1986). En esta prueba, el animal puede deambular libremente por un laberinto, normalmente elevado unos 50 cm del suelo, que consta de dos brazos protegidos por paredes (brazos cerrados) o por dos brazos desprotegidos (brazos abiertos). La exploración en los brazos abiertos se considera un índice de ansiedad y se ha medido teniendo en cuenta el porcentaje de entradas en los brazos abiertos respecto a las entradas en los cerrados o en todos los brazos, y, más frecuentemente, mediante el porcentaje de tiempo transcurrido en los brazos abiertos respecto al transcurrido en los cerrados o el total. Sin embargo, otros autores utilizan los valores directos del tiempo en los brazos abiertos como medida de ansiedad. La idea de calcular el porcentaje es corregir por posibles diferencias (individuales o generadas por la administración de fármacos) en la actividad motora. En general, estas medidas son sensibles tanto a tratamientos ansiolíticos como ansiogénicos (Pellow et al., 1985). Se asume que el nivel de ansiedad determinará si el animal preferirá o no los brazos cerrados a los abiertos del laberinto. Se ha demostrado, mediante la determinación de los niveles de corticosterona en plasma, que los brazos abiertos son más estresantes que los cerrados y el factor crítico para esta diferencia es la falta de protección de los brazos abiertos (Pellow y File, 1986).

La actividad/exploración de ambientes nuevos podría considerarse como un análogo de la dimensión de personalidad humana de búsqueda de novedad (Bardo et al., 1996, Dellu et al., 1996b). En ratas, este rasgo se ha evaluado valorando tanto la actividad forzada desplegada por el animal en un ambiente del que no puede escapar, como la actividad voluntaria, en cuyo caso el animal puede "escoger" entre un ambiente nuevo y otro familiar (Bardo et al., 1996). El concepto subyacente a esta dimensión es el grado de interés de los animales por estímulos nuevos, incluyendo ambientes nuevos, objetos o experiencias.



#### **2.4.4. Relación entre ansiedad y eje HPA**

En el estudio de la relación entre el rasgo de ansiedad y la actividad del eje HPA cabe destacar el uso de cepas de ratas seleccionadas genéticamente, que permite comparar los dos polos opuestos de un mismo rasgo. A continuación resumimos los principales datos en referencia a algunas de las líneas seleccionadas genéticamente en función de diversos criterios.

##### Selección en función del nivel de defecación en un campo abierto

En las primeras líneas de ratas seleccionadas genéticamente respecto a la emotividad se usó el criterio de la defecación en un campo abierto y dio lugar a la caracterización de animales con alto nivel de defecación (*Maudsley reactive*: MR) o bajo nivel (*Maudsley non reactive*: MNR) (Broadhurst, 1975). Esta selección también dio lugar a diferencias de actividad en el campo abierto, siendo las ratas MR menos activas que las MNR. Por lo tanto, los animales más emotivos se caracterizarían por menores niveles de exploración/actividad en un ambiente nuevo con propiedades estresantes (Broadhurst, 1975). Sin embargo, pronto se hizo evidente que la relación entre el grado de defecación y la actividad en el campo abierto no era tan robusta como se había pensado en un principio y que las dos líneas no diferían consistentemente en pruebas de ansiedad. Por ejemplo, con el laberinto elevado en cruz se han observado diferencias en el sentido esperado en algunos estudios (Broadhurst, 1975, Commissaris et al., 1986, Beardslee et al., 1989), pero no en otros (Paterson et al., 2001). La alta consistencia en las diferencias en la defecación de estos animales sugiere que el nivel de defecación no está estrechamente relacionado con otras medidas de ansiedad. Desafortunadamente, sólo existe un estudio en el que se haya evaluado la actividad del eje HPA en respuesta al estrés en estas dos cepas: Abel y colaboradores (1991) no observaron diferencias en los niveles plasmáticos de corticosterona tras 10 minutos de exposición a un campo abierto o tras la prueba de natación forzada (no se determinaron los niveles de ACTH).

##### Selección de ratas en función de su comportamiento en el laberinto elevado en cruz

Esta selección realizada por el laboratorio de Landgraf ha dado origen a las líneas de ratas de alta ansiedad (*high anxiety-related behavior*, HAB) o baja ansiedad (*low anxiety-related behavior*, LAB), mostrando las primeras niveles bajos de exploración de los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Liebsch et al., 1998b). Confirmando que las dos líneas difieren en ansiedad, en la prueba de luz-oscuridad las ratas HAB pasan menos tiempo en la zona iluminada y realizan un menor número de transiciones (Henniger et al., 2000). Sin embargo, es importante destacar que estas líneas difieren también en otros parámetros diferentes de la ansiedad: (i) los animales LAB son más activos durante una exposición de 20 minutos a un campo abierto (Liebsch et al., 1998a) o durante la prueba de luz-oscuridad (Henniger et al., 2000); (ii) los animales LAB se muestran más activos que los LAB en la prueba de natación forzada (Liebsch et al., 1998a, Liebsch et al., 1998b) y en la de interacción social (Henniger et

al., 2000), y además, emiten un menor número de vocalizaciones y desarrollan menos conductas de congelamiento (*freezing*) tras derrota social (Frank et al., 2006). Todos estos datos sugieren que los animales HAB además de ser más ansiosos, mostrarían también estrategias de afrontamiento pasivas.

Los animales HAB muestran mayores niveles de ACTH y corticosterona que los LAB en respuesta a situaciones estresantes de intensidad moderada, como la exposición forzada a los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Landgraf et al., 1999, Salome et al., 2004) pero no cuando la exploración se puede producir libremente por todos los brazos del laberinto (Liebsch et al., 1998a). Sorprendentemente, en un trabajo reciente se ha observado que los animales HAB mostraban menores niveles de ACTH y corticosterona tras un estrés por derrota social (Frank et al., 2006), por lo que no podemos obtener un perfil claro de la relación entre ansiedad y reactividad del eje HPA al estrés. En cualquier caso, estos datos reafirman la importancia del estímulo estresante utilizado.

#### Selección en función del número de evitaciones

Se han seleccionado genéticamente diferentes cepas de ratas en base a su comportamiento en tareas de evitación activa en una caja lanzadera (*shuttle box*), utilizando choques eléctricos en las patas como estímulo aversivo. Existen evidencias de que las diferencias de comportamiento en la caja lanzadera son fundamentalmente debidas a la ansiedad, siendo más ansiosos aquellos animales que evitan en menor número los choques. Parece que las conductas de *freezing* que manifiestan estos animales interfieren con la conducta activa de saltar hacia el otro compartimento de la jaula para evitar el choque (ver para revisión Steimer y Driscoll, 2003). De hecho, otros estudios demuestran que los fármacos ansiolíticos mejoran la ejecución inicial de una tarea de evitación activa en dos sentidos (Fernandez-Teruel et al., 1991). Las diferencias entre las ratas Romanas de alta evitación (*Roman high avoidance*, RHA) y las Romanas de baja evitación (*Roman low avoidance*, RLA) en pruebas de evitación se han observado consistentemente en diferentes sublíneas, incluyendo las *inbred* (Escorihuela et al., 1999). La mayoría de los resultados que vamos a describir a continuación en cuanto a datos conductuales y endocrinos se refieren a trabajos realizados en la sublínea suiza (RHA/Verh, RLA/Verh). En los primeros estudios con estas líneas ya se observó que las mismas no sólo diferían en su comportamiento de evitación, sino también en sus niveles de ansiedad, medidos en otras pruebas de conducta (Gentsch et al., 1982, Fernández-Teruel et al., 1992, Castanon y Mormède, 1994, Escorihuela et al., 1999), aunque también se han encontrado inconsistencias (Chaouloff et al., 1994). Por otro lado, las líneas no sólo difieren en ansiedad, ya que los animales RHA se caracterizan por unas estrategias de afrontamiento activo y unos mayores niveles de búsqueda de novedad (Gentsch et al., 1982, Brush, 1991, Fernández-Teruel et al., 1992, Castanon et al., 1995, Escorihuela et al., 1999).

En cuanto a la reactividad del eje HPA existen algunas discrepancias en los resultados, que se han intentado explicar por la edad en la que fueron evaluados (Castanon et al., 1994). Por esta razón, nos referiremos a la edad en cada uno de los siguientes experimentos. Gentsch y colaboradores (1982) mostraron por primera vez que las ratas RLA, de 6 meses de edad, tenían una mayor respuesta de ACTH a ambientes nuevos, pero no a otros estímulos más severos (éter, inmovilización en tubo y choque eléctrico en las patas). De la misma manera, los niveles de corticosterona eran también mayores tras una inyección intraperitoneal y tras la exposición a varios ambientes nuevos, pero no tras estímulos estresantes más intensos. Por otro lado, Walker y colaboradores (1989) han llevado a cabo una de las más completas caracterizaciones del eje HPA en estos animales. Encontraron: (i) un mayor peso de la adrenal en las RHA en comparación con las RLA, aunque los resultados son difíciles de interpretar porque no se describió el peso corporal de los animales; (ii) mayores niveles basales de ACTH en los animales RHA, sin diferencias en la corticosterona; (iii) ninguna diferencia en los niveles de ACTH tras 10 minutos de exposición a un ambiente nuevo o a éter, acompañados de unos menores niveles de corticosterona en las RHA (Walker et al., 1989). Estos resultados se deben analizar con precaución ya que estas diferencias basales en los niveles de ACTH entre líneas no se han vuelto a replicar y por otro lado, la respuesta de la ACTH a una administración de CRF exógeno se ha encontrado reducida en lugar de incrementada en las ratas RHA. Por otro lado, los animales RHA mostraron mayores niveles de GR en la hipófisis y de MR en la formación hipocampal. Los niveles elevados de GR en la hipófisis podrían explicar la respuesta reducida de la ACTH a la administración de CRF, mientras que los mayores niveles de MR en la formación hipocampal se hubiese esperado que redujeran la respuesta de ACTH al estrés, efecto que no se observó en términos absolutos.

Castanon y colaboradores (1992), utilizando ratas de 11 semanas de edad de la sublínea suiza criadas en su propio laboratorio describieron que no existían diferencias en la respuesta de ACTH y corticosterona tras la exposición a un ambiente nuevo durante 10 minutos, aunque sí que encontraron diferencias en la prolactina. Tampoco encontraron cambios en la respuesta de las hormonas del eje HPA a la administración de una dosis relativamente alta de CRF, aunque sí que replicaron las diferencias en cuanto a la conducta de evitación. Además, los animales RHA se mostraron más activos durante una exposición de dos horas a un corredor circular, sugiriendo que estos animales difieren también en cuanto al rasgo de búsqueda de novedad. En un estudio posterior, el mismo laboratorio describió una mayor respuesta de ACTH de los animales RLA a 10 minutos de exposición a un ambiente nuevo cuando éstos tenían 20, 26 y 42 semanas de edad, pero no a las 14 semanas, sugiriendo que estas diferencias podrían aparecer con la edad (Castanon et al., 1994). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona en ninguno de los casos. Por el contrario, Aubry y colaboradores (1995) han observado que los animales RLA de 4-5 meses de edad mostraban mayores niveles de corticosterona tras 10 minutos de exposición a un campo abierto (no se midió la ACTH) (Aubry

et al., 1995). En este estudio, las ratas RLA mostraban niveles normales de mRNA del CRF, pero mayores niveles de mRNA para la AVP en el pPVN (Aubry et al., 1995). Este último dato podría interpretarse como el reflejo de una mayor actividad del eje HPA en las RLA. Más recientemente, se ha descrito una mayor respuesta de la corticosterona a lo largo de 60 minutos de exposición a un campo abierto en animales RLA vs RHA (Steimer y Driscoll, 2003), aunque no se especificaba la edad de los animales. Los RLA mostraban también niveles basales más altos de corticosterona tanto en la fase diurna como nocturna, aunque los niveles diurnos eran más elevados que los obtenidos en nuestro laboratorio, siendo difícil afirmar que estas diferencias son reales en condiciones estrictamente basales. Debido a las inconsistencias en el eje HPA, algunos autores consideran que la prolactina, y no las variables del eje HPA, estarían relacionadas con las diferencias conductuales en estas líneas (Castanon et al., 1995).

Los animales Siracusa de alta o baja evitación (*Siracuse high avoidance*, SHA y *Siracuse low avoidance*, SLA respectivamente) han sido igualmente seleccionados en función de su comportamiento en una tarea de evitación activa y también parecen diferir en ansiedad (Brush, 1991). Sin embargo, su patrón de reactividad del eje HPA es opuesto al de las ratas Romanas: los animales SLA muestran menor actividad del eje HPA que las SHA, con niveles más bajos de corticosterona tanto a nivel basal como en respuesta a un campo abierto o al éter (Brush et al., 1991).

En la Tabla 2 se presenta un resumen con las principales diferencias conductuales y endocrinas de algunas de estas cepas. Se puede observar como, en general, los animales que presentan una mayor ansiedad, muestran un menor grado de exploración/actividad. En cambio, la relación de la ansiedad con el eje HPA es controvertida, hecho confirmado por otros estudios con diferentes cepas de ratas y ratones (Trullas y Skolnick, 1993, Courvoisier et al., 1996, Taghzouti et al., 1999, Kabbaj et al., 2000).

#### **2.4.5. Relación entre actividad/exploración y eje HPA**

El grupo de Le Moal y Piazza ha sido pionero en el estudio de este rasgo en ratas no seleccionadas genéticamente, utilizando como índice la actividad en un ambiente nuevo inescapable (Dellu et al., 1993) y otros autores les han seguido (Sara et al., 1995, Kabbaj et al., 2000). Se asume que el interés de los animales por los ambientes nuevos se ve reflejado en su nivel de actividad, lo que permite clasificarlos como muy reactivos al ambiente nuevo (*high responders*, HR) o poco reactivos (*low responders*, LR) (Dellu et al., 1993). Sin embargo, mientras Piazza y colaboradores miden la actividad de los animales en un ambiente nuevo especial (corredor circular) durante un período muy prolongado de tiempo (dos horas), otros autores han valorado la actividad en ambientes nuevos más comunes como compartimientos rectangulares (Kabbaj et al., 2000) o una tabla de agujeros (Fernández-Teruel et al., 1992, Sara et al., 1995, Escorihuela et al., 1999) y por tiempos normalmente cortos (alrededor de 5

minutos). Se desconoce si se está valorando lo mismo con estas diferentes aproximaciones. Por otro lado, no está claro si la actividad/exploración forzada es la más adecuada para la caracterización del rasgo de búsqueda de novedad o si lo es el estudio en ambientes que permiten una exploración voluntaria asociada a la novedad, ya que probablemente estamos hablando de diferentes constructos (Klebaur y Bardo, 1999).

**Tabla 2: Ejemplos de diferencias en ansiedad, exploración/actividad y reactividad del eje HPA en situaciones de estrés en diversas cepas de ratas.**

<b>Cepas</b>	<b>Ansiedad</b>	<b>Exploración/ actividad</b>	<b>Eje HPA</b> (corticosterona o ACTH tras estrés)
<i>Roman High Avoidance</i> (RHA) y <i>Roman Low Avoidance</i> (RLA)	RHA<RLA RHA>RLA	RHA>RLA RHA=RLA	RHA<RLA RHA>RLA RHA=RLA
<i>Maudsley reactive</i> (MR) y <i>Maudsley non reactive</i> (MNR)	MR>MNR MR=MNR	MR<MNR	MR=MNR
<i>High Anxiety Behavior</i> (HAB) y <i>Low Anxiety Behavior</i> (LAB)	HAB>LAB	HAB<LAB	HAB>LAB HAB<LAB HAB=LAB

Se ha sugerido que este rasgo conductual estaría relacionado con la susceptibilidad a la adicción: los animales HR muestran una mayor respuesta motora a los psicoestimulantes (Piazza et al., 1989, Hooks et al., 1991) y una mayor predisposición a autoadministrarse diversas drogas (Piazza et al., 1989, 1990, 1991, Nadal et al., 2002). Debido a la importancia del sistema dopaminérgico en los procesos de adicción, se han realizado muchos esfuerzos para caracterizar este sistema en los animales HR-LR. Comparados con los LR, los HR muestran un mayor incremento en los niveles extracelulares de DA en el núcleo accumbens tras la administración de cocaína (Hooks et al., 1991, Hooks et al., 1992) o anfetamina (Bradberry et al., 1991), así como una reducción de la unión al receptor D<sub>2</sub> en el *core* y el *shell* del núcleo accumbens (Hooks et al., 1994a). También se han descrito otras diferencias en la expresión de neuropéptidos en el sistema mesolímbico, aunque se desconoce su significado funcional (Hooks et al., 1994b). Finalmente, se ha observado que los animales HR se caracterizan por un menor grado de proliferación celular en el GD de la formación hipocampal, acompañado de un menor número de neuronas granulares en el GD (Lemaire et al., 1999). Teniendo en cuenta la

importancia que se le atribuye a la neurogénesis en el GD en los fenómenos de plasticidad sináptica, los resultados son de gran interés.

La relación entre el rasgo de exploración/actividad y otras variables fisiológicas ha sido también estudiada por el grupo de Le Moal y Piazza (Piazza et al., 1991, Dellu et al., 1996b, Bouyer et al., 1998). Se ha demostrado que los animales HR muestran, frente a los LR, una mayor activación del eje HPA en una situación de estrés agudo, con niveles más altos de corticosterona tras la exposición a un estrés moderado, como es el propio ambiente nuevo (Piazza et al., 1991), o a uno de mayor intensidad como es la inmovilización en tubo (Dellu et al., 1996a, Bouyer et al., 1998). Otros autores han observado también una relación positiva entre exploración/actividad en situaciones nuevas y niveles plasmáticos de ACTH o corticosterona (Copland y Balfour, 1987, Kabbaj et al., 2000). No obstante, cuestiones como si las diferencias entre HR y LR son más relevantes en la respuesta inicial al estrés o en la capacidad de recuperación una vez terminado el estrés, o el papel del tipo de estrés en las diferencias que aparecen entre los sujetos no están bien establecidas. Mientras que en un estudio se hallaron diferencias ya en la respuesta inicial (Dellu et al., 1996a), en otros las diferencias aparecen únicamente en el periodo posterior a la finalización de la exposición al estrés (Piazza et al., 1991, Bouyer et al., 1998), lo que es de gran interés, dado que en nuestro laboratorio hemos demostrado que pueden existir factores que modulan diferencialmente la respuesta inicial y la recuperación después de la situación estresante (García et al., 2000, García y Armario, 2001).

Como ocurre con el estudio de otros rasgos conductuales, el tipo de estímulo estresante es importante para determinar la relación entre el rasgo de actividad/exploración y la reactividad del eje HPA. En un estudio realizado en el laboratorio de Huda Akil (Kabbaj et al., 2000) se observó que la repuesta de la corticosterona a un ambiente nuevo era mayor en las HR que en las LR, pero las diferencias desaparecían si el estímulo estresante era la inmovilización en tubo. En este estudio se ha descrito por primera vez que los animales HR y LR diferían en aspectos centrales del eje HPA. Los HR mostraban unos mayores niveles de expresión tónica del gen del CRF en el PVN, menores niveles de este mensajero en la amígdala central y menores niveles de expresión del gen de GR en el GD y en la región CA1 de la formación hipocampal. Todos estos resultados centrales con compatibles son una mayor reactividad periférica al estrés de los animales HR.

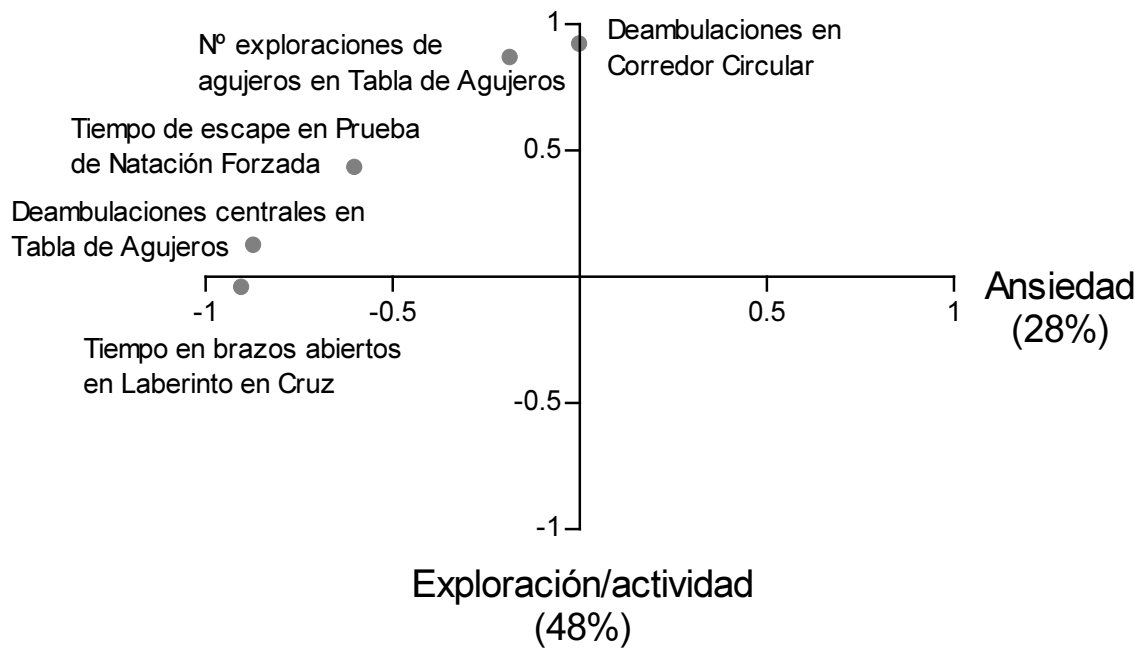
La utilización de las ratas APO-SUS/APO-UNSUS es otra de las aproximaciones al estudio de las bases neurobiológicas de este rasgo conductual. Estas líneas de animales fueron seleccionada genéticamente a partir de ratas Wistar en función de la aparición de estereotipias (conducta de roer) tras la administración del agonista dopaminérgico apomorfina. Los animales que presentan estereotipias (y por lo tanto son susceptibles a la apomorfina: APO-SUS) muestran también mayores niveles de exploración en ambientes nuevos (para revisión ver Ellenbroek y

Cools, 2002). Es interesante que también se ha descrito una actividad diferencial del eje HPA (Rots et al., 1996): las ratas APO-SUS muestra altos niveles basales de ACTH durante todo el ciclo diario y una mayor respuesta de la ACTH al estrés que las APO-UNSUS. Los cambios en la corticosterona no son tan claros porque también parece afectada la transcortina. No se observan cambios en la expresión de GR y MR similares a los descritos para las HR-LR, lo que sugiere aspectos comunes, pero también divergentes a nivel de la regulación del eje HPA.

Aunque en general (pero no siempre) se ha observado una relación positiva entre el rasgo de actividad/exploración y la actividad del eje HPA, quedan por dilucidar muchos aspectos de esta relación. Cabe destacar además que en todos los estudios mencionados, los animales HR no sólo se caracterizaban por un mayor nivel de actividad/exploración, sino también por menores niveles de ansiedad respecto a los LR. Es posible que parte de los resultados contradictorios obtenidos en animales acerca de la relación entre factores de personalidad y reactividad del eje HPA sean debidos a que los diseños experimentales no han permitido estudiar la contribución diferencial de los rasgos de ansiedad y exploración/actividad.

### **2.5. Separación de los rasgos de ansiedad y actividad/exploración**

En este sentido, (ver capítulo 5 del presente trabajo), en nuestro laboratorio hemos desarrollado una estrategia de evaluación conductual que permite separar los dos factores. Tras la caracterización de la conducta de poblaciones de ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley en diferentes pruebas (corredor circular, laberinto elevado en cruz, tabla de agujeros y prueba de natación forzada), la solución rotada del análisis factorial revela, de forma consistente a lo largo de diferentes experimentos, dos factores (Figura 6) que explican alrededor del 75 % de la varianza. En el primer factor, que denominamos ansiedad, saturan el tiempo en los brazos abiertos del Laberinto elevado en cruz y las deambulaciones centrales en la tabla de agujeros; mientras que en el segundo factor, que denominamos exploración/actividad, saturan las deambulaciones del corredor circular y el número de exploraciones de los agujeros en la tabla de agujeros. Los datos referentes a la prueba de natación forzada saturan parcialmente en ambos factores.



**Figura 6:** Representación gráfica del análisis factorial de las variables de conducta. Se representan las saturaciones de las variables con respecto a los dos factores. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de la varianza explicado por cada factor.

A lo largo de diferentes experimentos hemos encontrado de forma consistente que las variables que mejor representan cada uno de estos factores son: el tiempo en brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (ansiedad) y las deambulaciones en el corredor circular (búsqueda de novedad o exploración/actividad). De hecho, en concordancia con la ortogonalidad de estos factores, hemos encontrado que las correlaciones entre estas dos variables son bajas o nulas y nunca significativas. Esto nos ha permitido estudiar de manera diferencial la relación de cada uno de estos rasgos con determinadas variables fisiológicas como la reactividad al estrés del eje HPA (ver capítulo 5) y también con otros aspectos como la vulnerabilidad a la adicción (Nadal et al., 2005).





## **OBJETIVOS**



Aunque durante años se ha reconocido la existencia de marcadas diferencias individuales en el comportamiento y en la reactividad fisiológica al estrés, es en los últimos años cuando ha surgido un especial interés por determinar cuáles son los correlatos neurobiológicos de estas diferencias. La mayor parte de este tipo de investigación se ha centrado en el estudio del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), por dos razones. En primer lugar, este eje se ha relacionado con numerosas patologías asociadas al estrés, y en segundo lugar, el eje HPA es uno de los sistemas prototípicos de la respuesta de estrés, siendo su activación sensible a la intensidad de la situación estresante. Así, parece posible que aquellos individuos que perciben las situaciones como más estresantes deberían mostrar también una mayor activación del eje HPA. El objetivo general del presente trabajo es el estudio de las diferencias individuales en la reactividad del eje HPA al estrés de tipo emocional y más concretamente:

1. Estudiar las características del eje HPA como marcador de la intensidad de estrés tras la exposición a estímulos estresantes emocionales de diferentes características cualitativas y cuantitativas. Además, comparar la reactividad del eje HPA con la de otros marcadores de estrés.
2. Describir la respuesta del eje HPA ante una situación de estrés crónico y estudiar la existencia de diferencias individuales, como posible índice de vulnerabilidad a padecer patologías asociadas al estrés.
3. Comprobar la consistencia de la respuesta del eje HPA y otros marcadores de estrés a situaciones estresantes agudas de diferente intensidad. Esto nos permitirá conocer si es posible caracterizar a los individuos hiper o hiporeactivos al estrés y en qué condiciones.
4. Estudiar la contribución de ciertos rasgos de personalidad a la reactividad del eje HPA ante situaciones estresantes agudas de intensidad moderada. En concreto, estudiaremos de manera simultánea los rasgos de ansiedad y búsqueda de novedad (actividad/exploración) al objeto de discernir la aportación diferencial de cada uno de estos rasgos a la respuesta del eje HPA.



## **RESULTADOS**



## **CAPÍTULO 1: Reactividad del eje HPA y otros marcadores de estrés en respuesta a situaciones estresantes de intensidad elevada.**

Publicación:

Cristina Márquez, Xavier Belda, Antonio Armario (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 Research* 926, 181-185.





Short communication

# 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

Cristina Márquez, Xavier Belda, Antonio Armario\*

*Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Accepted 13 September 2001

## Abstract

Acute immobilization in male rats elicited the same ACTH, corticosterone and glucose response as foot shock when measured immediately after stress. However, post-stress recovery of plasma ACTH, corticosterone and glucose levels were delayed in immobilized versus shocked rats. Similarly, stress-induced anorexia was much greater in the former animals. All these data suggest that post-stress speed of recovery of some physiological variables is positively related to stressor intensity and could be used to evaluate it. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Theme:* Neural basis of behavior

*Topic:* Stress

*Keywords:* Stress marker; Immobilization; Footshock; Prolactin; Hypothalamic–pituitary–adrenal axis; Post-stress recovery

There is an extremely wide range of laboratory and naturalistic situations which are considered stressful and, therefore, it is difficult to compare results across different laboratories about the behavioral and physiological consequences of exposure to stress. Without ignoring the relevance of particular qualitative aspects of stressors, it is also needed to measure the intensity of a stressful situation in order to know whether or not some of its physiological and pathological consequences are appropriately explained by its intensity, without referring to particular details of the situation. At least when stressors eliciting a highly emotional response are considered, it is known that there are some relatively good markers of stress intensity, what is of great value in stress research.

A systematic research on markers of stress intensity has only been done in rodents and especially in rats. In those species, the overall results suggest that, when using appropriate sampling times, there are several variables

which are sensitive to stress intensity, although the threshold of intensity, their discriminative power and the range of intensities they cover depend on the particular variable used. It is well accepted that catecholamines are very sensitive to stress and that adrenaline is a better reflection of stressor intensity than noradrenaline [6,12,17,18]. Regarding the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, it is clear that glucocorticoid release is related to the intensity of stress when low to middle intensity stressors are studied, but not when high intensity stressors are used [4,9,10]. The poor value of circulating glucocorticoids in discriminating between highly stressful situations is due to the ceiling effect of adrenal steroidogenesis with intermediate levels of ACTH, so that glucocorticoids no longer reflect ACTH release [11]. The only two other physiological variables that consistently reflect stress intensity are prolactin, that is a stress marker acting in the same range as ACTH [1,2,10], and plasma glucose, which has a relatively high threshold, but covers a wide range of intensities [3,4,6].

We have recently reported that the speed of recovery of HPA hormones in the post-stress period appears to be a

\*Corresponding author. Tel.: +34-93-581-1664; fax: +34-93-581-2390.

*E-mail address:* antonio.armario@uab.es (A. Armario).

good marker of stress intensity [8]. This suggests that we can evaluate the intensity of a stressful situation by measuring circulating corticosterone, provided that we study the post-stress period. In the present report we extend these observations by showing that two stressors eliciting the same ACTH response as measured just after termination of exposure to the stressors, greatly differ in the speed of recovery of the HPA axis, being related this differential pattern to the intensity of the stressors as evaluated by other independent variables.

Sixteen male, 55-day-old, Sprague–Dawley rats obtained from the breeding center of the Universitat Autònoma de Barcelona were used in this experiment. They were housed individually for 1 week before starting the experiment under standard conditions of temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12 h–12 h light–dark schedule (lights on at 7 a.m.). Food and water were available ad libitum. The experimental protocol were approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona.

The animals were randomly assigned to immobilisation (IMO) or foot shock (FS) groups (eight rats each). The experiment was done in the morning. In order to obtain basal hormone levels, a blood sample was obtained by tail-nick immediately after the animals had been taken from the animal room. Then the rats were subjected to stress. IMO rats were stressed for 1 h by taping their four limbs to metal mounts attached to a wooden board. Head movements were restricted with two metal loops around the neck. FS rats were put into individual boxes with a metal grid floor and were exposed to scrambled shocks (1.5 mA, 3 s, AC current) every 1 min for 1 h. A high shock intensity was chosen because our aim was to achieve a stressful situation as close as possible to IMO in terms of intensity. Immediately after termination of exposure to the stressor and at 45 and 90 min post-stress, the animals were sampled again. The rats were returned to the animal room in their home cages after each blood sampling. In all cases, 300  $\mu\text{l}$  blood samples were taken within 2 min and collected into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Germany). Plasma obtained after centrifugation was stored at  $-30^\circ\text{C}$  until assayed.

Plasma ACTH and corticosterone were measured by radioimmunoassay (RIA) as described previously [8,13]. Prolactin was determined by RIA using  $^{125}\text{I}$ -prolactin (NEN, Boston, MA, USA) as the tracer, rat prolactin (rat PRL-RP-3) as the standard and an antibody raised against rat prolactin (anti-rPRL-S-9), gently provided by Dr. A.F. Parlow (NIDDK National Hormone and Peptide Program, California, USA). Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method using a commercial kit (Boehringer-Mannheim, Barcelona, Spain). Food intake was measured every day for 1 week after exposure to the stressors. Baseline food intake was obtained on the 2 days preceding exposure to the stressors. The results were statistically analyzed using two-way ANOVA with the type of stressor as the between-subject factor and sampling time

as the within-subject factor. Where appropriate, *t*-test for independent samples were used to compare the response to the two stressors at specific time points, and paired *t*-test to demonstrate stress-induced changes in food intake on the 24 h following exposure to the stressors. Pearson's correlation coefficients between the hormonal parameters were also calculated.

The two-way ANOVA of plasma ACTH and corticosterone levels revealed significant effects of the type of stressor, the sampling time, and the interaction type of stressor by sampling time ( $P < 0.001$  in all cases). Posthoc comparison showed that IMO and FS had similar effects on ACTH and corticosterone levels as measured immediately after the stress session. However, in the post-stress period, FS resulted in a faster recovery of pre-stress levels than IMO. The differences between the two stressors were highly significant for the two hormones in the two post-stress periods ( $P = 0.005$  in both cases) (Fig. 1A and B). The two-way ANOVA of plasma glucose revealed significant effects of the type of stressor ( $P < 0.02$ ), the sampling time ( $P < 0.001$ ) and the interaction type of stressor by sampling time ( $P < 0.005$ ). Posthoc comparison showed that glucose response immediately after the stress sessions did not differ in IMO and FS rats, but plasma glucose levels were lower in FS as compared to IMO rats at 45 min ( $P < 0.005$ ) and 90 min post-stress ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1C). Prolactin levels were analysed only in samples taken immediately after the stress session because the recovery of prolactin levels after termination of stress is very fast [5] and therefore no additional information could be obtained. Prolactin levels were marginally higher after IMO than after FS ( $30.8 \pm 3.9$  versus  $21.5 \pm 2.9$  ng/ml,  $P = 0.076$ ).

The two-way ANOVA of food intake revealed significant effects of the type of stressor, the sampling time, and the interaction sampling time by stressor ( $P < 0.001$  in all cases). Although both FS and IMO inhibited food intake on the 24 h following exposure to the stressors, when compared to the average food intake on the 2 days preceding exposure to stress (paired *t*-test,  $P = 0.001$ ), anorexia was greater in IMO than FS over the next 6 days after exposure to stress (*t*-test,  $P$  at least  $< 0.05$ ) (Fig. 1D).

Whereas nonsignificant correlations between the different hormonal parameters were observed immediately after stress exposure, highly significant correlations were observed in the post-stress period (Table 1).

The present results demonstrate that the speed of recovery of the HPA axis after termination of exposure to stressors is able to discriminate between two stressors despite the same level of HPA activation achieved during exposure to both situations. That the two stressors differed in intensity was independently evaluated by other stress-sensitive measures such as hyperglycaemia, plasma prolactin levels and anorexia.

IMO in wooden boards and FS, under conditions similar to those used in the present experiment, are considered in

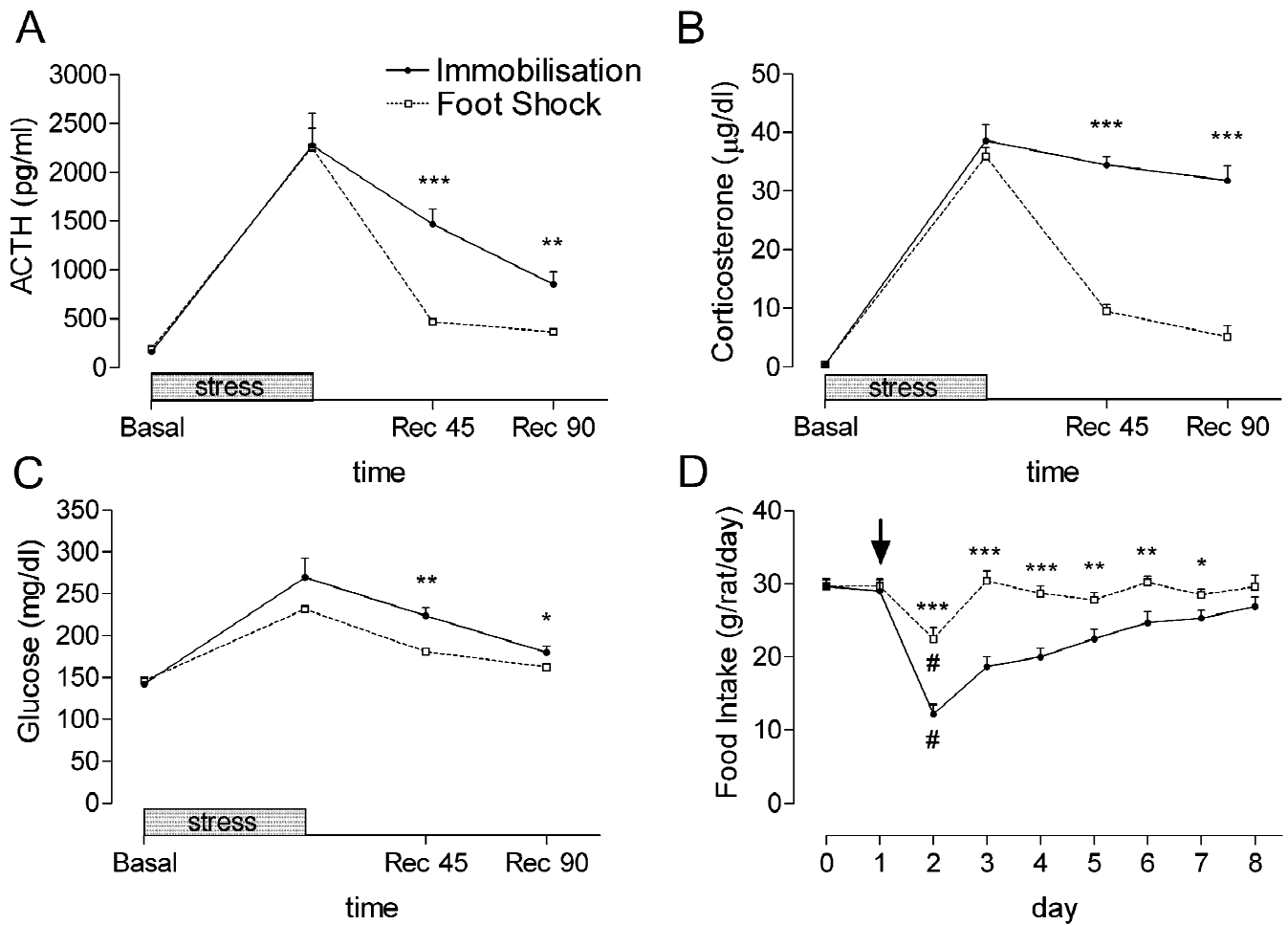


Fig. 1. Effects of 1 h immobilisation or foot shock stress on various physiological variables: values are means±S.E.M. (n=8 per group). The arrow indicates the day of stress exposure. Rec 45 and Rec 90 indicate sampling 45 and 90 min after finishing exposure to the stress. Significant differences between stress groups are expressed by \*\*\*, P=0.000; \*\*, P<0.01; \*, P<0.05 (t-test); #, P=0.001 vs. average food intake of the two pre-stress days (paired t-test).

the literature as severe stressors [14,15]. However, to our knowledge, a direct comparison of the two stressors has not been carried out so far. When plasma ACTH levels just after 1 h of exposure to the stressors were measured, similar high levels were observed. Since ACTH is consid-

ered to discriminate between different stress intensities, we could conclude that FS and IMO are of similar intensity. However, the follow-up of the post-stress ACTH and corticosterone levels gave us a very different picture: the recovery of the HPA axis after IMO was much slower than

Table 1. Correlations between the different physiological responses to the stressors.

	ACTH stress	Corticosterone stress	Glucose stress	Prolactin stress	ACTH rec 45	Corticosterone rec 45	Glucose rec 45	ACTH rec 90	Corticosterone rec 90
Corticosterone stress	-.32								
Glucose stress	.09	.13							
Prolactin stress	.48 #	.08	.34						
ACTH Rec 45	-.02	.19	.15	.54 *					
Corticosterone Rec 45	.00	.40	.38	.41	.80 ***				
Glucose Rec 45	-.01	.12	.79 ***	.32	.55 *	.71 **			
ACTH Rec 90	.14	.34	.03	.54 *	.87 ***	.74 **	.47 #		
Corticosterone Rec 90	.03	.39	.34	.49 #	.94 ***	.96 ***	.73 **	.82 ***	
Glucose Rec 90	-.07	.10	.51	.49 #	.58 *	.43 #	.71 **	.54 *	.58 *

Data are r-values. Rec 45 and Rec 90 indicate sampling 45 and 90 min after finishing exposure to the stress.

Significant correlations are expressed by \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05; # 0.05<p<0.10.

after FS. The slow recovery of the HPA axis after IMO is in accordance with our own previous results and also with those by other authors [15,19].

It might be argued that the slow recovery of the HPA axis after IMO may be a particular characteristic of this stressor unrelated to its intensity. However, there are several reasons to consider that the speed of recovery is truly measuring stress intensity. Firstly, we have previously observed that the speed of post-stress recovery of the HPA axis is negatively related to the intensity of the stressors and relatively independent of the duration of exposure to the situation [8]. Secondly, hyperglycaemia, another stress marker, tended to be higher immediately after IMO than after FS, and was significantly higher in IMO rats at 45 min post-stress. That post-stress recovery of glycaemia was delayed in IMO as compared to FS rats corroborates the importance of studying the post-stress period. Finally, stress-induced anorexia appears to be also sensitive to the intensity of emotional stressors [16] and reduction of food intake was much greater and prolonged after IMO than after FS. The protracted effect of a single IMO session on food intake is in accordance with our recent findings [20] and suggests again that IMO is a particularly severe stressor. When blood sampling is not possible or appropriate for the experimental design, reduction of food intake appears to be an easy to measure variable and a good reflection of stress intensity, at least under stressors of middle to high intensity.

The possibility that, under different conditions, FS may be as severe as IMO might be considered. For instance, regular FS could have allowed the animals to prepare for the shock and could have reduced the impact of the stressor. In addition, exposure to FS of higher intensity may result in a delay of post-stress HPA axis recovery. However, we have obtained similar HPA response and speed of recovery using regular and irregular FS of the same intensity (1.5 mA) and regular FS of 2.5 mA (unpublished data), what suggests that the slow recovery of the HPA axis after IMO is a reflection of the extremely severity of the situation in emotional terms. Although behavioral consequences of exposure to IMO have not been addressed in the present work, the degree of severity of the physiological consequences of IMO warrants the use of IMO as a putative animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD). Further studies are obviously needed to know whether or not this preliminary assumption is justified.

The importance of studying the post-stress period is further illustrated by the analysis of the correlations. Whereas the correlations between the various physiological responses measured just after termination of exposure to the stressors were low and non-significant, high correlations between various variables appeared in the post-stress period. Apparently, consistent individual differences in the physiological response to stressors are not evident immediately after stress, but they are in the recovery period. This

may be due to either a ceiling effect of the physiological response to severe stressors, or more marked individual differences in the pattern of post-stress recovery, or both. In fact we have recently reported that the stronger the stressor the longer the time needed for the HPA axis to recover after the termination of exposure to the situation [8]. In addition, there are marked individual differences in the speed of recovery of the HPA after IMO, which are not related to differences in the HPA response during exposure to the situation [7]. Finally, the speed of recovery of the HPA axis is much more sensitive to previous experience with a stressor than the initial response [8,15]. All these data suggest that post-stress dynamics of the HPA axis is probably controlled, to a great extent, by mechanisms independent of those controlling the response during stress.

In summary, the present results suggest that the follow-up of the physiological response to two severe stressors for a period of time after the termination of exposure to the situation allows us to better discriminate between the two stressor in terms of intensity and could be a good marker of the possible pathological impact of such stressors.

#### Acknowledgements

This work was supported by DGICYT (PM98-0175) and CUR (1999SGR-330) Grants. CM is a fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona. We are very grateful to Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA) for his gift of the ACTH antiserum and to Dr. A.F. Parlow (NIDDK National Hormone and Peptide Program, California, USA) for his gift of the prolactin standard and antiserum.

#### References

- [1] A. Armario, M. Gil, J. Martí, O. Pol, J. Balasch, Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39 (1991) 373–377.
- [2] A. Armario, A. López-Calderón, T. Jolín, J.M. Castellanos, Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress, *Life Sci.* 39 (1986) 471–475.
- [3] A. Armario, J. Martí, M. Gil, The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation, *Psychoneuroendocrinology* 15 (1990) 341–347.
- [4] A. Armario, J.L. Montero, J. Balasch, Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats, *Physiol. Behav.* 37 (1986) 559–561.
- [5] K.P. Briski, P.W. Sylvester, Comparative effects of various stressors on immunoreactive versus bioactive prolactin release in old and young male rats, *Neuroendocrinology* 51 (1990) 625–631.
- [6] S.F. De Boer, S.J. Koopmans, J.L. Slangen, J. Van der Gugten, Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length, *Physiol. Behav.* 4 (1990) 1117–1124.
- [7] A. García, A. Armario, Individual differences in the recovery of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis after termination of the expo-

- sure to severe stressor in outbred male Sprague–Dawley rats, *Psychoneuroendocrinology* 26 (2001) 363–374.
- [8] A. García, O. Martí, A. Vallès, S. Dal-Zotto, A. Armario, Recovery of the hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure, *Neuroendocrinology* 72 (2000) 114–125.
- [9] M.B. Hennessy, S. Levine, Sensitive pituitary–adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation, *Physiol. Behav.* 21 (1978) 295–297.
- [10] G.J. Kant, E.H. Mougey, L.L. Pennington, J.L. Meyerhoff, Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma  $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -LPH, corticosterone and prolactin, *Life Sci.* 33 (1983) 2657–2663.
- [11] M.E. Keller-Wood, J. Shinsako, L.C. Keil, M.F. Dallman, Insulin-induced hypoglycemia in conscious dogs. I. Dose-related pituitary and adrenal responses, *Endocrinology* 109 (1981) 818–824.
- [12] C.L. Kvetnansky, C.L. Sun, N. Thoa, T. Torda, I.J. Kopin, Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine- $\beta$ -hydroxylase, *Endocrinology* 103 (1978) 1868–1874.
- [13] A. Lahmame, F. Gómez, A. Armario, Fawn-hooded rats show enhanced active behaviour in the forced swimming test, with no evidence for pituitary–adrenal axis hyperactivity, *Psychopharmacology* 125 (1996) 74–78.
- [14] S.F. Maier, S.M. Ryan, C.M. Barksdale, N.H. Kalin, Stressor controllability and the pituitary–adrenal system, *Behav. Neurosci.* 100 (1986) 669–674.
- [15] O. Martí, A. García, A. Vallès, M.S. Harbuz, A. Armario, 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 (2001) 129–136.
- [16] O. Martí, J. Martí, A. Armario, Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure, *Physiol. Behav.* 55 (1994) 747–753.
- [17] B.H. Natelson, D. Creighton, R. McCarty, W.N. Tapp, D. Pitman, J.E. Ottenweller, Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats, *Physiol. Behav.* 39 (1987) 117–125.
- [18] B.H. Natelson, W.N. Tapp, J.E. Adamus, J.C. Mittler, B.L. Levin, Humoral indices of stress in rats, *Physiol. Behav.* 26 (1981) 1049–1054.
- [19] S. Nemeth, M. Vigas, Rate of disappearance of plasma corticosterone in traumatized rats with special respect to the effect of adaptation, *Endocrinol. Exp.* 7 (1973) 171–176.
- [20] A. Vallès, O. Martí, A. García, A. Armario, Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats, *Am. J. Physiol.* 279 (2000) R1138–R1144.

## **CAPÍTULO 2: Estudio de la respuesta del eje HPA y la glucosa a la inmovilización crónica: diferencias individuales.**

Publicación:

Cristina Márquez, Roser Nadal, Antonio Armario (2004) The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 601-612.





## THE HYPOTHALAMIC–PITUITARY–ADRENAL AND GLUCOSE RESPONSES TO DAILY REPEATED IMMOBILISATION STRESS IN RATS: INDIVIDUAL DIFFERENCES

C. MÁRQUEZ,<sup>a</sup> R. NADAL<sup>b</sup> AND A. ARMARIO<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Unitat de Fisiologia Animal, Facultat de Ciències, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Unitat de Psicobiologia, Facultat de Psicologia, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

**Abstract**—It is accepted that there are important individual differences in the vulnerability to stress-induced pathologies, most of them associated to the hypothalamic–pituitary and sympatho–medullo–adrenal axes, the two prototypical stress-responsive systems. However, there are few studies specifically aimed at characterising individual differences in the physiological response to daily repeated stress in rats. In the present work, male rats were submitted to repeated immobilisation (IMO) stress (1 h daily for 13 days) and several samples were taken at specific days and time points. Animals only subjected to blood sampling procedure served as controls. Daily adrenocorticotrophic-hormone (ACTH), corticosterone and glucose responses to immobilisation (that included the post-immobilisation period) progressively declined over the days. In addition, repeated immobilisation resulted in decreased relative thymus weight, increased relative adrenal weight, elevated corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA levels in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), and down-regulation of glucocorticoid receptor gene transcription in hippocampus CA1. However, only CRF mRNA levels in the paraventricular nucleus correlated with the ACTH (on day 1) and corticosterone responses (from day 4–13) to immobilisation. When the animals were classified in three groups on the basis of their plasma ACTH levels immediately after the first immobilisation, individual differences in the ACTH response progressively disappeared on successive exposures to the stressor, whereas those in corticosterone and glucose were more sustained. The present results suggest that there are individual differences in the physiological response to stress that tend to be reduced rather than accentuated by repeated exposure to the stressor. Nevertheless, this buffering effect of repeated stress was dependent on the particular variable studied. © 2003 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** ACTH, corticosterone, glucose, CRF, glucocorticoid receptors, paraventricular hypothalamic nucleus.

\*Corresponding author. Tel: +34-93-581-1664; fax: +34-93-581-2390.

E-mail address: antonio.armario@uab.es (A. Armario).

**Abbreviations:** ACTH, adrenocorticotrophic-hormone; ANOVA, analysis of variance; AU, arbitrary units; AUC, area under the curve; CRF, corticotropin-releasing factor; DG, dentate gyrus; GR, glucocorticoid receptors; HAR, high ACTH response; HGR, high glucose response; HPA, hypothalamic–pituitary–adrenal axis; IAR, intermediate ACTH response; IGR, intermediate glucose response; IMO, immobilisation; LAR, low ACTH response; LGR, low glucose response; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; RIA, radioimmunoassay; SMA, sympatho–medullo–adrenal; TEA, triethanolamine.

0306-4522/04/\$30.00+0.00 © 2003 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2003.10.016

Chronic exposure to stress is acknowledged to be involved in a wide range of physiological and psychopathological processes. However, there is evidence for important individual differences in the susceptibility to stress-induced pathologies, most of them related to the two prototypical stress responses: the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) and sympatho–medullo–adrenal (SMA) axes. The most frequent approach to the study of individual differences in susceptibility to stress has been the use of inbred rat strains differing in responsiveness to stress. Focussing on the HPA axis, the strains most consistently showing an altered response to stress are the Fischer (exacerbated) and Lewis rats (reduced); (Sternberg et al., 1989; Dhabhar et al., 1993; Armario et al., 1995) rats. Unfortunately, to our knowledge, only few studies have addressed in these strains the effect of chronic stress on the HPA axis (Gómez et al., 1996; Dhabhar et al., 1997). In addition, the results obtained with inbred strains are difficult to extrapolate to outbred populations because in the process of inbreeding one particular allele of each gene potentially contributing (in some cases in opposite directions) to the different aspects of the regulation of the HPA axis and their responsiveness to stress may be randomly fixed. Therefore, the extent to which the conclusion achieved in a particular strain may be relevant for other strains is unclear.

We have recently reported that, in response to a severe stressor such as immobilisation on woodenboards (IMO), outbred Sprague–Dawley rats showed major differences in the levels of corticosterone 2 h after the termination of exposure to IMO, which were not apparently related to the initial response to the stressor (García and Armario, 2001). Assuming that the possible pathological impact of exposure to stress is related to both the intensity and duration of glucocorticoid response to the situation, some of the pathological consequences of exposure to stress may be stronger in those animals displaying a greater overall glucocorticoid response to stress, including the post-stress period. However, when considering the final physiological or pathological impact of repeated exposure to stress, another additional factor to be considered is the extent to which the magnitude of the response to the first exposure to a stressor is a reflection of the capability to adapt to the repeated stressor. In this regard, it has been found that Fischer rats showed not only an exacerbated response to the first exposure to restraint, but also a reduced rate of adaptation as compared with other strains (Sprague–Dawley and Lewis; Dhabhar et al.,

1997). In contrast, Natelson et al. (1988) showed, using an outbred population of Sprague–Dawley rats, that animals responding the more to an intermediate intensity stressor on the first day, the more adapted to repeated stress. Consequently, smaller individual differences were observed at the end than at the beginning of the chronic stress protocol. However, these two interesting papers were based only on corticosterone measurements and therefore have the main drawback that corticosterone response is not a reliable index of adaptation to intermediate or severe stressful situations for two main reasons: (a) adrenocortical response to circulating adrenocorticotrophic-hormone (ACTH) becomes saturated with intermediate levels of plasma ACTH, which are already achieved by exposure to moderate intensity stressors (Keller-Wood et al., 1981); and (b) chronic exposure to stress may result in enhanced adrenocortical responsiveness to ACTH (Armario et al., 1985, 1988; Uehara et al., 1989; Pitman et al., 1990; van Raaij et al., 1997). Therefore, after repeated exposure to relatively severe stressors, glucocorticoids are not longer a good reflection of ACTH release.

Rats repeatedly exposed to severe stressors show a faster recovery of ACTH and corticosterone to basal levels before any decrease in plasma levels of ACTH immediately after the stressor is observed (García et al., 2000). Therefore, the shut-off of the HPA axis after stress appears to be influenced by both individual differences in the responsiveness to stress and the degree of previous experience with the stressor. Considering the above, there are two opposite theoretical predictions about the consequences of repeated exposure to a severe stressor in animals characterised by different levels of stress-induced activation of the HPA axis. The first one is that animals displaying a greater activation during a first exposure to the stressor, in contrast to those showing a lower activation, may be rather non-sensitive to previous experience with the stressor, thus resulting in a reduced capability to shorten the HPA response over the course of the repeated stress treatment (reduced adaptation); therefore, the differences between the two groups will increase over the days. The second one is that the degree of experience with the stressor will predominate over individual differences in the reactivity to the first exposure and, therefore, upon repeated exposure to the same stressor all animals will show a similar shortening of the HPA response. The main purpose of the present experiment was to test these two hypotheses by studying the dynamics of the response of peripheral HPA hormones to repeated IMO over the course of 13 days and several end-point variables of the HPA axis known to be sensitive to chronic stress (Martí and Armario, 1998): adrenal and thymus weights, corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and mRNA for glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampal formation. In addition, measurement of plasma glucose levels, a good stress marker, was also included.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Thirty-eight male Sprague–Dawley rats, 60 days old at the beginning of the experiment, were used. They were obtained from the breeding centre of the Universitat Autònoma de Barcelona and housed individually for 1 week before starting the experiment, in standard conditions of temperature ( $22 \pm 1$  °C) on a 12-h light/dark schedule (lights on at 7 am). Food and water were available *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona and was carried out in accordance the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Attempts were made to introduce the minimum suffering of animals and to use the minimum number of animals compatible with our purposes.

### General procedure

The animals were randomly assigned to chronic IMO or control groups ( $n=30$  and 8 respectively). The experimental procedures were always done in the morning. IMO rats were stressed for 1 h daily for 13 days by taping their four limbs to metal mounts attached to a wooden board (García et al., 2000; García and Armario, 2001). Head movements were restricted with two metal loops around the neck. On day 1 and every 3 days, blood samples were taken at different times by tail nick procedure, in order to study the dynamics of HPA hormones, whilst the animal was smoothly wrapped with a cloth. To obtain basal levels, a sample was taken immediately after the animals had been taken out from the animal room. Then, control animals were returned to the animal room, whilst IMO rats were subjected to stress. Additional samples were also taken immediately after 1 h of IMO and 45 and 90 min after the ending of IMO (post-IMO). Control rats were sampled following the same schedule than IMO rats and were not submitted to other stress than that associated to the sampling procedure. In all cases, 300  $\mu$ l blood samples were taken within 2 min and collected into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). Plasma obtained after centrifugation was stored at  $-30$  °C until analyses. Food intake was monitored daily. On day 14, all animals were killed by decapitation in an adjacent room, without any additional stress, within 30 s after they were removed from the animal room. Brains were frozen on isopentanol (cooled in liquid nitrogen) and stored at  $-80$  °C and adrenals and thymus were weighed. The trunk blood was collected and centrifuged at 4 °C and the serum frozen at  $-30$  °C until the analysis.

### Biochemical analysis

Plasma corticosterone were measured by radioimmunoassay (RIA) as described previously (Armario and Castellanos, 1984) with two modifications: the antiserum used was obtained in sheep against corticosterone-3-CMO-urease (Chemicon Int., Temecula, CA, USA) and corticosterone-binding-globulin was denatured by heating the samples at 70 °C for 30 min. Serum ACTH was assayed immunoradiometrically by a double-antibody RIA using  $^{125}$ I-ACTH (Amersham, Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) as the tracer, rat synthetic ACTH 1–39 (Sigma, Madrid, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb 7) kindly provided by Dr. W. C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method using a commercial kit (Boehringer-Mannheim, Barcelona, Spain). All samples to be compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was of 8% for corticosterone, 5% for ACTH and 4% for glucose. The area under the curve (AUC) of plasma levels was calculated with Graph Pad Prism (version 3.02) that computes the AUC using the trapezoid rule.

**Table 1.** Effect of repeated exposure to IMO on some physiological variables<sup>a</sup>

	Food intake (g/rat/day)	Change in body weight (g)	Thymus weight		Adrenal weight	
			mg	mg/100 g bw	mg	mg/100 g bw
Control	29.3±1.2	51.8±3.7	788.0±49.4	202.8±10.6	61.9±2.6	16.0±0.9
IMO	20.1±0.3***	-5.0±3.8***	567.4±24.5***	171.3±6.3*	66.1±1.2, NS	20.1±0.4***

<sup>a</sup> Data are expressed in mean±S.E.M. Food intake is expressed as the mean of the values across the 13 days of stress. Relative thymus and adrenal weights are expressed as mg/100 g of body weight (bw). Control ( $n=8$ ), IMO ( $n=30$ ). NS=non-significant; \*  $P\leq 0.05$ ; \*\*\*  $P\leq 0.001$ .

### In situ hybridisation assay

**Brain sectioning.** Serial coronal sections (30  $\mu\text{m}$  thickness) through the PVN (Bregma -2.30, -1.80) and the hippocampal formation (Bregma -3.80, -3.30) were obtained from the frozen brains with a cryostat (Frigocut 2800; Leica, Nussloch, Germany) and mounted onto gelatine and poly-L-lysine-coated slides, which were then maintained at -80 °C until the day of analysis.

**Probe preparation.** The CRF probe was generated from a pGEM-4Z plasmid containing an EcoRI fragment (1.2 kb) of cDNA of the rat (Dr. K. Mayo, Northwestern University, Evanston, IL, USA), linearised with HindIII. GR probe was transcribed from a 500-bp rat cDNA fragment that encodes for the N-terminal region of the rat liver GR (Miesfeld et al., 1986; courtesy of K. R. Yamamoto and R. Miesfeld, Department of Biochemistry, University of Arizona, Tucson, AZ, USA). This fragment was subcloned from a 2.8-kb fragment and transfected into pGEM3 plasmid (courtesy of Dr. M. C. Bohn, Department of Paediatrics, Northwestern University Medical School, Chicago, IL, USA). It was linearised with BamHI. Radioactive antisense cRNA copies were generated using a transcription kit (Promega, Charbonnières, Lyon, France). Once digested, 250 ng of linearised plasmid were incubated in transcription buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.9, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 10 mM NaCl), 10 mM DTT, 0.2 mM GTP/ATP/CTP, 200  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP (specific activity 1300 Ci/mmol, NEN Life Science Products, Boston, MA, USA), 40 U RNasin and 20 U of SP6 RNA polymerase for 60 min at 37 °C. The DNA template was digested with RNase-free DNase (Promega; 1 U DNase in 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA and 9.4 mM Tris/9.4 mM MgCl<sub>2</sub>) and extracted with phenol-chloroform-isoamylalcohol 25:24:1 (Sigma). The cRNA was precipitated with the ammonium acetate method, resuspended in 10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 8.0, and stored at -20 °C.

**In situ hybridisation histochemistry.** The protocol used was adapted from Simmons et al. (1989). All the solutions were pre-treated with DEPC and sterilised before use. Sections were post-fixed in 4% PFA+Borax, rinsed in KPBS, digested with proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; 0.01 mg/ml in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and 50 mM EDTA, pH 8.0), rinsed in DEPC-treated water and 0.1 M triethanolamine pH 8.0 (TEA; Sigma) and acetylated in 0.25% acetic anhydride in 0.01 M TEA. Finally, they were washed in 2 $\times$  SSC, dehydrated through graded concentrations of ethanol and air-dried. Thereafter, 90  $\mu\text{l}$  of hybridisation buffer (50% formamide, NaCl 0.3 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0, 1 $\times$  Denhardt's, 10% dextran sulphate, yeast tRNA 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 10 mM DTT) containing the labelled probe (1 $\times 10^6$  cpm/90  $\mu\text{l}$ ) were spotted onto each slide and sealed with a coverslip. Sections were incubated for 16–18 h in a humid chamber at 60 °C. After hybridisation, the slides were washed in 4 $\times$  SSC containing 1 mM DTT (Sigma), digested with RNase A (Amersham Bioscience, Upsala, Sweden; 0.02 mg/ml in 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA pH 8.0), washed in descending concentrations of SSC containing 1 mM DTT, dehydrated through a series of ethanol solutions (50, 70, 95 and 2 $\times$ 100%) and air-dried. The slides were then exposed to a XAR-5

Kodak Biomax MR autoradiography film (Kodak, NY, USA) for 22 h for CRF mRNA and for 3 days for GR mRNA. After developing the films, the slides were cleaned and defatted with a series of ethanols and xylene, counterstained with 0.25% thionin (Sigma), dehydrated through increasing concentrations of ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (Electron Microscopy Science, Washington, DC, USA) for histological control.

**Image analysis.** Densitometric analyses were done on the autoradiography films. The mRNA levels were semiquantitatively determined in three sections per brain area (both hemispheres pooled) and animal, by measuring the optical densities and the number of pixels in defined areas with a Leica Q 500 MC system. CRF and GR mRNA values shown are expressed in arbitrary units (number of pixels $\times$ optical density). All samples to be statistically compared were processed in the same assay to avoid inter-assay variability.

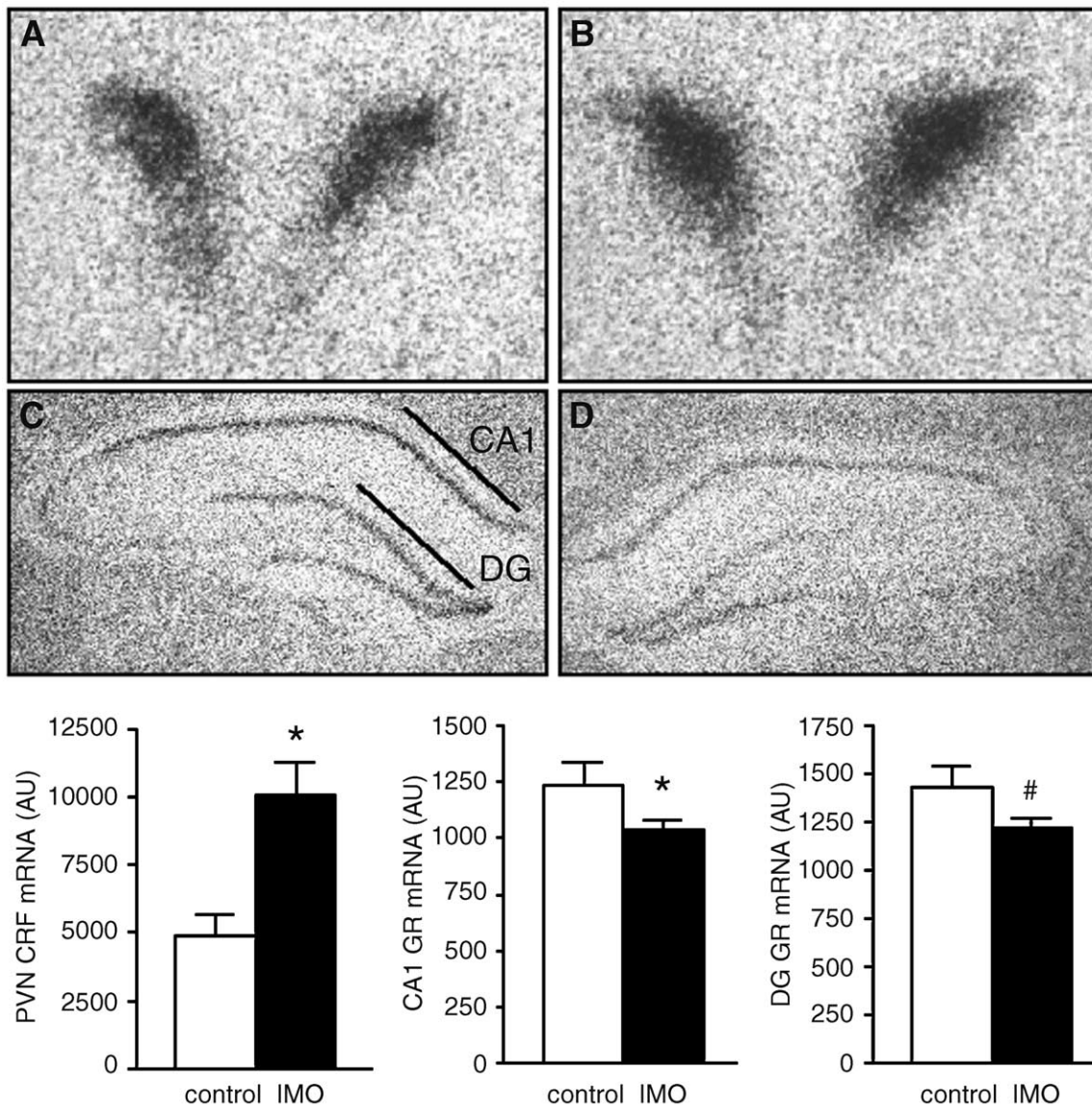
### Data analysis

The Statistical Package for Social Science (SPSS) programme was used (version 10 for Windows). Five different types of analysis were done in function of the case: (1) *t*-test to compare control and IMO rats in single variables; (2) two-way within-subject analysis of variance (ANOVA), being "sampling time" (4 levels: basal, post-IMO, and 45 and 90 min after the end of the IMO) and "days" (5 levels: days 1, 4, 7, 10 and 13) the factors used to study ACTH, corticosterone and glucose changes across the time, (3) one-way within-subject ANOVA to study the evolution of the AUCs of ACTH, corticosterone and glucose across the "days," also separately in control or IMO animals; (4) one-way between-subject ANOVA to study the influence of the subgroups of IMO rats obtained on the basis of several criteria (see below) on those variables measured after killing; and (5) mixed ANOVA with one within-subject factor and one between-subject factor (the various subgroups of IMO animals) to study either the dynamics of the response on day 1 or the AUCs changes across days. After significant ANOVAs, further comparisons were done by means of within-subject or between-subject "a priori" contrasts (see details in Results). Pearson correlation test (two-tailed) was also used. The probability level was set at  $P<0.05$ .

## RESULTS

### The overall pattern of the response to repeated stress

As compared with controls, repeated IMO reduced average food intake ( $t=9.51$ ,  $df=36$ ,  $P<0.001$ ) and body weight gain ( $t=7.47$ ,  $df=36$ ,  $P<0.001$ ) over all the experimental period. Increased relative ( $t=4.76$ ,  $df=36$ ,  $P<0.001$ ), but not absolute adrenal weight was observed, whereas both absolute ( $t=4.095$ ,  $df=36$ ,  $P<0.001$ ) and relative thymus weight ( $t=2.36$ ,  $df=36$ ,  $P<0.05$ ) were reduced in IMO rats (Table 1). A tonic increase in CRF



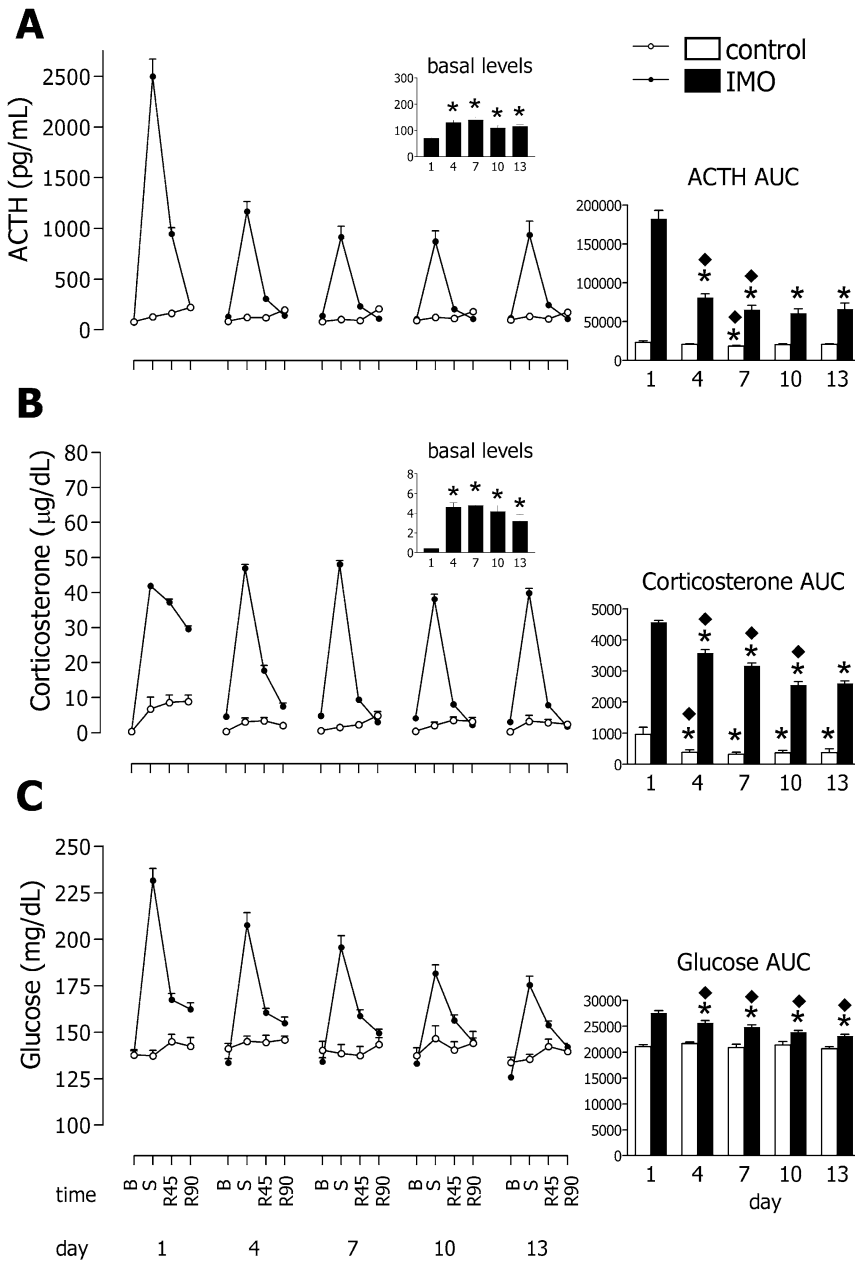
**Fig. 1.** Effects of repeated exposure to IMO on mRNA for CRF in the PVN and for GR in the hippocampal formation. Representative autoradiographs of CRF mRNA in the PVN of control (panel A) and repeated IMO rats (panel B); and of GR mRNA in the CA1 region and DG of control (panel C) and repeated IMO rats (panel D). On the bottom, the means and S.E.M. ( $n=7-8$  for controls and  $n=25-30$  for IMO rats) of CRF mRNA in the PVN and GR mRNA in the DG and CA1 regions are represented (bars indicate the areas where measurements were made). \*  $P<0.05$ , #  $P=0.073$  vs control group.

mRNA in the PVN ( $t=2.25$ ,  $df=30$ ,  $P<0.05$ ) and a reduction of GR mRNA in hippocampus CA1 ( $t=2.13$ ,  $df=35$ ,  $P<0.05$ ) were also observed in chronic IMO rats (Fig. 1). The reduction of GR mRNA in dentate gyrus (DG) was only marginally significant ( $t=1.85$ ,  $df=35$ ,  $P=0.073$ ).

To simplify, the statistical analyses of the physiological response to blood sampling in control rats were restricted to the AUCs. The one-way ANOVAs revealed significant effects of days for both ACTH and corticosterone ( $F(4,28)=3.05$   $P<0.05$  and  $F(4,28)=9.42$   $P<0.001$ , respectively), but not for glucose (Fig. 2A–C). Further comparison of ACTH AUCs showed a significant reduction on day 7 as compared with day 1 ( $P<0.05$ ), whereas cortico-

sterone AUCs showed a decrease on each day as compared with day 1 ( $P$  at least  $<0.02$ ).

In IMO rats, the two-way ANOVA of plasma ACTH (Fig. 2A) revealed significant effect of sampling time ( $F(3,87)=148.61$ ), days ( $F(4,116)=93.25$ ) and the interaction sampling time by days ( $F(12,348)=47.53$ ;  $P<0.001$  in all cases). Due to the interaction, additional comparisons were done. Chronic IMO rats showed a small increase in basal ACTH levels from day 1–4 that was maintained over the course of the chronic treatment ( $P$  at least  $<0.001$  vs day 1). On day 4, ACTH levels were lower than on day 1 both immediately after IMO and at the two post-IMO periods ( $P<0.001$  in all cases). A further significant decline in



**Fig. 2.** Physiological response to repeated blood sampling (control group) or IMO group. Means and S.E.M. ( $n=8$  for controls and  $n=30$  for IMO rats) are represented. On the left, the dynamics of the physiological response to the acute treatments on days 1, 4, 7, 10 and 13 are represented (for statistics, see text). In IMO rats, samples were taken under basal conditions (B), immediately after 1 h of IMO stress (S) and at 45 and 90 min post-IMO (R45 and R90, respectively). Control rats were only sampled, following the same schedule as IMO rats. On the right, the AUC of the overall daily response are represented for control and IMO rats. Within each group, \* indicates significant differences vs day 1 response and ♦ indicates significant differences vs the preceding day.

ACTH levels was observed from days 4–7 and from days 7–10 at all times ( $p$  at least  $<0.05$  versus the same sampling time on the preceding day), except just after IMO and at 90 min post-IMO from days 7–10. Essentially the same results were obtained with the AUCs: the one-way ANOVA revealed a significant effect of days ( $F(4,116)=88.47$ ;  $P<0.001$ ) and further comparisons showed a progressive decline in the overall ACTH response to IMO from day 1 to

day 7 ( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ , between consecutive days), with no further declines.

The two-way ANOVA of plasma corticosterone in IMO animals (Fig. 2B) revealed significant effect of sampling time ( $F(3,87)=1234.62$ ), days ( $F(4,116)=229.17$ ) and the interaction sampling time by days ( $F(12,348)=134.00$ ;  $P<0.001$  in all cases). When additional studies of this interaction were done, chronic IMO rats showed a moder-

**Table 2.** Pearson correlation coefficients between the ACTH and corticosterone AUCs of the response to repeated IMO across the days<sup>a</sup>

	Day 4	Day 7	Day 10	Day 13
<b>ACTH AUC</b>				
Day 1	0.33 <sup>#</sup>	0.43*	0.48**	0.42*
Day 4		0.60***	0.53**	0.59***
Day 7			0.69***	0.70***
Day 10				0.65***
<b>Corticosterone AUC</b>				
Day 1	0.40*	0.32 <sup>#</sup>	0.17	0.25
Day 4		0.62***	0.63***	0.61***
Day 7			0.68***	0.57***
Day 10				0.70***

<sup>a</sup> *r*-Values are expressed (*n*=30). <sup>#</sup> 0.05 < *P* < 0.10; \* *P* ≤ 0.05; \*\* *P* ≤ 0.01; \*\*\* *P* ≤ 0.001.

ate increase in basal corticosterone levels from days 1–4 (*P* < 0.001) that was maintained over the course of the chronic treatment (*P* < 0.001 in all cases). On days 4 and 7, corticosterone levels were higher than on day 1 immediately after IMO (*P* < 0.001 and *P* < 0.02, respectively), but lower at the two post-IMO periods (*P* < 0.001 in all cases). From days 4–7 and 7–10 there were further declines in corticosterone levels at 45 and 90 min post-IMO (at least *P* < 0.01). The one-way ANOVA of AUCs revealed a significant effect of days (*F*(4,116) = 155.49; *P* < 0.001), with a progressive decline of the corticosterone response from days 1–10 (*P* < 0.001 in all cases), but not from 10 to 13.

The two-way ANOVA of plasma glucose in IMO animals (Fig. 2C) revealed significant effect of sampling time (*F*(3,87) = 167.35), days (*F*(4,116) = 38.20) and the interaction sampling time by days (*F*(12,348) = 14.56; *P* < 0.001 in all cases). Additional comparisons showed that glucose levels immediately after IMO progressively decreased from days 1–10 (*P* < 0.001, *P* < 0.05, *P* < 0.01 between consecutive days). The same trend was observed in post-IMO levels, with a significant decline from days 1–4 at 45 min post-IMO (*P* < 0.05) and from days 7–10 at 90 min post-IMO (*P* < 0.05). The one-way ANOVA of glucose AUCs revealed a significant effect of days (*F*(4,116) = 38.50; *P* < 0.001), with a progressive decline of the response from days 1–13 (*P* < 0.001, *P* < 0.05, *P* < 0.01, *P* < 0.01 between consecutive days).

### Correlations between variables

In control rats (*n*=8), ACTH AUC on day 1 showed a high correlation with ACTH AUC on day 4 (*r*=0.81, *P* < 0.02), but not thereafter. In contrast, corticosterone AUC on day 1 showed a good correlation to those of the other days (e.g. *r*=0.75 with AUC on day 13). The correlations between ACTH and corticosterone AUCs on the same day were significant on days 1 and 4 only (*r*=0.90, *P* < 0.002; *r*=0.74, *P* < 0.04; respectively). Relative adrenal weight showed a high correlation with corticosterone AUCs almost every day (e.g. on day 1, *r*=0.90, *P* < 0.001).

In IMO rats, the ACTH AUC on day 1 showed a moderate significant correlation with the ACTH AUCs from

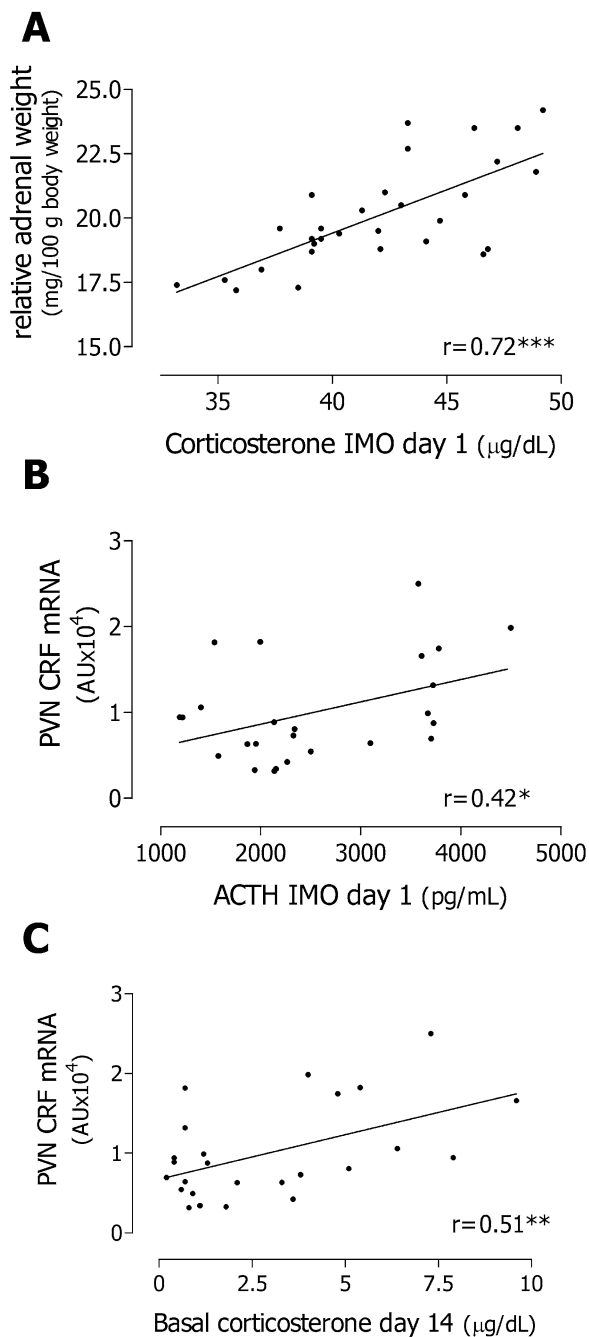
days 4–13, whereas correlations between those latter days were higher (Table 2). Corticosterone and ACTH AUCs on each day showed a modest but in general significant correlation, the greatest being observed on day 13 (*r*=0.68, *P* < 0.001). Interestingly enough, low or non-significant correlation between day 1 corticosterone AUC and those of the other days was observed, whereas those between days 4–13 were quite consistent (Table 2). A significant correlation was observed between relative adrenal weight and the corticosterone levels immediately after IMO on day 1 (*P* < 0.001), but not on the following days (Fig. 3). No other relevant physiological variable correlated with adrenal weight. The glucose AUC on the different days, including day 1, showed a good and consistent correlation with each other (*r* values between 0.56 and 0.80, in all cases *P* < 0.001). In addition, moderate correlations between glucose and ACTH AUCs on the same day were generally observed (e.g. on day 1, *r*=0.36, *P* < 0.05). There was no consistent correlation between glucose and corticosterone AUCs.

An important chronic stress-induced end-point change in the HPA axis, the levels of CRF mRNA in the PVN, moderately correlated with both plasma ACTH immediately after IMO and ACTH AUC on day 1 (*r*=0.42 and *r*=0.43, respectively, *P* < 0.05). On the next days, significant correlations were observed between CRF mRNA and corticosterone AUCs from days 4–13 (*r* between 0.49 and 0.72, *P* at least < 0.02) or basal levels of corticosterone on day 14 (*r*=0.51, *P* < 0.01; Fig. 3). Levels of mRNA for GR in the DG of the hippocampal formation showed a negative correlation with ACTH levels immediately after IMO or ACTH AUC on day 13 (*r*=−0.39, *r*=−0.38, *P* < 0.05). Similar, but just marginally significant correlations were observed with GR in the CA1.

### Individual differences in the response to IMO

The animals were classified in three groups on the basis of two criteria: (a) responsiveness to the stressor as evaluated by the plasma levels of ACTH and glucose immediately after IMO on day 1 (corticosterone was not considered because of the saturation of the adrenal at this time will mask any individual difference), thus resulting in low, intermediate and high ACTH response groups (LAR, IAR and HAR, respectively) or low, intermediate and high glucose response groups (LGR, IGR, HGR); and (b) the capability to recover as evaluated by the decline of plasma levels of ACTH and glucose from immediately after IMO to the 45 min post-IMO (the time at which the decline of ACTH and glucose levels were not so strong to mask individual differences). Each group was made of 10 subjects from a total of 30. With the groups thus generated we studied the ACTH, corticosterone and glucose responses. Because the effect of sampling time or days was always highly significant, they will not be further commented on in the text.

When the animals were classified in LAR, IAR, HAR groups, the two-way ANOVA of ACTH levels on day 1 (Fig. 4A) revealed significant effects of group (*F*(2,27) = 96.10) and the interaction sampling time by group (*F*(6,81) =



**Fig. 3.** Selected correlations between some physiological variables related to the HPA axis in chronic IMO rats ( $n=25-30$ ). \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .

65.15;  $P<0.001$  in both cases). Further comparisons showed that the three groups significantly differed immediately after IMO whereas only the HAR showed greater ACTH levels than LAR group at 45 and 90 min post-IMO ( $P$  at least  $<0.003$ ). The two-way ANOVA of corticosterone levels on day 1 (Fig. 4B) revealed significant effects of group ( $P<0.001$ ), but no interaction sampling time by group. Appropriate comparisons revealed that HAR, but not IAR, rats showed greater overall corticosterone levels

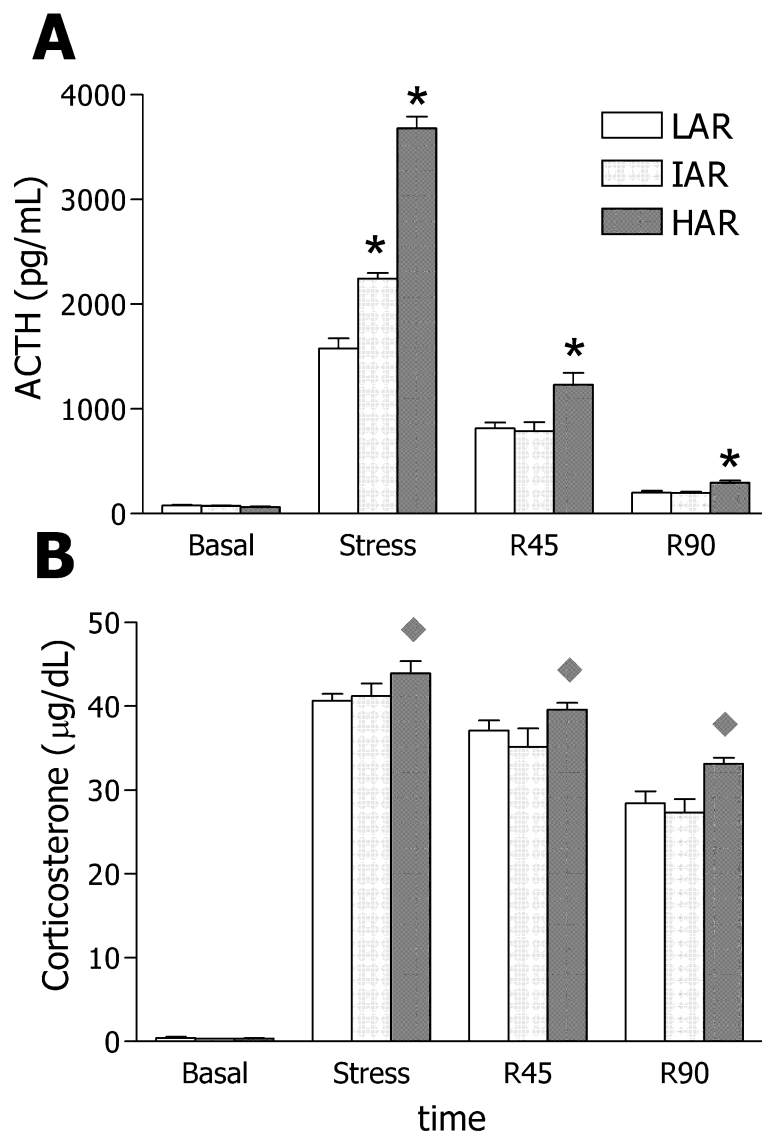
than LAR rats, that included the 90 min post-IMO period, when corticosterone levels in LAR and IAR were similar, but HAR showed greater levels ( $P<0.02$  vs LAR). No effect of group was observed regarding glucose levels on day 1 (not shown).

The effects of LAR, IAR and HAR groups on ACTH levels observed immediately after IMO or on ACTH AUCs over the course of chronic stress were similar, the ANOVAs revealing significant effects of group (After IMO:  $F(2,27)=11.12$ ; AUC:  $F(2,27)=11.86$ ) and the interaction days by group (After IMO:  $F(8,108)=8.58$ ; AUC:  $F(8,108)=11.87$ ;  $P<0.001$  in all cases). Further comparisons will be indicated only for AUCs (Fig. 5A): on day 1, differences amongst the three groups were significant; on day 4 both IAR and HAR groups showed significantly greater ACTH response than LAR rats; on day 7 and 10 only HAR rats showed a greater response than LAR rats; and finally, on day 13 the difference between HAR and LAR rats was only marginally significant ( $P=0.09$ ). Regarding the effect of LAR, IAR and HAR groups on corticosterone AUCs over the days, a significant effect of group was observed ( $F(2,27)=5.49$ ;  $P<0.010$ ), the HAR rats showing greater plasma corticosterone levels than LAR over the days (Fig. 5B), in contrast to ACTH results. No effect of such groups on glucose AUCs over the days was observed (not shown). Essentially the same conclusion was achieved when corticosterone or glucose levels immediately after IMO instead of AUCs were studied.

No differences amongst LAR, IAR and HAR groups were found in the thymus or adrenal weights or in the GR levels in the hippocampal formation. However, the group significantly affected CRF mRNA in the PVN (one-way ANOVA,  $F(2,24)=3.46$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 5C), additional comparisons revealing that both LAR and IAR groups showed similar levels of expression, but that of HAR was marginally higher than LAR ( $P=0.059$ ).

When the animals were classified on the basis of plasma glucose levels immediately after IMO (LGR, IGR and HGR), the two-way ANOVA of glucose response on day 1 revealed significant effects of group ( $F(2,27)=24.03$ ) and the interaction sampling time by group ( $F(6,81)=10.00$ ;  $P<0.001$  in the two cases). Further comparisons showed that both IGR and HGR groups significantly differed from LGR group immediately after IMO and at the two post-IMO periods ( $P$  at least  $<0.03$ ). The two-way ANOVAs revealed significant effect of group (after IMO:  $F(2,27)=18.73$ ; AUC:  $F(2,27)=15.15$ ), but not interaction group by days, on plasma glucose levels observed immediately after IMO or glucose AUCs ( $P<0.001$  in both cases) upon repeated exposure to IMO. Further comparisons showed that both IGR and HGR differed from LGR independently of days in glucose levels immediately after IMO ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ , respectively) or in glucose AUCs ( $P<0.007$ ,  $P<0.001$ , respectively). No differences amongst groups were observed either in the response of HPA hormones to the first IMO or in the rate of adaptation to repeated IMO.

When the criteria to classify the animals was the decline in ACTH or glucose levels from immediately after IMO



**Fig. 4.** Individual differences in the response of the HPA hormones to the first exposure to IMO. The animals were split into three groups in function of their plasma ACTH levels immediately after IMO. Means and S.E.M. ( $n=10$  per group) of basal, stress and post-stress levels of ACTH and corticosterone are represented. \*  $P$  at least  $<0.05$  vs LAR under the same sampling period. ♦ Significant overall effect of HAR vs LAR group as revealed by the ANOVA.

to 45 min post-IMO on day 1, it was observed that those animals showing greater ACTH levels immediately after IMO were those showing a stronger decline, so that similar groups were obtained with the two criteria. Regarding glucose, the animals showing the greatest plasma glucose levels immediately after IMO were those showing the strongest post-IMO decline, whereas the other two groups behaved similarly. However, no additional significant information was obtained using the post-stress decline in glucose and therefore the results will not be further commented on.

## DISCUSSION

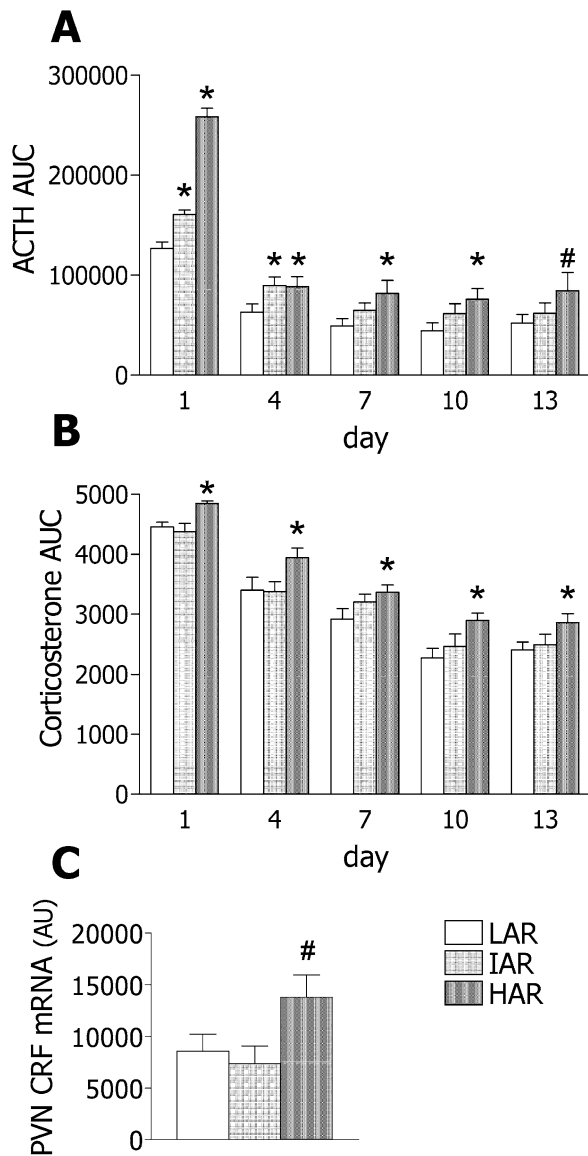
The present results indicate that peripheral HPA hormones are very sensitive to previous experience of animals with a

severe stressor such as IMO in that a progressive reduction of plasma ACTH, corticosterone and glucose levels were observed after repeated exposure, when also taking into account the post-IMO period. Whereas individual differences in the ACTH response to the first exposure to IMO eventually disappeared after repeated stress, those of corticosterone and glucose were more sustained. Interestingly, plasma ACTH response to IMO on day 1 correlated with chronic IMO-induced increase in tonic CRF gene expression in the PVN, suggesting that such response on day 1 partially predicted the future impact of chronic stress.

### The overall pattern of response to repeated stress

The results obtained in control animals indicate that blood sampling caused almost undetectable increases





**Fig. 5.** Individual differences in the daily response of HPA hormones (AUCs) to repeated IMO and the CRF mRNA (arbitrary units, AU) on the day after the last exposure to IMO. The animals were split into three groups in function of their plasma ACTH levels immediately after the first exposure to IMO. Means and S.E.M. ( $n=10$  per group) are represented. \*  $P$  at least  $<0.05$ ; #  $0.10 > P > 0.05$  vs LAR group.

in plasma ACTH levels and more consistent changes in corticosterone. The response of corticosterone declined after the first day, suggesting that the animals adapted very quickly to the blood sampling procedure. Repeated IMO caused prototypical physiological changes when compared with controls: reduction of food intake, body weight gain and thymus weight, adrenal hypertrophy (with regard to body weight) and increased basal corticosterone levels (Taché et al., 1978; Armario et al., 1988, 1990; Ottenweller et al., 1992; 1994; Martí et al., 1993; Martí and Armario, 1997). Hormonal response to the first exposure to IMO was characterised by a strong release of ACTH and a prolonged release of corticoste-

rone, in accordance with previous results using the same stressor (García et al., 2000; García and Armario, 2001; Martí et al., 2001; Márquez et al., 2002). Daily repetition of the stressor resulted in lower ACTH levels just after the stressor on day 4 and thereafter, as compared with day 1. These results indicate that 3 days of previous experience with IMO was enough to substantially reduce the AUC of ACTH response to IMO. However, from days 4–13, only modest further reductions were observed. Adaptation to a repeated stressor appears to have two phases, one of fast slope (the first few days) and another of slow slope (from days 4–13), and therefore is not a linear function of the degree of previous experience with the situation. Apparently, a plateau is achieved, suggesting that may be adaptive for the animals to maintain a partial response, at least to severe stressors. The pattern of plasma corticosterone response to chronic IMO as measured immediately after the stressor was in accordance with our previous results (García et al., 2000) and far more complex than that of ACTH, but can be explained by the interaction of two factors acting on opposite directions (see Martí and Armario, 1998): (i) the development of an enhanced adrenal responsiveness to circulating ACTH in chronically stressed animals; and (ii) the reduction of the ACTH response in repeatedly stressed animals. Despite the complex initial corticosterone response to IMO, repeated exposure to the stressor caused a consistent and progressive reduction of plasma corticosterone during the post-IMO period, confirming that the post-stress period is exquisitely sensitive to previous experience with the stressor (García et al., 2000; Martí et al., 2001).

Repeated exposure to IMO resulted in a tonic increase in mRNA for CRF in the PVN and a reduction of mRNA for GR in CA1 and DG. It is generally agreed that chronic exposure to a wide range of stressful situations increases mRNA for CRF in the PVN (Imaki et al., 1991; Mamalaki et al., 1992; Sawchenko et al., 1993; Herman et al., 1995; Makino et al., 1995; Martí et al., 1999) and decreases GR binding and mRNA in the hippocampal formation (Sapolsky et al., 1984; Martí et al., 1994; Herman et al., 1995; Makino et al., 1995; Gómez et al., 1996; however, see Mamalaki et al., 1992; Herman and Spencer, 1998). Whether the tonic increase in CRF mRNA or the reduction in GR mRNA is a consequence of the last exposure to the stressor or the cumulative impact of successive exposures is not clear at present.

The hyperglycaemia observed immediately after the stressor was clearly reduced by repeated exposure to IMO, whereas changes in post-IMO levels of glucose were less affected. The reduction of plasma glucose response to repeated stress is very consistent in the literature (Armario et al., 1988, 1990; Lachuer et al., 1994; Martí and Armario, 1997), even in those conditions where no adaptation of the HPA axis was found (Martí and Armario, 1997; Dal-Zotto et al., 2002). As stress-induced hyperglycaemia appears to be strongly related to adrenaline release, the present results support previous data suggesting that adrenaline release is a sensitive marker of adaptation to repeated

stress (Cox et al., 1985; Konarska et al., 1989; Dobrakovova et al., 1993).

### Correlation between variables

In control animals, relative adrenal weight showed a good correlation with the corticosterone AUCs after tail-nick on all days, whereas in chronic IMO rats relative adrenal weight only correlated with plasma corticosterone levels just after IMO on day 1, but not thereafter. This suggests that adrenal weight is related to both corticosterone responsiveness to modest and brief increases in ACTH levels (i.e. after tail-nick) and maximal secretory capability of the adrenal under very high ACTH levels (i.e. immediately after the first IMO).

In IMO rats, lower correlations were observed between ACTH AUC on day 1 and those of the other days than amongst those from days 4–13. Similar results were obtained with the corticosterone AUCs, suggesting that mechanisms governing ACTH and corticosterone responses to the first exposure to IMO may have been changed by previous experience with the stressor. It should be also noted that the correlations between the ACTH and corticosterone AUCs were usually low. Since weak correlations between ACTH and corticosterone AUCs from days 4–10 cannot be attributed to a saturation of adrenocortical secretion, extra-ACTH mechanisms governing adrenocortical secretion under stress appear to exist, i.e. neural inputs to the adrenal (Vinson et al., 1994). This neural stimulatory signal may be progressively reduced by previous experience with the stressor, thus resulting in a better correlation between corticosterone and ACTH.

A good correlation was usually observed between glucose AUCs over the days, with no evidence for a change from day 1 to the next days. In contrast, the correlations with the corresponding ACTH AUCs, although significant, were low. These data suggest, in accordance with previous results obtained in acute stressful situations (Márquez et al., 2002), that mechanisms governing plasma glucose release during stress are in great part different from those controlling the HPA axis. Hyperreactivity of the SMA system (assuming that glucose is a reflection of adrenaline release under stress) and the HPA axis are therefore not necessarily linked. In addition, our data suggest that glucose response during the first exposure to a stressor might be a relatively good predictor of the glucose response over the days.

### Individual differences in the response to stress

The present results indicate that plasma ACTH levels measured immediately after the exposure to a stressor, even if it is so severe as IMO, appear to be a reflection of the overall reactivity of the HPA axis. Thus, when the animals were divided into three groups (LAR, IAR and HAR) on the basis of the above criterion, the animals displaying the greatest ACTH levels immediately after IMO (HAR) also showed the greatest ACTH and corticosterone levels during the post-IMO period. This overall greater reactivity to stress was observed despite the fact that the post-stress

recovery of ACTH, as evaluated by the decline from time 0–45 after the termination of IMO, was positively related to plasma ACTH levels immediately after IMO. Whether this was due to exhaustion of the corticotropes or other intrinsic properties of the HPA axis remains to be studied. Upon repeated exposure to the same stressor, the initial difference in ACTH progressively vanished so that only marginal differences between HAR and LAR groups were observed on day 13. It is noteworthy that differences in ACTH response progressively decreased during the post-IMO period on day 1 and over the days, whereas differences in corticosterone were more sustained. This again reflects a partial dissociation between the two hormones, confirming the correlational results.

The present results that plasma corticosterone in the post-IMO period (90 min) appears to be related to the initial ACTH response to the stressor is in contrast with our previous data (García and Armario, 2001) where no such relationship was found. Since in the latter work ACTH levels were measured after 2 h of exposure to IMO, it may be that ACTH differences between groups would disappear after prolonged exposure to a severe stressor, perhaps due to exhaustion of ACTH stores (Rivier and Vale, 1987). Such differences may appear again with the lower degree of activation of the pituitary in the post-stress period. If this hypothesis is correct, the sampling time chosen may be critical to reveal individual differences in responsiveness to stress, particularly when the response to severe stressors is studied.

Individual differences in the post-stress recovery of corticosterone have been related to the novelty-seeking trait, as measured by motor activity in novel environments (Piazza et al., 1991; Dellu et al., 1996), the susceptibility to drug self-administration (Piazza et al., 1991; Dellu et al., 1996) and cognitive deficits in old age (Meaney et al., 1991). However, in some cases only corticosterone levels were measured so it is unclear whether these differences are related to the initial ACTH release or, more specifically, with an actual low capability to shut off the HPA response after stress. On the basis of the results obtained in Meaney's laboratory studying the long-lasting effects of maternal care or post-natal manipulations on the responsiveness of the HPA axis to stress in adult rats, changes in the post-stress recovery of the HPA hormones are accompanied by similar changes in the ACTH levels immediately after the stressor (e.g. Viau et al., 1993; Shanks et al., 1995; Liu et al., 1997). Therefore, no evidence for individual differences in the capability to shut off the HPA response independently of the magnitude of the initial response is available at present. Apparent changes in the post-stress recovery of corticosterone can be explained by the saturation of the adrenal with relatively low levels of ACTH, so that a greater ACTH response to a severe stressor is reflected in corticosterone levels only when low-intermediate levels of ACTH are achieved in the post-stress period.

To what extent a greater HPA activation during the first exposure to a stressor may be predictive of the response to repeated exposures? Our results suggest that by re-

peating exposure to the same stressor, individual differences in stress-induced HPA activation are reduced rather than exacerbated and therefore, the strong inhibitory signals generated by the previous experience with the situation are dominant over initial individual differences. Nevertheless, the influence of such repeated experience with the stressor to reduce individual differences was more evident on ACTH than on corticosterone, suggesting that corticosterone response is a more reliable marker of individual differences in the response to stress than ACTH after chronic repeated stress. Our results are in line with those reported previously using lower intensity stressors and a single time point measurement of plasma corticosterone (Natelson et al., 1988). In addition, our data indicate that individual differences in the HPA and glucose responses were not related, suggesting that different underlying mechanisms govern both systems.

CRF mRNA levels in the PVN on the day after the last exposure to IMO moderately correlated with both ACTH levels immediately after IMO and ACTH AUC on day 1, suggesting that tonic increase in CRF gene transcription after repeated stress may be partially predicted by the initial response to the stressor. Interestingly, only the HAR group tended to have greater CRF mRNA levels at the end of the chronic stress protocol with regard to LAR rats, whereas the IAR behaved similarly to LAR. The lack of correlation of CRF gene transcription with the ACTH responses from days 4–13, may be explained by the fact that the contribution of the post-IMO period versus the response during exposure to the stressor to the AUCs was much lower than on day 1 than on successive days. Therefore, a more detailed time point measurement of ACTH during exposure to IMO could unmask such correlation.

### Main conclusions

The present results suggest that upon repeated exposure to the same stressor the animals present an initial (few days) pronounced adaptation, followed by a much slower slope phase. Individual differences in the HPA and glucose responses were poorly related. In addition, such individual differences in the first encounter with the stressor progressively declined, although the effect of repeated experience with the stressors affected more ACTH than corticosterone or glucose responses. Despite progressive disappearance of individual differences in the HPA axis after chronic IMO, the tonic stress-induced increase in the transcriptional activity of the CRF gene in the PVN correlated with individual differences in the response to the first encounter with the stressor, suggesting that such individual differences did have an impact on the activity of the HPA axis. The bases for individual differences in the responsiveness of the HPA axis to stress within normal populations may reside either in genetic or earlier (foetal environment, motherhood style) epigenetic factors, but the precise mechanisms involved are poorly characterised.

*Acknowledgements*—This work was supported by grants from the Delegación del Gobierno Plan Nacional Drogas (Ministerio del Interior) and 2001SGR-00203. We thank Dr. W. C. Engeland

(Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) for his ACTH antiserum and Dr. O. Martí and Dr. A. Vallès for their technical assistance with *in situ* hybridisation.

### REFERENCES

- Armario A, Castellanos JM (1984) A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev Esp Fisiol* 40:437–441.
- Armario A, Gavaldà A, Martí J (1995) Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20:879–890.
- Armario A, Hidalgo J, Giralt M (1988) Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47:263–267.
- Armario A, Martí J, Gil M (1990) The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15:341–347.
- Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J (1985) Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci* 36:2085–2092.
- Cox RH, Hubbard JW, Lawler JE, Sanders BJ, Mitchell VP (1985) Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. *J Appl Physiol* 58:1207–1214.
- Dal-Zotto S, Martí O, Armario A (2002) Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav Brain Res* 129:187–195.
- Dellu F, Piazza PV, Mayo W, Le Moal M, Simon H (1996) Novelty-seeking in rats: biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34:136–145.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1993) Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels—a comparison between Sprague–Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 616:89–98.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1997) Adaptation to prolonged or repeated stress—comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65:360–368.
- Dobráková M, Kvetnansky R, Oprsalova Z, Jezova D (1993) Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18:163–174.
- García A, Armario A (2001) Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague–Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26:363–374.
- García A, Martí O, Vallès A, Dal-Zotto S, Armario A (2000) Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress: effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72:114–125.
- Gómez F, Lahmame A, de Kloet ER, Armario A (1996) Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 63:327–337.
- Herman JP, Adams D, Prewitt C (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology* 6:180–190.
- Herman JP, Spencer R (1998) Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression *in vivo*. *J Neurosci* 18:7462–7473.
- Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W (1991) Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 11:585–599.
- Keller-Wood ME, Shinsako J, Keil LC, Dallman MF (1981) Insulin-

- induced hypoglycemia in conscious dogs: I. dose-related pituitary and adrenal responses. *Endocrinology* 109:818–824.
- Konarska M, Stewart RE, McCarty R (1989) Habituation of sympathetic-adrenal medullary responses following exposure to chronic intermittent stress. *Physiol Behav* 45:255–261.
- Lachuer J, Delton I, Buda M, Tappaz M (1994) The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 638:196–202.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659–1662.
- Makino S, Smith MA, Gold PW (1995) Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136:3299–3309.
- Mamalaki E, Kvetnansk R, Brady L, Gold PW, Herkenham M (1992) Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain. *J Neuroendocrinol* 4:689–699.
- Márquez 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* 926:181–185.
- Martí O, Armario A (1997) Influence of regularity of exposure to chronic stress on the pattern of habituation of pituitary-adrenal hormones, prolactin and glucose. *Stress* 1:179–189.
- Martí O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16:241–260.
- Martí O, García A, Vallès A, Harbuz MS, 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* 13:129–136.
- Martí O, Gavaldà A, Gómez F, Armario A (1994) Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology* 60:1–7.
- Martí O, Gavaldà A, Jolín T, Armario A (1993) Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* 18:67–77.
- Martí O, Harbuz MS, Andrés R, Lightman SL, Armario A (1999) Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomized rats: potentiation by chronic stress. *Brain Res* 821:1–7.
- Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A (1991) The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16:85–103.
- Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wikstrom A-C, Gustafson JA, Yamamoto KR (1986) Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 46:389–399.
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 43:41–46.
- Ottenweller JE, Servatius RJ, Natelson BH (1994) Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. *Physiol Behav* 55:337–340.
- Ottenweller JE, Servatius RJ, Tapp WN, Drastal SD, Bergen MT, Natelson BH (1992) A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiol Behav* 51:689–698.
- Piazza PV, Maccari S, Deminière J-M, Le Moal M, Mormède P, Simon H (1991) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2088–2092.
- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH (1990) Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. *Behav Neurosci* 104:28–36.
- 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* 121:1320–1328.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1984) Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology* 114:287–292.
- Sawchenko PE, Arias CA, Mortrud MT (1993) Local tetrodotoxin blocks chronic stress effects on corticotropin-releasing factor and vasopressin messenger ribonucleic acids in hypophysiotropic neurons. *J Neuroendocrinol* 5:341–348.
- Shanks N, Larocque S, Meaney MJ (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *J Neurosci* 15:376–384.
- Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW (1989) A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Histochemol* 12:169–181.
- Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL (1989) A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4771–4775.
- Taché Y, Du Ruisseau P, Ducharme JR, Collu R (1978) Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* 26:208–219.
- Uehara A, Habara Y, Kuroshima A, Sekiya C, Takasugi Y, Namiki M (1989) Increased ACTH response to corticotropin-releasing factor in cold-adapted rats in vivo. *Am J Physiol* 257:E336–E339.
- van Raaij MT, Dobbe CJ, Elvers B, Timmerman A, Schenk E, Oortgiesen M, Wiegant VM (1997) Hormonal status and the neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving sub-chronic noise exposure. *Neuroendocrinology* 65:200–209.
- Viau V, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. *J Neurosci* 13:1097–1105.
- Vinson GP, Hinson JP, Tóth IE (1994) The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 6:235–246.

### **CAPÍTULO 3: Estudio de la consistencia de la respuesta del eje HPA tras la exposición a estímulos estresantes de intensidad moderada.**

Publicación:

Cristina Márquez, Roser Nadal, Antonio Armario (2005) Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30, 179-187.





# Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats

Cristina Márquez<sup>a,b</sup>, Roser Nadal<sup>a,c</sup>, Antonio Armario<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>*Institut de Neurociències, Facultat de Ciències, Unitat de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, (08193) Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup>*Facultat de Ciències, Unitat de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, (08193) Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>c</sup>*Facultat de Psicologia, Unitat de Psicobiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, (08193) Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 27 February 2004; received in revised form 27 May 2004; accepted 29 May 2004

## KEYWORDS

ACTH;  
Corticosterone;  
Defecation;  
Elevated plus-maze;  
Hole-board;  
Circular corridor

**Summary** Susceptibility to some stress-induced pathologies may be strongly related to individual differences in the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis to stressors. However, there have been few attempts in rodents to study the reliability of the individual differences in the responsiveness of the HPA to stressors and the relationship to resting corticosterone levels. In the present work, we used a normal population of Sprague-Dawley rats, with a within-subject design. Our objectives were to study: (a) the reliability of the ACTH and corticosterone response to three different novel environments widely used in psychopharmacology and (b) the relationship between stress levels of HPA hormones and the daily pattern of corticosterone secretion (six samples over a 24-h-period). Animals were repeatedly sampled using tail-nick procedure. The novel environments were the elevated plus-maze, the hole-board and the circular corridor. Animals were sampled just after 15 min exposure to the tests and again at 15 and 30 min after the termination of exposure to them (post-tests). The hormonal levels just after the tests indicate that the hole-board seems to be more stressful than the circular corridor and the elevated plus-maze, the latter being characterized by the lowest defecation rate. Correlational analysis revealed that daily pattern of resting plasma corticosterone levels did not correlate to HPA responsiveness to the tests, suggesting no relationship between resting and stress levels of HPA hormones. In contrast, the present study demonstrates, for the first time, a good within-subject reliability of the ACTH and corticosterone responses to the three environments, suggesting that HPA responsiveness to these kind of stressors is a consistent individual trait in adult rats, despite differences in the physical characteristics of the novel environments.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-581-1664; fax: +34-93-581-2390.  
E-mail address: antonio.armario@uab.es (A. Armario).

## 1. Introduction

It is well-accepted in humans that there are major individual differences in susceptibility to psychiatric pathologies and stress-related pathological processes. Unfortunately, our knowledge of the biological bases of such susceptibility is hampered by obvious limitations of conducting research in humans. Thus, characterization of individual differences in animals (i.e. rodents) may help to find the origin of susceptibility in humans. To date, neurobiological bases of individual differences in rodents have been mainly focused on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, one of the prototypical stress systems, and its relationship to behavioral traits such as fear/anxiety and novelty-seeking (attraction for novelty) (Dellu et al., 1996; Kabbaj et al., 2000; Landgraf and Wigger, 2003; Steimer and Driscoll, 2003). This interest relies on the major role of the final hormones of the HPA axis, glucocorticoids, in stress-induced pathologies.

However, before establishing a putative relationship between HPA responsiveness to stress and particular behavioral traits, it is important to know whether or not we can reliably evaluate individual differences in responsiveness to stress so that we can define hypo or hyperresponsive phenotypes. In humans, a low to good within subject reliability of the response of the HPA axis to stress has been found (for a review, see Cohen and Hamrick, 2003). However, it is surprising that, to our knowledge, there is no study on this topic in rodents despite the vast literature dealing with the relationship between behavioral traits (i.e. anxiety) and HPA responsiveness. The lack of a consistent individual HPA response to stressors could, at least in part, explain the controversial results regarding HPA activity and behavioral traits (Abel, 1991; Brush, 1991; Dellu et al., 1996; Kabbaj et al., 2000; Landgraf and Wigger, 2003; Steimer and Driscoll, 2003).

Exposure to novel environments is a common procedure used to evaluate some behavioral traits in rodents. The behavior of animals in such environments is the result of the interaction of several factors, including activity, motivation to explore and fear/anxiety. Since exposure to novel environments generates fear/anxiety in animals and is stressful as evaluated by the activation of the HPA axis (Pellow et al., 1985; Misslin and Cigrang, 1986; Appenrodt et al., 1999), to appropriately define the influence of fear/anxiety in the behavior of animals in these environments it is important to characterize the degree of stress experienced by them. Circulating levels of ACTH and corticosterone, the two peripheral hormones of the HPA axis, are, under appropriate conditions, positively

related to the intensity of the stressors (Hennessy and Levine, 1978; Armario et al., 1986; De Boer et al., 1990) and therefore can give us objective information about the stressful properties of the different tests. However, because of the approximately 15 min delay between ACTH release and the subsequent optimum activation of the adrenal cortex, and because of the saturation of adrenal capability to synthesize corticosteroids with moderate levels of ACTH (Keller-wood et al., 1981), it is important to follow circulating levels of the two hormones for a time after the termination of stress to avoid apparent discrepancies between the two hormones.

On the basis of the above, the aim of the present work was to study resting levels of corticosterone over a 24-h-period and the HPA response of adult male Sprague-Dawley rats to 15 min of exposure to various novel environments, with the purposes of characterizing: (a) the degree of stress elicited by some novel environments commonly used to characterize behavioral traits in rodents; (b) the reliability of individual differences in the stress response of the HPA axis elicited by such novel environments; and (c) the relationship between resting and stress levels of HPA hormones.

## 2. Methods

### 2.1. Animals and general procedure

Eighteen male Sprague-Dawley rats from the breeding centre of the Universitat Autònoma de Barcelona, 55 days old at the beginning of the experiment, were used. They were housed two per cage in standard conditions of temperature ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) and on a 12-12 h light-dark schedule (lights on at 7 am). Food and water were provided *ad libitum*. Cages were cleaned twice a week. The experimental protocol was approved by the committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona and was carried out in accordance the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

During the second week after their arrival, all animals were handled three times (every other day) and then, blood samples were taken under basal conditions by tail-nick to obtain resting hormone levels and habituate the animals to the sampling procedure. Eight days later, exposure to three different novel environments started. Over 6 days, all rats were exposed to hole-board, elevated plus-maze and circular corridor for 15 min. One rat from each cage was tested on one day and the other one



the next day to avoid any influence of handling the cages and cohort removal. We used a counter-balanced design so that on a particular day, three rats were exposed to either the hole-board, or the elevated plus-maze or the circular corridor, and throughout 6 days, every rat was tested in the three environments. Blood samples were taken by tail-nick immediately after the test and at 15 and 30 min post-tests, to evaluate the HPA response to the novel environments. Basal samples prior to the tests were not taken in order to prevent possible interferences with behavioral and hormonal response. Two resting days were left between each test. Ten days after the last exposure to novel environments, rats were repeatedly sampled over a 24-h-period at 10, 15, 19, 23, 03 and 09 h. Whenever resting levels were studied, the two rats of a cage were simultaneously sampled. The tail nick consisted of gently wrapping the animals with a cloth, making a 2 mm incision at the end of one of the tail arteries and then massaging the tail while collecting 300  $\mu$ l of blood, within 2 min, into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). Within the same day, repeated samples were obtained making only one incision.

## 2.2. Novel environments

The circular corridor consisted of a circular arena (80 cm diameter  $\times$  34 cm high) with a cylinder inside (44 cm  $\times$  34 cm), forming a corridor 18 cm wide. Activity in the circular corridor has been used to measure novelty-seeking (Dellu et al., 1993, 1996). Both the hole-board and the elevated plus-maze have been used to evaluate anxiety and the effects of anxiolytic drugs, although the latter test is presently the most accepted (File, 1985; Kulkarni and Sharma, 1991; Pellow et al., 1985). The hole-board (File and Wardill, 1975) consisted of a white rectangular box (62 cm  $\times$  53 cm  $\times$  28 cm high) with a floor divided into 16 equal squares, containing four holes (diameter 4.5 cm). Two holes were empty and the other two had inside an orange plastic ball (novel for the rats). Each animal was placed initially in the periphery of the apparatus facing the wall. The elevated plus-maze (Pellow et al., 1985) consisted of four white wooden arms (formica) at right angles to each other, connected to a central square. The apparatus was elevated 50 cm above the floor. Two of the opposite arms had high walls (enclosed arms, 42 cm high) whereas the other two were the open arms that had a 0.7 cm ridge to provide an additional grip. Defecation rate during the total 15 min were measured in the three tests. The apparatuses were carefully cleaned between

animals with a 5% ethanol solution, and the test illumination was 40 W in all cases.

## 2.3. Biochemical analysis

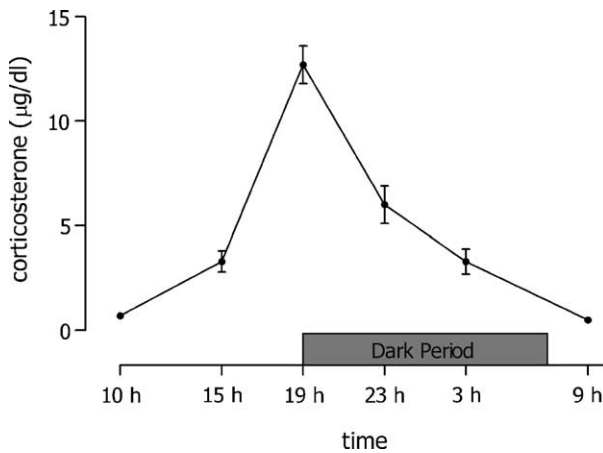
Plasma corticosterone were measured by radioimmunoassay (RIA) as described previously (Armario and Castellanos, 1984) with two modifications: the antiserum used was obtained in sheep against corticosterone-3-CMO-urease (Chemicon Int., Temecula, CA, USA) and corticosterone-binding-globulin was denaturated by tripsine method (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). Serum ACTH was measured by a double-antibody RIA using 125I-ACTH (Amersham, Spain) as the tracer, rat synthetic ACTH 1-39 (Sigma, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb 7) kindly provided by Dr W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). All samples to be compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was of 8% for corticosterone and 5% for ACTH.

## 2.4. Data analysis

The area under the curve (AUC) of plasma hormone levels, either during the 24-h-period or in response to the tests, was calculated with Graph Pad Prism (version 3.02) that computes the AUC using the trapezoid rule. The 'statistical package for social science' (SPSS) program was used (version 11 for Windows). One-way within-subject ANOVAs were performed to compare ACTH, corticosterone and defecation rate among the three novel environments, one-way within-subject ANOVA to confirm circadian pattern of plasma corticosterone and two-way within-subject ANOVAs to study the effect of days of experience with the procedures and blood sampling time. Pearson correlations (two tailed) were also used. The probability level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

The one-way ANOVA of the 24 h resting corticosterone levels revealed a significant effect of time of day ( $F(5,85) = 60.19$ ,  $p < 0.001$ ), with the expected peak of corticosterone just after lights off (Fig. 1). Exposure to the three novel environments for 15 min elicited a highly significant increase in plasma levels of HPA hormones measured immediately after the tests when compared to basal levels (Fig. 2). More importantly, one-way ANOVAs of

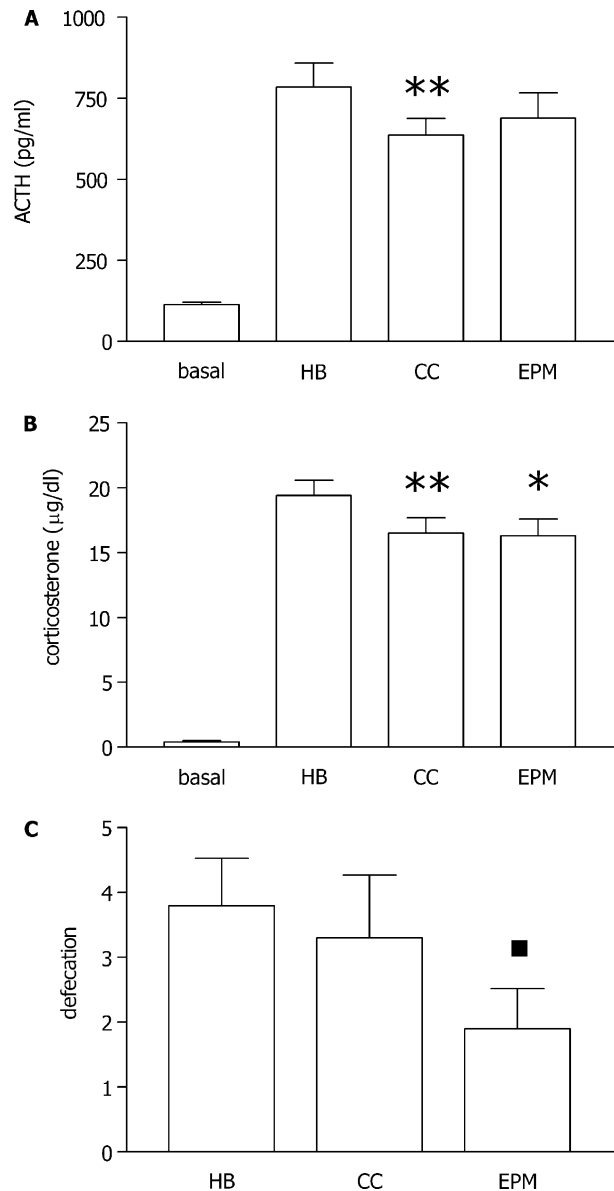


**Figure 1** Circadian pattern of resting levels of plasma corticosterone. Means and SEM ( $n=18$ ) are represented. A highly significant effect of time of day was found (one-way ANOVA,  $p<0.001$ ).

plasma levels of ACTH and corticosterone immediately after the tests revealed significant effect of the type of test:  $F(2,34)=3.32$ ,  $p<0.05$ ; and  $F(2,34)=4.16$ ,  $p<0.025$ , respectively. Further comparisons showed that exposure to the hole-board elicited a greater ACTH response than the circular corridor ( $p<0.02$ ). Similarly, plasma corticosterone levels were greater after exposure to the hole-board than after the elevated plus-maze ( $p<0.04$ ) or the circular corridor ( $p<0.003$ ).

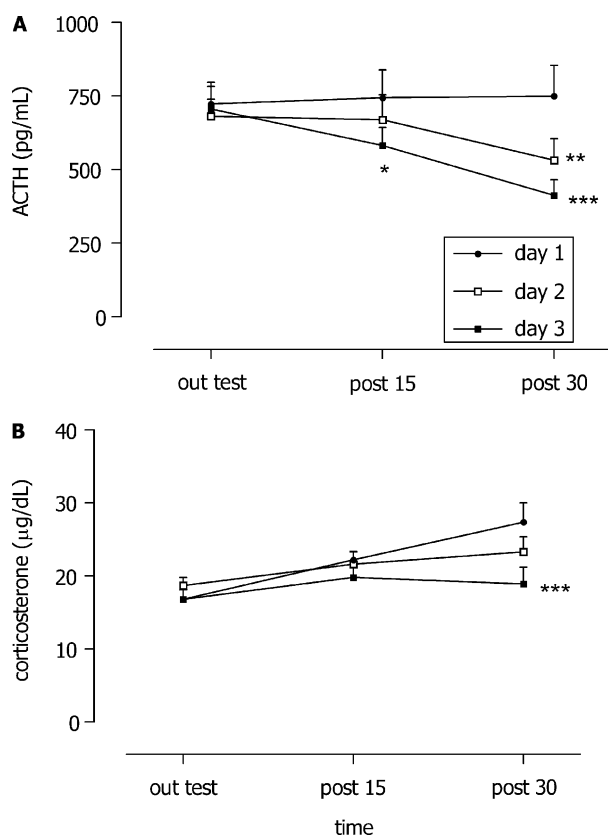
An ANOVA with day and blood sampling time as within subject factors was used to study the influence of the previous experience with the procedures (novel environments plus blood sampling), obviating the previously found small differences in HPA response to the three novel environments. For ACTH (Fig. 3) we found a significant effect of day ( $F(2,68)=8.16$ ,  $p<0.001$ ), sampling time ( $F(2,68)=5.42$ ,  $p<0.01$ ) and of interaction day by sampling time ( $F(4,68)=4.93$ ,  $p<0.002$ ). Similar results were found for corticosterone: significant effects of day ( $F(2,68)=6.47$ ,  $p<0.001$ ), sampling time ( $F(2,68)=14.85$ ,  $p<0.001$ ) and of interaction day by sampling time ( $F(4,68)=4.82$ ,  $p<0.002$ ). Further decomposition of the interactions revealed that at the 15 min post-tests, rats showed lower ACTH levels on day 3 as compared to day 1 ( $p<0.04$ ) and at 30 min post-tests, lower ACTH levels were observed on day 2 and 3 as compared to day 1 ( $p<0.002$  and  $p<0.001$ , respectively). Regarding corticosterone, at 30 min post-test, corticosterone levels were lower on day 3 as compared to day 1 ( $p<0.001$ ).

To study the relationship between ACTH and corticosterone release and the reliability of the HPA response to novel environments, a correlational



**Figure 2** Effects of 15 min exposure to different novel environments on: plasma ACTH levels (panel A), plasma corticosterone levels (panel B) and defecation rate (panel C). Means and SEM ( $n=18$ ) are represented: basal levels (obtained some days before the tests); HB, hole board; CC, circular corridor; EPM, elevated plus maze; \* $p$  at least  $<0.05$ ; \*\* $p<0.003$  vs. the HB; ■ $p<0.05$  vs. the other two novel environments (differences with respect to basal levels were always highly significant and are not indicated).

study was done (Table 1). This was performed with the hormone levels obtained just after the novel environment exposure, but also with the AUC of the response, which included two post-test periods. The rationale for this was that ACTH and corticosterone levels observed just after the tests were not influenced either by stress associated with previous blood sampling or by previous experience with



**Figure 3** Effects of days of experience with exposure to novel environments and sampling procedures on plasma ACTH and corticosterone levels. Means and SEM ( $n=18$ ) are represented. The same animals were repeatedly exposed to similar treatments from day 1 to 3 (see text) and samples were taken just after the tests (out test) and at 15 and 30 min post-test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.002$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. day 1 values within the same sampling time.

the procedure, as is the case with post-test samples included in the AUCs. However, because of the certain delay between ACTH and corticosterone secretion, the AUCs could give us more precise information when correlating ACTH and corticosterone responses within the same situation. In addition, to study the relationship between resting levels of corticosterone and HPA responsiveness to

stress the inclusion of the AUCs appears to be appropriate.

Correlations between ACTH or corticosterone levels just after each test and the corresponding AUCs were very homogeneous and highly significant (ranging between 0.82 and 0.86, always  $p < 0.001$ ), indicating that, for both hormones, plasma levels just after the tests were a good reflection of the overall response. Within each test, correlation between ACTH and corticosterone was higher when using the AUC than the levels just after the tests (Table 1). The correlation between the ACTH or corticosterone responses to the three tests are depicted in Table 2. Significant correlations among the ACTH levels just after the tests were found and those using the AUCs were a little bit higher. Regarding corticosterone, the correlations between the levels just after the tests were not consistent, but those using AUCs were.

Correlation between resting levels of corticosterone (plasma levels at 10 am, plasma levels at 19 pm or the 24 h AUC) and ACTH or corticosterone responses to the tests, either taking into account the hormone levels just after the tests or the AUCs were always non-significant (not shown).

Defecation rate in the three tests was compared using one-way ANOVA, which revealed a significant effect of the tests:  $F(2,34) = 3.59$ ,  $p < 0.04$ . Further comparisons showed (Fig. 2) that defecation in the elevated plus-maze was lower than in the hole-board ( $p < 0.04$ ) and the circular corridor ( $p < 0.05$ ). Defecation rate in the hole-board and the circular corridor negatively correlated to respective plasma corticosterone levels, particularly at 15 min post-tests ( $r = -0.59$ ,  $p < 0.01$  and  $r = -0.52$ ,  $p < 0.05$ , respectively), whereas defecation in the elevated plus-maze, which was low, did not.

### 4. Discussion

The present study evaluates both the reliability and the degree of activation of the HPA axis in rats exposed to three different novel environments widely used to characterize behavior (hole-board, elevated plus-maze and circular corridor). To our knowledge, this is the first study of reliability of the HPA responsiveness to stressors in rodents and of direct comparison of the stressful properties of these three commonly used tests. Our data suggest a good reliability of individual differences in the responsiveness of the HPA axis to stressors and minor differences among the different novel environments in the degree of stress they elicited.

**Table 1** Pearson correlation coefficients between ACTH and corticosterone levels after the tests or with AUCs.

	Test levels	AUCs
CC	0.59**	0.63**
EPM	0.51*	0.59**
HB	0.40#	0.59**

*r*-values are expressed ( $n=18$ ). #marginal; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; CC, Circular Corridor; EPM, Elevated Plus-Maze; HB, Hole Board.

**Table 2** Pearson correlation coefficients between ACTH or corticosterone (B) levels of the different behavioral tests.

	Test ACTH			Test B	
	EPM	HB		EPM	HB
Test ACTH CC	0.58*	0.68**	Test B CC	0.42 <sup>#</sup>	0.76***
Test ACTH EPM	-	0.73***	Test B EPM	-	0.33 NS
	AUC ACTH			AUC B	
	EPM	HB		EPM	HB
AUC ACTH CC	0.71***	0.68**	AUC B CC	0.75***	0.71***
AUC ACTH EPM	-	0.87***	AUC B EPM	-	0.72***

Levels just after the test or the AUCs are both correlated. *r*-values are expressed ( $n=18$ ). NS: non-significant; <sup>#</sup>marginal; \* $p\leq 0.05$ ; \*\* $p\leq 0.01$ ; \*\*\* $p\leq 0.001$ ; HB, Hole Board; EPM, Elevated Plus-Maze; CC, Circular Corridor.

Resting levels of corticosterone were not related to stressor responsivity.

One major purpose of the present experiment was to study the within-subject consistency of HPA responsiveness to stressors of similar characteristics. Surprisingly, despite the enormous interest in the HPA axis during stress and its putative relationship to behavioral traits, there are no studies aimed at characterizing the reliability of individual differences in the response of the HPA to stress in an outbred population of rats. The correlations between the ACTH levels just after the three novel environments were better than those of corticosterone, perhaps because of the maximal activation of the adrenal cortex is achieved beyond the 15 min period of exposure to the tests. This fact is important because studies dealing with individual differences in HPA responsiveness to stressors have sometimes used samples taken at too early times points after initial exposure to stress (i.e. 10 min) to evaluate activation of the adrenal gland (i.e. Gentsch et al., 1982; Abel, 1991). In fact, when the correlations of the AUCs were studied, they were similarly good for both ACTH and corticosterone, suggesting that, at least in response to novel environments, the activation of the HPA axis is quite consistent among subjects and is reflecting individual characteristics (traits) of animals. The good correlation of the HPA response between the different novel environments also suggests the existence of a common stressful factor underlying exposure to novel environments, although the particular characteristics of the situations may also partially contribute to differentially activate the HPA axis. It is interesting that stress levels of HPA hormones did not correlate to resting corticosterone levels over a 24-h-period even at those times (lights off) characterized by an important degree of activation of the HPA axis.

These data support the hypothesis that activation of the HPA axis during certain periods of the circadian cycle is regulated by mechanisms unrelated to those determining responsiveness to stress.

The correlation between ACTH and corticosterone within each test was a little bit lower than that observed between the ACTH AUCs (or corticosterone AUCs) of the different tests, even considering the AUCs to avoid the problem of the delay between ACTH and corticosterone secretion. Under the present conditions, maximal corticosterone secretion was unlikely to be achieved and therefore the data suggest that there are some extra-ACTH factors involved in the control of adrenocortical secretion. In fact, there is an extensive literature on this subject (Vinson et al., 1994), although the particular factors involved under particular physiological conditions are still poorly characterized.

It has been suggested that defecation rate in novel environments is the reflection of a factor distinct from anxiety, sometimes called autonomic reactivity (Royce, 1977; Ossenkopp and Mazmanian, 1985; Maier et al., 1988). The consistent negative correlation of defecation rate with plasma corticosterone is of great interest because it is classically assumed that the two variables are positively related to emotionality (reactivity to potentially threatening situations). However, it has also been suggested that emotionality is not an unitary concept on the basis of evidence for a partial dissociation between different measures (Archer, 1973; Ramos and Mormède, 1998). The fact that several variables change in the same direction in response to stressors differing in intensity, taking into account the group average, does not mean that there should be a good correlation between them, because of the contribution of a partially different set of regulatory factors for each variable.

The present data demonstrate a consistency of the HPA response to novel environments. In humans reliability of cortisol response to different psychological tasks has given conflicting results. Thus, a good correlation ( $r=0.75$ ) was found between two different psychological tasks performed on the same day (Hawkley et al., 2001), whereas the correlation between the same tasks performed two weeks apart was lower ( $r=0.37$ ) (Cohen et al., 2000) and that of repeated exposure to the same tasks over 4 days was intermediate (Kirschbaum et al., 1995). Our results in rats are consistent with those reports showing significant within-individual correlations.

A second major purpose of the present work was to compare the stressful properties of three different tests, all of which are novel environments (elevated plus-maze, circular corridor and hole-board). Rats showed a consistent activation of the HPA axis when assessed just after the 15 min exposure to the tests. On the basis of plasma levels of ACTH and corticosterone just after the tests, the hole-board appears to be more stressful than the elevated plus-maze and the circular corridor, both of which appear to be similarly stressful. Defecation rate suggests that the elevated plus-maze was less stressful than both the hole-board and the circular corridor, which did not differ. This partial dissociation between the two stress markers (emotional activation) is not surprising, taking into account that among the few putatively good markers of stress intensity some degree of dissociation is often reported, mainly for two reasons. First, the threshold of intensity and the range of intensities we can detect is critically dependent on the particular variable used (see Márquez et al., 2002 for a thorough discussion), and the present data suggest that defecation rate could only distinguish between low levels of stress as compared to HPA hormones. Secondly, underlying emotional processes associated with the stressful situation may vary as function of some qualitative aspects of the situation. Why was the hole-board more stressful than the circular corridor and the elevated plus-maze? Pellow et al. (1985) demonstrated that rats enclosed in the open arms of the elevated plus-maze showed higher plasma corticosterone levels than rats enclosed in the closed arms, suggesting that lack of wall (thigmotaxis) is stressful for the rats. In our conditions, both the circular corridor and the elevated plus-maze (closed arms) contain more protected walls compare to their total surface than the hole-board, supporting the hypothesis of protection offered by the wall. In addition, in the elevated plus-maze the animals had the opportunity to choose between

protected or unprotected areas, whereas neither in the hole-board nor in the Circular Corridor had. This availability of choice may affect defecation rate more than HPA activation, thus explaining the low defecation rate in the elevated plus-maze.

The small differences in the HPA response to the three tests in the present experiment could be attributed to a low sensitivity of HPA hormones to the degree of stress caused by exposure to these situations. However, this is in contrast to our own previously published data indicating a good sensitivity of corticosterone to graded level of change in the environment (Armario et al., 1986). To confirm that under our conditions, plasma ACTH and corticosterone levels can reflect subtle changes in the environment, we did an additional experiment and showed that animals exposed to the dark compartment of a light-dark box showed lower ACTH and corticosterone responses than those confined to the illuminated compartment (unpublished data), in line with the results of Pellow et al. (1985) who showed higher corticosterone levels in rats exposed to the open arms of the elevated plus-maze as compared to those exposed to the closed arms.

We followed the activation of the HPA axis at 15 and 30 min after the termination of exposure to the novel environments using repeated blood sampling by the tail-nick procedure (15 and 30 min post-tests). Whereas a small decline in plasma ACTH levels were observed in the post-tests periods, plasma corticosterone showed an opposite pattern, which is not surprising taking into account the delay between ACTH and corticosterone secretion. The smaller than expected decline of ACTH (and corticosterone) levels during the post-test period may be in part due to the additional stress caused by tail-nick. Such superimposed stress may prolong the initial activation caused by the novel environments. This is supported by the finding that on day 3 the animals showed lower ACTH and corticosterone levels than on day 1, particularly in the last sampling time, suggesting adaptation to the procedure. Although we have found that even a single experience with tail-nick clearly reduced the corticosterone response (García et al., 2000; Martí et al., 2001) and even though all rats had previous experience with the procedure before being tested in the novel environment, the short interval between consecutive sampling used in the present experiment (15 min) may require more than one previous experience to substantially reduced HPA activation. Nevertheless, the strong correlation between ACTH or corticosterone levels just after the tests and the corresponding AUCs, which included the two post-test periods, clearly indicate

that blood sampling, if any, may have contributed to prolonging the initial response to the tests, but not to changing the individual pattern of response observed immediately after exposure to the tests.

Given the individual consistency of the HPA response to novel environments, such measures may be potentially important to thoroughly study the relationship between particular behavioural traits and HPA responsiveness to stressors, especially because both behavior and HPA activity can be measured in the same conditions (novel environment). This approach could help to shed light on the controversy between anxiety and HPA axis in rodents (Abel, 1991; Brush, 1991; Landgraf and Wigger, 2003; Steimer and Driscoll, 2003) and, in addition, can relate HPA activation with particular behavioral strategies of animals in novel environments. In fact, the relationship between anxiety and HPA responsiveness has only been exceptionally evaluated in the same tests (i.e. Landgraf and Wigger, 2003). Finally, it remains to be established in future experiments whether or not the observed consistency of the HPA response to stress applies to stressors widely differing in intensity or quality. In this regard, it is noteworthy that Gentsch et al. (1982) reported greater ACTH and corticosterone responses to novel environments but not to other more severe stressors, in the more anxious Roman Low Avoidance than in Roman High Avoidance rats. Although, as previously mentioned, only single, early blood sampling was used in that study, the data support the importance of the type of stressor to establish a relationship between a particular behavioral trait and the responsiveness of the HPA axis.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Delegación del Gobierno Plan Nacional sobre Drogas (Ministerio del Interior) and the ISCIII (G03/005, Redes temáticas). We thank Dr W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA) for his ACTH antiserum.

## References

- Abel, E.L., 1991. Behavior and corticosteroid response of Maudsley reactive and nonreactive rats in the open field and forced swimming test. *Physiol. Behav.* 50, 151-153.
- Appenrodt, E., Kröning, G., Schwarzberg, H., 1999. Increased plasma ACTH in rats exposed to the elevated plus-maze is independent of the pineal gland. *Psychoneuroendocrinology* 24, 833-838.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 21, 205-235.
- Armario, A., Castellanos, J.M., 1984. A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in rat. *Rev. Esp. Fisiol.* 40, 437-442.
- Armario, A., López-Calderon, A., Jolin, T., Castellanos, J.M., 1986. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci.* 39, 471-475.
- Brush, F.R., 1991. Genetic determinants of individual differences in avoidance learning: behavioral and endocrine characteristics. *Experientia* 47, 1039-1050.
- Cohen, S., Hamrick, N., 2003. Stable individual differences in physiological response to stressors: implications for stress-elicited changes in immune related health. *Brain Behav. Immun.* 17, 407-414.
- Cohen, S., Hamrick, N., Rodriguez, M.S., Feldman, P.J., Rabin, B.S., Manuck, S.B., 2000. The stability of and intercorrelations among cardiovascular, immune, endocrine, and psychological reactivity. *Ann. Behav. Med.* 22, 171-179.
- De Boer, S.F., Koopmans, S.J., Slangen, J.L., Van der Gugten, J., 1990. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol. Behav.* 4, 1117-1124.
- Dellu, F., Mayo, W., Piazza, P.V., Le Moal, M., Simon, H., 1993. Individual differences in behavioral responses to novelty in rats. Possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Pers. Individual Diff.* 15, 411-418.
- Dellu, F., Piazza, P.V., Mayo, W., Le Moal, M., Simon, H., 1996. Novelty-seeking in rats- biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34, 136-145.
- File, S.E., 1985. What can be learned from the effects of benzodiazepines on exploratory behavior?. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 45-54.
- File, S.E., Wardill, A.G., 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44, 53-59.
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., Armario, A., 2000. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72, 114-125.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Driscoll, P., Feer, H., 1982. Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol. Behav.* 28, 259-263.
- Hawkley, L.C., Bureson, M.H., Poehlmann, K.M., Berntson, G.G., Malarkey, W.B., Cacioppo, J.T., 2001. Cardiovascular and endocrine reactivity in older females: intertask consistency. *Psychophysiology* 38, 863-872.
- Hennessy, M.B., Levine, S., 1978. Sensitive pituitary-adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol. Behav.* 21, 295-297.
- Kabbaj, M., Devine, D.P., Savage, V.R., Akil, H., 2000. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *J. Neurosci.* 20, 6983-6988.
- Keller-wood, M.E., Shinsako, J., Keil, L.C., Dallman, M.F., 1981. Insulin-induced hypoglycemia in conscious dogs. I. Dose-related pituitary and adrenal responses. *Endocrinology* 109, 818-824.
- Kirschbaum, C., Prüssner, J.C., Stone, A.A., Federenko, I., Gaab, J., Lintz, D., Schommer, N., Hellhammer, D.H., 1995.

- Persistent high cortisol responses to repeated psychological stress in a subpopulation of healthy men. *Psychosom. Med.* 57, 468-474.
- Kulkarni, S.K., Sharma, A.C., 1991. Elevated plus-maze: a novel psychobehavioral tool to measure anxiety in rodents. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13, 573-577.
- Landgraf, R., Wigger, A., 2003. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress* 6, 111-119.
- Maier, S.E., Vandenhoff, P., Crowne, D.P., 1988. Multivariate analysis of putative measures of activity, exploration, emotionality, and spatial behavior in the Hooded rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 102, 378-387.
- Márquez, 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.* 926, 181-185.
- Martí, O., García, A., Vallès, 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, 129-136.
- Misslin, R., Cigrang, M., 1986. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety?. *Behav. Proc.* 12, 45-50.
- Ossenkopp, K.P., Mazmanian, D.S., 1985. Some behavioral factors related to the effects of cold-restrain stress in rats: a factor analytic-multiple regression approach. *Physiol. Behav.* 34, 935-941.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., 1985. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- Ramos, A., Mormède, P., 1998. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 33-57.
- Royce, J.R., 1977. On the construct validity of open-field measures. *Psychol. Bull.* 84, 1098-1106.
- Steimer, T., Driscoll, P., 2003. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6, 87-100.
- Vinson, G.P., Hinson, J.P., Toth, I.E., 1994. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J. Neuroendocrinol.* 6, 235-246.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

## **CAPÍTULO 4: Estudio de la consistencia de la respuesta del eje HPA y la prolactina tras la exposición a estímulos estresantes de diferente intensidad.**

Manuscrito:

Cristina Márquez, Roser Nadal, Antonio Armario (2006) Individual differences in hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to immobilisation are poorly related to those to a novel environment. No publicado.





# **Individual differences in hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to immobilisation are poorly related to those to a novel environment.**

Cristina Márquez, Roser Nadal, Antonio Armario

## **Introduction.**

We have found in previous experiments that there is a good correlation in the ACTH and corticosterone response to three different novel environments (Márquez et al., 2005), suggesting that HPA response to stress is a consistent individual trait. However, it is unclear whether or not this consistency may be similar when comparing stressful situations markedly differing in intensity and in qualitative aspects. This is a critical issue because a wide range of challenges to the organisms are considered stressors and therefore they can elicit distinct emotional reactions. For instance, exposure to footshock is painful, but exposure to a predator can be interpreted as a life-threatening situation. Consequently it is unclear whether we can define individuals as low and high responders to stress independently of the type of emotional stressor used to elicit the

physiological response. In fact, it has been found with two pairs of selected rat lines differing in anxiety (RLA-RHA and HAB-LAB) that more anxious rats showed a greater HPA response to novel environments, but these differences disappeared after exposure to other, more severe, stressors (e.g. Gentsche et al., 1982). Therefore, it is possible that the good correlation previously observed in response to different novel environments would not be maintained when markedly different stressors are compared. This type of study in laboratory animals is also important because of the paucity of data in humans regarding this point. Thus, in one report, subjects classified as high or low responders to exercise also showed differences in cortisol (but not ACTH) response to a psychological stressor (Singh et al., 1999). In another comparison of the hormonal response to different, but similar

intensity, tasks (arithmetic *versus* public-speaking) good inter-task correlations were found (Hawkey et al., 2001).

In the present experiment, the relationship of the HPA response to a novel environment (hole-board) and to immobilization in wooden boards (IMO) was studied using a within-subject design. Since in addition to HPA hormones, prolactin is a good marker of stress (Kant et al., 1983, Armario et al., 1986, Armario et al., 1991), we included the measurement of plasma prolactin.

## Methods

### Subjects

Forty male Sprague–Dawley rats from the breeding centre of the Universitat Autònoma de Barcelona, 55 days old at the beginning of the experiment, were used. They were housed two per cage in standard conditions of temperature ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) and on a 12–12 h light–dark schedule (lights on at 7 am). Food and water were provided *ad libitum*. Cages were cleaned twice a week. The experimental protocol was approved by the committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona and was carried out in accordance the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

### General procedure

During the second week after their arrival, all animals were handled three times (every other day) and then, blood samples were taken under basal conditions by tail-nick to

obtain resting hormone levels and habituate the animals to the sampling procedure (0, 30 and 60 min after initial tail-nick). From 2 to 5 days after the initial tail-nick, animals were exposed to holeboard for 20 min and HPA response was evaluated by means of blood sampling immediately after the test and at two times after stress (30 and 60 min). Basal samples prior to hole-board were not taken in order to prevent possible interferences with behavioral and hormonal response. The hole-board (File y Wardill, 1975) consisted of a white rectangular box (62 cm; 53 cm; 28 cm high) with a floor divided into 16 equal squares, containing four holes (diameter 4.5 cm). The holes were empty. Each animal was placed initially in the periphery of the apparatus facing the wall. The apparatus was carefully cleaned between animals with a 5% ethanol solution, and the test illumination was 40 W. The two animals of each cage were always tested simultaneously in two similar apparatuses placed in the same room. From 4 to 6 days after hole-board, all animals were exposed to IMO for 30 min and blood samples were taken prior to IMO, immediately after IMO and at three times post-stress (45, 90 and 180 min). IMO was performed by taping the four limbs to metal mounts attached to a wooden board (Márquez et al., 2002, Márquez et al., 2004). Head movements were restricted with two metal loops around the neck. Fifteen days after IMO animals were anesthetised and adrenal glands were removed, cleaned and weighed.

## Biochemical analysis

Plasma ACTH, corticosterone and prolactin levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA) procedures currently used in our laboratory. ACTH RIA used  $^{125}\text{I}$ -ACTH (Amersham, Spain) as the tracer, rat synthetic ACTH 1-39 (Sigma, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb 7) kindly provided by Dr. W. C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). Corticosterone RIA used  $^{125}\text{I}$ -carboxymethyloxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain), synthetic corticosterone (Sigma) as the standard and an antibody raised in sheep against corticosterone-3-CMO-urease (Chemicon Int., Temecula, CA, USA). We followed the RIA protocol recommended by Dr. G. Makara (plasma corticosteroid-binding globulin was inactivated by low pH) (Bagdy and Makara, 1995). Prolactin was determined by RIA using  $^{125}\text{I}$ -prolactin (NEN, Boston, MA, USA) as the tracer, rat prolactin (rat PRL-RP-3) as the standard and an antibody raised against rat prolactin (anti-rPRL-S-9), kindly provided by Dr. A. F. Parlow (NIDDK National Hormone and Peptide Program, CA, USA). All samples to be compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was of 4% for corticosterone, 5% for ACTH and 6% for prolactin.

## Data analysis

The area under the curve (AUC) of plasma hormone levels was calculated with Graph Pad Prism (version 3.02) that computes the AUC using the trapezoid rule. The 'statistical package for social science' (SPSS) program was used (version 11 for Windows). To study ACTH, corticosterone and prolactin levels across time after the two types of stressors, separate within-subject ANOVAs were performed. Also for each hormone AUCs levels were studied by means of separate within-subject ANOVAs using type of stress as a within-subject factor. Pearson correlations (two tailed) were also performed.

## Results

Repeated measures ANOVA for each stressor revealed that exposure to them increased plasma ACTH (hole-board:  $F(3,117)=24.4$   $p<0.001$ ; IMO:  $F(4,156)=307.36$   $p<0.001$ ), corticosterone (hole-board:  $F(3,117)=59.51$   $p<0.001$ ; IMO:  $F(4,156)=416.83$   $p<0.001$ ) and prolactin (hole-board:  $F(2,60)=62.61$   $p<0.001$ ; IMO:  $F(2,78)=341.51$   $p<0.001$ ), these increases being greater after IMO for each of the 3 hormones studies (Figure 1). Similarly, the comparison of the two stressors by means of a repeated-measures ANOVA with the AUCs of the different hormones and the type of stressor as a within-subject factor, confirmed the difference in the intensity of the stress (ACTH:  $F(1,39)=581.80$   $p<0.001$ ; Corticosterone:  $F(1,39)=1926$   $p<0.001$ ; prolactin:  $F(1,30)=164.86$   $p<0.001$ ) (Figure 4).

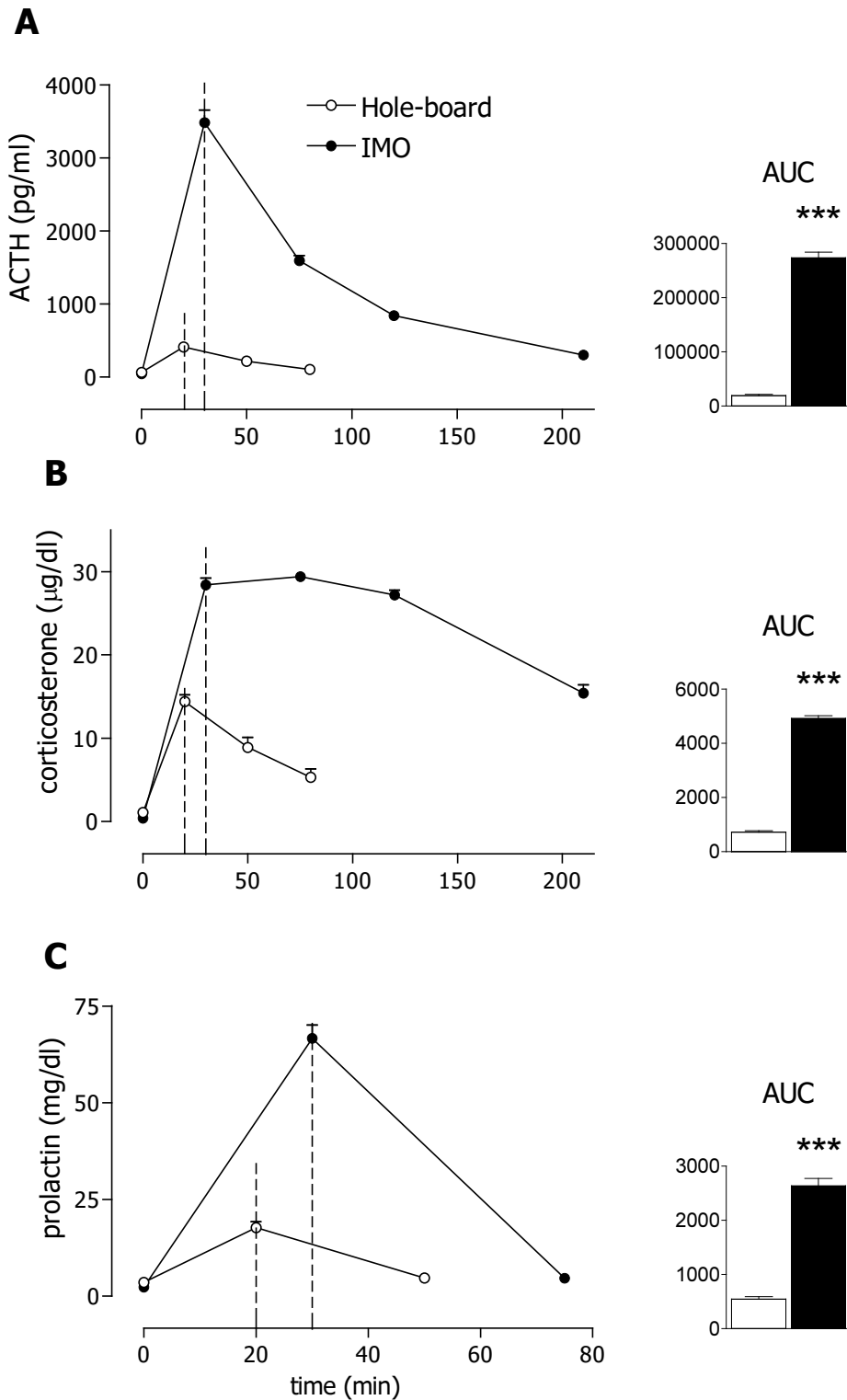


Figure 1: Plasma levels of ACTH, corticosterone and prolactin after 20 min of hole-board exposure or 30 min of IMO. Mean and SEM values are represented (n between 31 and 40). The same animals were exposed to the two stressors (see text) and blood samples were taken at different times. Vertical lines represent the end of the stressor. Hormonal levels for each time point are represented on the left and AUCs on the right. \*\*\*  $p < 0.001$ .

To study the relationship between ACTH and corticosterone release and the consistency of the HPA response to the two different stressors, a correlational study was done. AUCs correlations between ACTH and corticosterone within each stressor were higher for hole-board than for IMO (Figure 2). Prolactin levels only correlated with ACTH after IMO exposure (data not shown).

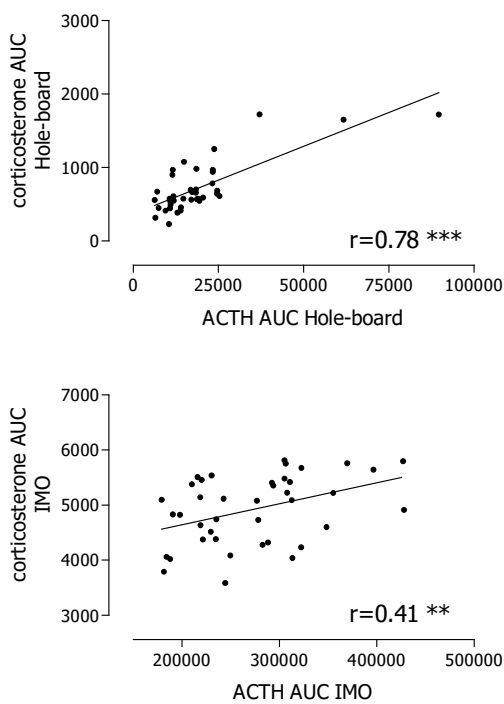


Figure 2: Correlation between ACTH and corticosterone AUCs within each stressor.

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.010$ .

If we study the individual consistency of each hormone between both stressors, we can see that ACTH, corticosterone or prolactin AUCs correlations are very low (Figure 3). The same pattern was shown with ACTH, corticosterone or prolactin levels immediately after stress exposure (data not shown). Thus, the consistency of individual

response across the two types of stressors widely differing in intensity is low.

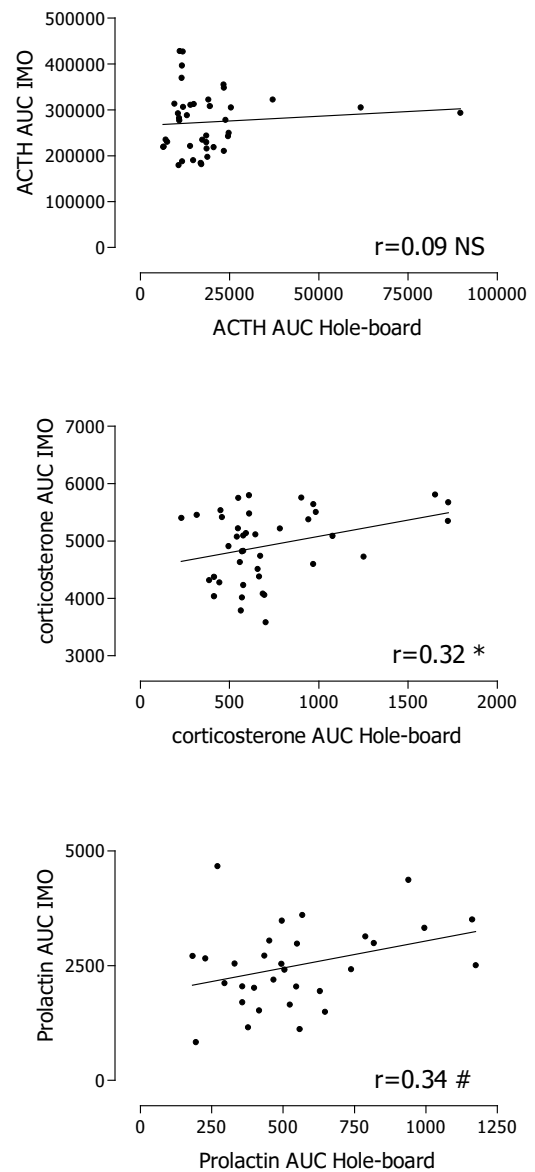


Figure 3: Correlations between AUCs of ACTH, corticosterone and prolactin. \*  $p \leq 0.05$ ; #: marginal; NS: non significant; AUC: area under the curve.

Finally, the correlation between adrenal weight and corticosterone levels immediately after IMO, but not after hole-board exposure, was statistically significant (Figure 4).

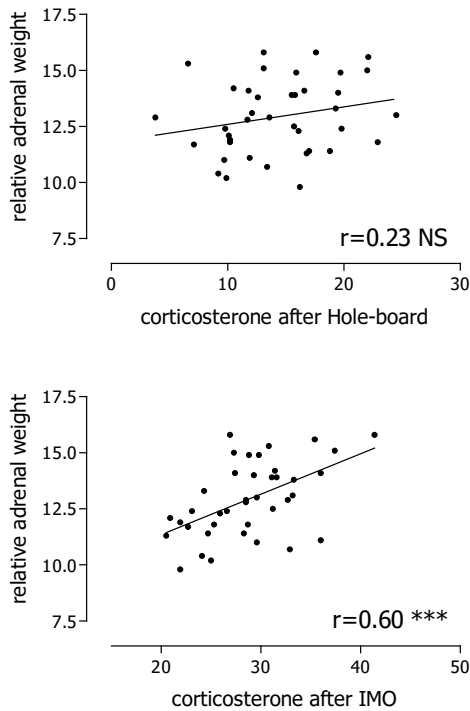


Figure 4: Correlations between relative adrenal weight and corticosterone levels just after stress exposure (20 min for hole-board and 30 min for IMO) \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; NS: non significant.

## Conclusion

Our results suggest that when the type (and/or intensity) of stressors differs widely (hole-board versus immobilization), there is not too much individual consistency in HPA responsiveness as measured by correlation between both situations. These data are in contrast with the good correlation observed when the HPA response to three different novel environments was compared (Márquez et al., 2005). The present results could explain those obtained by Gentsch et al (1982) who found a higher ACTH and corticosterone response in Roman Low Avoidance rats in comparison to Roman High avoidance when animals were exposed to novel environments but not

when rats were submitted to stressors of higher intensity.

It is interesting that the correlation between ACTH and corticosterone was low in response to IMO as compared to the holeboard, suggesting a partial dissociation between both hormones under those conditions. Whether this is due to the different time-course of the two hormones or the involvement of extra-ACTH factors is unclear. On the other hand, relative adrenal weight correlated highly with corticosterone levels after IMO and not after exposure to the novel environment, in agreement with previous data (Márquez et al., 2004). Since adrenocortical secretion is maximal after exposure to high intensity stressors, the data suggest that there is a good relationship between adrenal mass and the maximum capability of the adrenal gland to synthesize and release corticosterone.

In conclusion, the present data suggest that the classification of an animal as low or high responder to stress may be dependent on the type of stressor used and therefore information obtained after exposure to relatively mild stressor would not predict consequences of exposure to more severe stressors.

## References:

- Armario, A., Gil, M., Martí, J., Pol, O. and Balasch, J., 1991. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 39, 373-377.
- Armario, A., Lopez-Calderon, A., Jolin, T. and Castellanos, J. M., 1986. Sensitivity of

anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 39, 471-475.

- File, S. E. and Wardill, A. G., 1975. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44, 53-59.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Driscoll, P. and Feer, H., 1982. Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 28, 259-263.
- Hawkley, L. C., Burleson, M. H., Poehlmann, K. M., Berntson, G. G., Malarkey, W. B. and Cacioppo, J. T., 2001. Cardiovascular and endocrine reactivity in older females: intertask consistency. *Psychophysiology* 38, 863-872.
- Kant, G. J., Mougey, E. H., Pennington, L. L. and Meyerhoff, J. L., 1983. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sci* 33, 2657-2663.
- Márquez, C., Belda, X. and 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* 926, 181-185.
- Márquez, C., Nadal, R. and Armario, A., 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 601-612.
- Márquez, C., Nadal, R. and Armario, A., 2005. Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30, 179-187.
- Singh, A., Petrides, J. S., Gold, P. W., Chrousos, G. P. and Deuster, P. A., 1999. Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1944-1948.





## **CAPÍTULO 5: Contribución de los rasgos conductuales de ansiedad y búsqueda de novedad a la reactividad al estrés del eje HPA y la prolactina.**

Publicación:

Cristina Márquez, Roser Nadal, Antonio Armario (2006) Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behavioural Brain Research* 168, 13-22.



Research report

# Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic–pituitary–adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats

C. Márquez<sup>a</sup>, R. Nadal<sup>b</sup>, A. Armario<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Neurociències and Unitat de Fisiologia Animal (Facultat de Ciències), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Institut de Neurociències and Unitat de Psicobiologia (Facultat de Psicologia), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 19 June 2005; received in revised form 27 September 2005; accepted 6 October 2005

Available online 21 November 2005

## Abstract

Since stressor-induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis is involved in some stress-related pathologies, much attention has been paid in laboratory animals to the study of the relationship between endocrine, particularly HPA, responsiveness to stressors and other individual characteristics, such as reactivity to novelty and fear/anxiety. In the present study, adult male rats were classified as high or low reactive to novelty (HR versus LR), as a function of the horizontal activity displayed during 30 min in a circular corridor, and as high or low anxiety (HA versus LA) as a function of the time spent in the open arms of the elevated plus-maze. Then, the behavioural and hormonal response to two distinct novel environments (the hole-board and the light–dark) was assessed in the same subjects, using a counterbalanced design. Plasma prolactin, ACTH and corticosterone responses to the hole-board were higher than to the light–dark, a good correlation between the two tests being found for each hormone. Whereas the hormonal response to the novel environments was not affected by anxiety, HR rats showed a consistently higher HPA response than LR rats when the criteria to classify the animals were the activity during the first 15 min in the circular corridor, but not when the activity during the second 15 min was considered. Neither trait affected prolactin response. The present results demonstrate a good within-individual consistency of the endocrine response to novel environments and support the hypothesis of a higher HPA response to stressors for HR versus LR rats. In contrast, no contribution of fear/anxiety to endocrine responsiveness was observed.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Individual differences; Stress; Reactivity to novelty; High and low responders; ACTH; Corticosterone

## 1. Introduction

Although the existence of marked individual differences in behavioural and physiological responsiveness to stressors has been recognised for years, only recently the study of the biological bases of such individual differences has attracted interest. Most of the research done to date has focused on the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, likely for two main reasons. Firstly, an important number of pathologies (i.e. immune suppression, depression, cognitive problems in aging) have been associated with a hyper-responsiveness of the HPA axis to stress [13]. Secondly, the HPA axis is one of the prototypical stress systems and its activation has been found to be

positively related to the intensity of the stressors [4,15,24], making it possible that individuals perceiving particular situations as more stressful may also display a higher HPA response. The characterisation of individual differences in the responsiveness of the HPA axis to stress has mainly focused on three particular behavioural traits: fear/anxiety, novelty-seeking and coping styles. In this study, we will focus on the first two traits (see ref. [30] for a review about coping).

The influence of fear/anxiety on HPA responsiveness to stressors has not been extensively studied in outbred populations of rats. In contrast, there are several genetically selected rat lines, which are known markedly to differ in fear/anxiety and have been studied on this regard: (a) Roman lines, selected on the basis of their active avoidance response to footshock in a shuttle-box and classified as Roman High-Avoidance (RHA) and Low-Avoidance (RLA) (see ref. [53]); (b) Syracuse High-Avoidance or Low-Avoidance (SHA, SLA) rats, selected by a criterion

\* Corresponding author. Tel.: +34 935811664; fax: +34 935812390.  
E-mail address: [antonio.armario@uab.es](mailto:antonio.armario@uab.es) (A. Armario).

similar to RHA/RLA [9]; (c) Maudsley Reactive versus Non-Reactive rats (MR, MNR) selected on the basis of defecation rate in an open-field (see ref. [7]); (d) High-Anxiety Behaviour (HAB) versus Low-Anxiety Behaviour (LAB) rats, selected in function of time spent in the open arms of the plus-maze [34]. A higher HPA response to some stressors has been found in RLA as compared to RHA rats (i.e. ref. [23]), but an opposite pattern is observed in SLA versus SRA [10] despite similar selection criterion. In addition, the type of stressor appears to be important as higher HPA activation of HAB versus LAB rats has been observed in response to the elevated plus-maze when only access to the open arms of the maze was allowed [32,50], but not when they can freely explore in the plus-maze [33] or after forced swim [28]. Finally, no differences in corticosterone response to stressors have been observed between MR and MNR rats [1,11]. Taken together, the presumed higher HPA responsiveness to stressors in high anxiety rats is not consistent across lines, although it seems to be more easily detected after exposure to novel environments.

Although the better way to evaluate the novelty-seeking trait in animals is still controversial (see ref. [6]), the relationship between the novelty-seeking trait and HPA function has been usually assessed considering motor activity in inescapable novel environments (reactivity to novelty). Piazza and co-workers have classified outbred Sprague–Dawley rats in “high-responders” (HR) or “low-responders” (LR) as a function of the horizontal activity displayed during 2 h in a circular corridor, and consistently found a higher or more prolonged corticosterone response to the circular corridor [44,45] or to restraint [8,18] in HR versus LR. However, using also Sprague–Dawley rats and their activity during 2 h exposure to a square open-field as the classification criterium, Kabbaj et al. have observed a higher corticosterone response to a novel environment (light–dark) in HR as compared to LR rats, but a similar response to restraint [26], which is partially inconsistent with the previously mentioned results. It has been discussed [26] the possibility that the differential effect of restraint versus the light–dark may be due to differences in controllability (the restraint being more “experimenter-imposed”) or in the intensity of the two stressors.

Moreover, it is at present unclear whether initial activity of animals during prolonged (more than 15 min) exposure to a novel environment is reflecting a different behavioural construct than delayed activity. In our laboratory, we are currently studying the separate contribution of initial versus delayed activity in a circular corridor and we have found that delayed activity, perhaps reflecting perseverance of exploration, and not the initial activity is predictive of the development of conditioned place preference for morphine [39]. To our knowledge, in the field of stress reactivity the role of initial versus delayed activity has not been previously considered.

In addition to the above caveats, there is another critical problem with the cited results. All rat lines genetically selected for variations in fear/anxiety, also differ in other traits as well. For instance, RHA appear to score higher than RLA in novelty-seeking and are characterised by an active coping style [19,53] and HAB rats have a more passive coping style than LAB rats and also differ in other characteristics [34,40]. Furthermore,

HR outbred Sprague–Dawley rats have been consistently found to be low-anxiety, in that they preferred more than LR rats the illuminated box in the light–dark test and the open-arms of the elevated plus-maze [17,26]. Although the genetic co-segregation of different traits, particularly anxiety and passive-coping (depression-like) style, is of great theoretical and clinical interest, this is a confounding factor to the study of the independent contribution of each trait. Therefore, the separate contribution of novelty-seeking and fear/anxiety traits merits to be studied.

Finally, it is important to study responsiveness to stressors using biological variables other than those of the HPA axis. In this regard, prolactin appears to be particularly interesting because it is also sensitive to the intensity of emotional stressors [3,4,27] and previous data showed that the more anxious HAB [32] or RLA [12] rats presented a higher prolactin response when compared to the counterparts when exposed to novel environments. Accordingly, the purpose of the present work was two-fold. Firstly, to study in adult unselected outbred male rats, the separate contribution of reactivity to novelty and fear/anxiety, as well as the interaction between the two traits, to the peripheral HPA (ACTH and corticosterone) and prolactin response to two different novel environments supposedly differing in controllability: the hole-board (forced exploration) and the light–dark (a situation where the animals can choose between more and less stressful conditions). Secondly, to confirm previous results [37] on the consistency of individual endocrine responsiveness to stressors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Forty-eight male Sprague–Dawley rats, obtained from the breeding centre of the Universitat Autònoma de Barcelona and 60 days old at the beginning of the experiment were used. They were housed in pairs for 2 weeks before starting the experiment, in standard conditions of temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12-h light/12-h dark schedule (lights on at 07:00 h). Food and water were available ad libitum. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona, followed the “Principles of laboratory animal care” and was carried out in accordance the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

### 2.2. General procedure

The experimental procedures were always done in the morning. Four days after their arrival, all animals were handled four times (every other day) for approximately 2 min a day. Throughout all the experimental phases, the two animals of each cage were always tested simultaneously in two similar apparatuses placed in the same room, except in the case of the elevated plus-maze, in which the two animals cannot be simultaneously tested because in some cases one rat may fall from the apparatus and this could interfere with the behaviour of the other rat. In this case, one rat from each cage was tested on one day and the other one the next day to avoid any influence of handling the cages and cohort removal (animals tested one day were not statistically different from the animals tested next day).

All animals were exposed to the four different tests once, but exposure of all animals to each test lasted 2–3 days due to the elevated number of animals. Activity during a 30 min exposure to the circular corridor was firstly assessed over a 3-day period. Four to seven days later, rats were exposed, across 2 days, for 5 min to the elevated plus-maze. After 3–4 additional days, blood samples were taken under basal conditions by tail-nick to obtain resting hormone lev-

els and habituate the animals to the sampling procedure (three samples spaced each 30 min). Four days after this sampling procedure, the HPA response of all rats to two different novel environments (the hole-board and the light–dark box) was studied. This procedure lasted for 4 days. A 20 min exposure to the novel environments was chosen as optimum because maximum plasma corticosterone levels are never achieved before 20 min and the ACTH response starts declining later on. Two days were interspersed between each test. We used a counterbalanced design so that half of the rats were exposed first to the hole-board and the remaining half first to the light–dark. Basal samples prior to the tests were not taken in order to prevent possible interference with behavioural response and hormonal values just after the tests. Blood samples were thus taken by tail-nick immediately after exposure to the novel environments, and 30 and 60 min later. The two post-tests sampling periods were added to obtain a better picture of the hormonal response to the tests. We have previously found that a single previous experience with tail-nick dramatically reduced the ACTH and corticosterone responses to the sampling procedure [38] and that post-tests sampling did not distort the initial endocrine response to the tests in animals having experience with tail-nick [37]. In addition, repeated sampling procedure over a week did not modify behaviour of rats in the elevated plus-maze as evaluated 48 h after the last sampling (unpublished data). The paired rats in each cage were sampled simultaneously (two experimenters were sampling at the same time and a third was gently holding the two rats). The tail nick consisted of gently wrapping the animals with a cloth, making a 2 mm incision at the end of one of the tail artery and then massaging the tail while collecting 300  $\mu$ l of blood, within 2 min, into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). Although the primary purpose of exposure to the hole-board and the light–dark was to evaluate the hormonal response, behaviour was also recorded to allow comparison with the results of the circular corridor and the elevated plus-maze.

For behavioural analysis, a video camera was suspended from the ceiling and the session was videotaped for subsequent by hand analysis for an experimenter blind to the behavioural traits of the rats (CM). The test equipment was cleaned carefully between animals with a water solution containing ethanol (5%, v/v).

### 2.3. Novel environments

#### 2.3.1. Circular corridor

The circular corridor [43] consisted of a white circular arena (80 cm diameter  $\times$  34 cm high) with a cylinder inside (52 cm  $\times$  34 cm) forming a corridor 14 cm wide. The floor was divided by a painted grey line in 12 areas. The rat was placed inside the corridor and could move around a circular track between the walls. The number of ambulations and defecations were scored for 30 min. Ambulation was defined as placing all four paws in one of the above mentioned areas. A dim light was provided by two fluorescent tubes. The subjects were classified in function of ambulations during the first half (initial activity, LR1–HR1) or again during the second half (delayed, LR2–HR2) of the session by a median split procedure ( $n=24$  in each group). HRs were the rats with ambulation scores above the median of the whole sample ( $n=48$ ), the remaining were considered as LRs.

#### 2.3.2. Elevated plus-maze

The elevated plus-maze [42] consisted of four white wooden arms (formica) at right angles to each other, connected to a central square. The apparatus was elevated 50 cm above the floor. Two of the opposite arms had high walls (enclosed arms, 43 cm high), whereas the other two were the open arms that had a 0.7 cm ridge to provide an additional grip. Each arm was divided into three equal sections. The rat was placed facing a closed arm and the subject was considered to be in a given arm when all paws were inside. A black curtain surrounded the plus-maze to minimise external influences and a 40 W white bulb was placed 1.20 m above the centre of the apparatus. The procedure lasted 5 min. The time spent in open and closed arms, latency to the first open arm entry, number of entries (with all four paws) and ambulations in each type of arm (number of sections entered within a given arm), rearings, defecations and latency and duration of grooming were measured. Considering time spent in open arms, animals were divided into LA–HA (low- and high-anxiety) by a median split procedure ( $n=24$  in each group). HAs were the rats with time spent in

open arms below the median of the whole sample ( $n=48$ ), the remaining were considered as LAs.

#### 2.3.3. Light–dark

The light–dark [46,47] was made of wood covered with formica and consisted of two compartments. One was white (30 cm  $\times$  30 cm  $\times$  30 cm) and the other one was black (30 cm  $\times$  30 cm  $\times$  30 cm) and covered with a roof. The compartments were separated by a wall and connected by a small opening of 9.5 cm  $\times$  8 cm. Each rat was individually placed in the centre of the white compartment facing the small opening. The white compartment was illuminated by a white 25 W bulb located 33 cm above the centre of this compartment. The procedure lasted for 20 min. The number of transitions between both compartments (with all four paws), defecation, latency to enter the black compartment, attempts to enter in the white compartment, rearings and time spent with all four paws in the white compartment were measured. An attempted entry was considered when the animal did not enter into the white compartment with all four paws but instead returned to the dark compartment (this pattern includes the stretched attend posture, when the rat stretches forward and retracts to original position).

#### 2.3.4. Hole-board

The hole-board [21] consisted of a white rectangular box (62 cm  $\times$  53 cm  $\times$  28 cm) with a floor divided into 16 equal squares, containing four empty holes (diameter 4.5 cm). Each animal was placed initially in the periphery of the apparatus facing the wall. The procedure lasted for 20 min. The number of central and peripheral ambulations (with all four paws into the above mentioned squares), defecation, rearings, latency and duration of grooming, and number of explored holes were measured.

### 2.4. Critical measures to behavioural characterisation of rats

We used the activity in the circular corridor to classify the rats as HR–LR and the time spent in the open arms of the elevated plus-maze to classify them as HA–LA. These particular indices have been extensively used in the literature (see Section 1), but are also supported by previous factorial analysis studies in our laboratory using data from various independent experiments done with outbred rats from the same strain and breeder. After analysing a wide range of measures in the circular corridor, the elevated plus-maze and the hole-board, the results consistently suggested the existence of two independent orthogonal factors: activity, in which strongly loaded ambulation in the circular corridor, and anxiety, in which strongly loaded time spent in the open arms of the elevated plus-maze (unpublished). Other measures, for instance head-dipping in the hole-board, were not so consistent or loaded to a lower extent.

### 2.5. Biochemical analysis

Plasma ACTH, corticosterone and prolactin levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA) procedures currently used in our laboratory. ACTH RIA used  $^{125}$ I-ACTH (Amersham, Spain) as the tracer, rat synthetic ACTH 1-39 (Sigma, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb 7) kindly provided by Dr. W. C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). Corticosterone RIA used  $^{125}$ I-carboxymethylloxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain), synthetic corticosterone (Sigma) as the standard and an antibody raised in rabbits against corticosterone-carboxymethylloxime-BSA kindly provided by Dr. G. Makara (Inst. Exp. Med., Budapest, Hungary). We followed the RIA protocol recommended by Dr. G. Makara (plasma corticosteroid-binding globulin was inactivated by low pH) [5]. Prolactin was determined by RIA using  $^{125}$ I-prolactin (NEN, Boston, MA, USA) as the tracer, rat prolactin (rat PRL-RP-3) as the standard and an antibody raised against rat prolactin (anti-rPRL-S-9), kindly provided by Dr. A. F. Parlow (NIDDK National Hormone and Peptide Program, CA, USA). Prolactin levels were not analysed in the last post-stress period because the recovery of prolactin levels after termination of stress is very fast [22], and therefore no additional information could be obtained. All samples to be compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was of 9% for corticosterone, 8% for ACTH and 9% for prolactin.

## 2.6. Statistical analysis

The area under the curve (AUC) of plasma hormone levels in response to the tests was calculated with Graph Pad Prism (Version 3.02) that computes the AUC using the trapezoid rule. The statistical analysis was performed using the “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, Version 12). Normality of the data was evaluated by means of the Kolmogorov–Smirnov test. To analyse ACTH, corticosterone or prolactin changes in relation to the previously determined group differences in behaviour, a mixed ANOVA was used, being “novelty” (LR or HR) and “anxiety” (LA or HA) the between subject’s factors and “time” (immediately after the test, 30 and 60 min post-test; note that last time was not analysed regarding prolactin) and “test” (hole-board and light–dark) the within subject’s factors. To achieve homogeneity of variances, hormonal data was log-transformed. To compare other data between LR and HR or LA and HA animals, *t*-tests were used. A principal component analysis (PCA) with a varimax rotation was used to study the underlying structure of behavioural measures recorded. The PCA projects the data into a lower-dimensionality space formed of a subset of the highest-variance components. Finally, Pearson correlation tests (two-tailed) were also used. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. The influence of previous experience with a novel environment and the sampling procedure

Since the order of exposure to the tests could have affected behavioural or hormonal response, we firstly analysed this influence. The *t*-test revealed no effect of the order of exposure to the novel environments on the behavioural response of rats to the hole-board or the light–dark. Likewise, the mixed ANOVA of hormonal response (sampling time as within-subject factor and order of exposure as between-subject factor) did not reveal an effect of order or the interaction between sampling time and order. Thus, behavioural and hormonal data from animals exposed first to a given test were pooled with data from rats being exposed secondly to that test.

### 3.2. Factorial analysis

The results of the factorial analysis of the total ambulation in the circular corridor, the time spent in the open arms of the elevated plus-maze and peripheral and central ambulations in the hole-board, revealed, in accordance with our previous unpublished results, two main orthogonal factors (Table 1): one we called reactivity to novelty, on which strongly loaded ambulation in the circular corridor and peripheral ambulations in the hole-board, and another one (fear/anxiety), on which strongly loaded time spent in the open arms of the plus-maze and central ambulations in the hole-board. These two factors are very consistently found after exposure to different novel environments

Table 1  
Factor loadings obtained by principal component analysis

	Factor 1	Factor 2
Plus-maze time spent in open arms		0.73
Hole-board central ambulations		0.87
Hole-board peripheral ambulations	0.85	
Circular corridor total activity	0.81	

Loadings  $< 0.4$  are omitted from the table.

[20,35,46,51]. Results of the light–dark were not included in the factorial analysis as a about 65% of animals tested did not leave the dark compartment after a first entry.

### 3.3. Individual differences in reactivity to novelty and anxiety

Differences in activity in the circular corridor for LR1–HR1 rats were significant only during the initial half of the session, whereas LR2–HR2 animals already differed in the last 5 min of the first half and during the second half of the circular corridor (Fig. 1). The correlation between activity during the first and the second half of the corridor was moderate although statistically significant ( $r = +0.48$ ,  $p < 0.001$ ). On the other hand, neither LR1–HR1 nor LR2–HR2 rats differed significantly in several measures of the plus-maze, light–dark or hole-board (Table 2). Consistently, locomotor activity in the circular corridor was not correlated with these measures. Also, LA and HA animals (time spent in the open arms of the plus-maze:  $124.4 \pm 5.4$  s versus  $49.9 \pm 5.8$  s, respectively) did not differ in either ambulations in the circular corridor (initial activity:  $177.6 \pm 8.1$  versus  $183.2 \pm 7.6$ ; delayed activity:  $50.3 \pm 6.0$  versus  $59.7 \pm 4.9$ , respectively; NS in both cases) or in total arm entries in the elevated plus-maze ( $15.4 \pm 0.7$  versus  $13.3 \pm 0.9$ , respectively; NS). HA rats ambulated less in the central part of the hole-board ( $3.05 \pm 0.7$  versus  $6.83 \pm 1.3$ , respectively;  $t(43) = 2.55$ ,  $p < 0.05$ ) and more in the peripheral part of the apparatus ( $80.9 \pm 4.4$  versus  $67.3 \pm 4.1$ , respec-

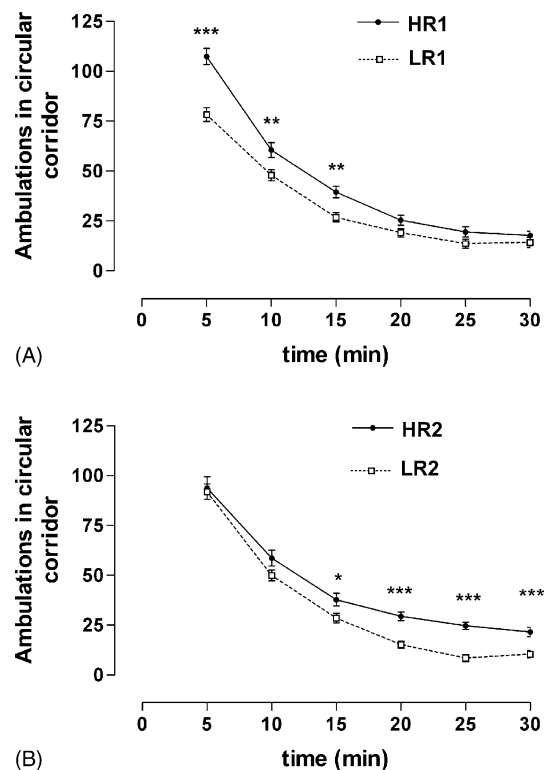


Fig. 1. Ambulations in a circular corridor across time (six 5-min blocks) for LR1–HR1 animals (A) and LR2–HR2 animals (B). Means and S.E.M. ( $n = 24$  for each group) are represented. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Table 2

Representative measures recorded in the plus-maze, the light–dark and the hole-board for rats differing in initial activity (LR1–HR1) or delayed activity (LR2–HR2) in the circular corridor

	LR1	HR1	LR2	HR2
Percent of open arms entries with regard to total entries (plus-maze)	41.0 ± 3.5	36.4 ± 3.4	40.5 ± 3.0	37.0 ± 3.9
Total arms entries (plus-maze)	13.9 ± 1.0	14.8 ± 0.8	14.6 ± 1.0	14.1 ± 0.7
Time in open arms (plus-maze)	93.6 ± 10.5	80.8 ± 8.3	90.0 ± 9.1	84.3 ± 10.0
Time in light (light–dark)	29.9 ± 7.5	18.5 ± 3.6	24.9 ± 6.0	23.5 ± 6.0
Transitions between light and dark	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.4
Peripheral ambulations (hole-board)	68.9 ± 3.8	79.2 ± 4.8	67.2 ± 4.0	80.4 ± 4.4
Central ambulations (hole-board)	5.4 ± 1.0	4.5 ± 1.2	5.5 ± 1.4	4.5 ± 0.8

Means ± S.E.M. are represented ( $n = 24$ ) in each group. To better compare all measures, light–dark and hole-board data are referred to only the first 5 min of the test.

tively;  $t(43) = 2.29$ ,  $p < 0.05$ ) during the initial 5 min of the test.

#### 3.4. Hormonal responses to the novel environments

Basal levels of the three hormones studied were  $50 \pm 1.7$  pg/ml for ACTH,  $1.4 \pm 0.2$  µg/dl for corticosterone and  $5.3 \pm 0.5$  ng/ml for prolactin. Exposure to the two novel environments for 20 min elicited an increase in plasma levels of the three hormones measured immediately after the tests (Fig. 2). The repeated measures ANOVAs revealed that “test” was statistically significant for ACTH ( $F(1,47) = 11.31$ ,  $p < 0.01$ ) and corticosterone ( $F(1,47) = 9.54$ ,  $p < 0.01$ ), and marginally significant for prolactin ( $F(1,34) = 4.01$ ,  $p = 0.053$ ). “Time” was also statistically significant for ACTH ( $F(2,94) = 62.81$ ,  $p < 0.001$ ), corticosterone ( $F(2,94) = 198.76$ ,  $p < 0.001$ ) and prolactin ( $F(1,34) = 85.22$ ,  $p < 0.001$ ). The interaction “time × test” was statistically significant for ACTH ( $F(2,94) = 9.36$ ,  $p < 0.001$ ), corticosterone ( $F(2,94) = 7.37$ ,  $p = 0.001$ ) and prolactin ( $F(1,34) = 4.93$ ,  $p < 0.05$ ). Further breakdown of the interactions showed that plasma levels of ACTH, corticosterone and prolactin were significantly greater immediately after the hole-board than after the light–dark ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively), the differences being maintained at 30 min post-test in the case of ACTH ( $p < 0.01$ ) and corticosterone ( $p < 0.05$ ).

Correlations between AUCs of a given hormone in both novel environments were high and consistent (prolactin:  $r = +0.90$ ,  $p < 0.001$ ; ACTH;  $r = +0.68$ ,  $p < 0.001$ ; corticosterone:  $r = +0.53$ ,

$p < 0.001$ ). Correlations between ACTH and corticosterone AUCs in a given test were also high (hole-board:  $r = +0.73$ ,  $p < 0.001$ ; light–dark:  $r = +0.74$ ,  $p < 0.001$ ), although prolactin response did not correlate with the other hormones.

#### 3.5. How individual differences modify the hormonal reactivity to the novel environments

Basal levels of the three hormones studied were unaffected by individual differences in the circular corridor or the plus-maze. Regarding ACTH response to the two novel environments, initial activity was the only statistically significant between-subject factor (Fig. 3,  $F(1,44) = 5.26$ ,  $p < 0.05$ ), with no effect of anxiety (Fig. 4) or the interaction between the factors. HR1 animals showed a higher and prolonged ACTH response to the test than LR1 animals. Consistently with ACTH data, LR1–HR1 animals also differed in corticosterone response to the novel environments. MANOVA analysis showed that initial activity and the interaction of initial activity with time were statistically significant ( $F(1,44) = 6.03$ ,  $p = 0.05$ ;  $F(2,88) = 6.74$ ,  $p < 0.01$ , respectively). The breakdown of the interaction showed that HR1 rats presented a higher corticosterone response to both the hole-board and the light–dark than LR1 animals, but only during the post-test times. In contrast to the significant effect of initial activity, the MANOVA analysis revealed no significant effects of delayed activity on ACTH and corticosterone response to the novel environment (Table 3). Global activity was neither statistically significant. Finally, MANOVA analyses showed no significant effect of reactivity to nov-

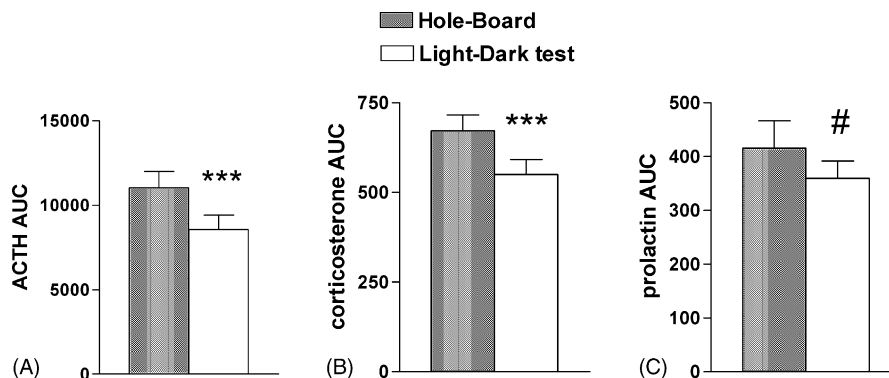


Fig. 2. AUCs of ACTH (A), corticosterone (B) and prolactin (C) responses to 20 min of exposure to the hole-board and the light–dark. Means and S.E.M. ( $n = 23$ –24 for each group) are represented. #Marginal; \*\*\*  $p < 0.001$ .



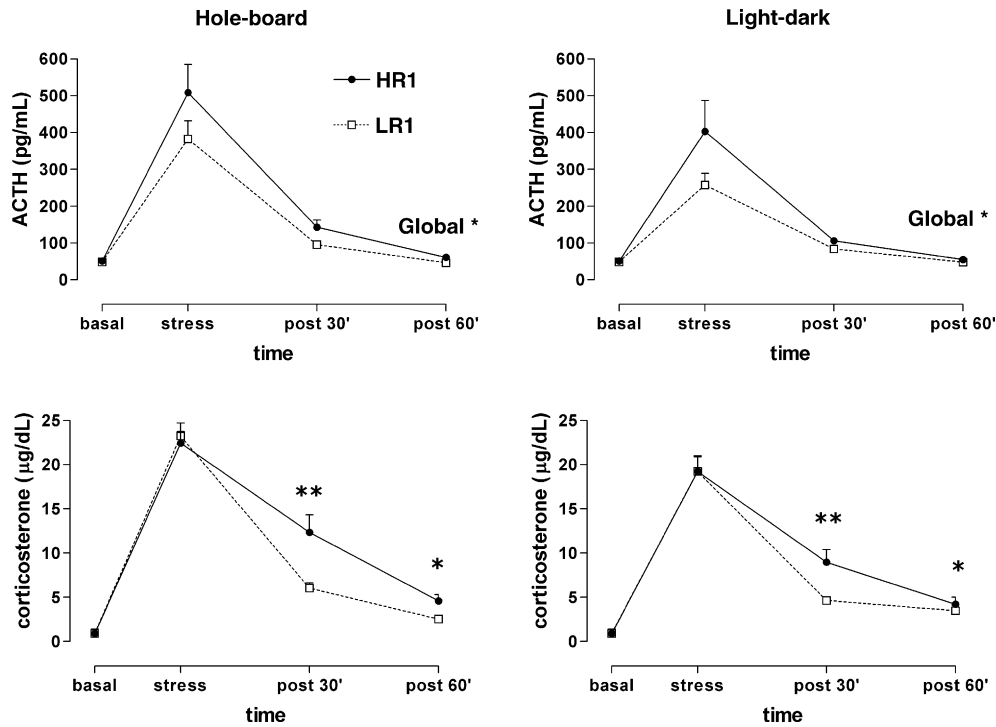


Fig. 3. ACTH and corticosterone responses immediately after the 20 min of exposure to the hole-board and the light–dark (“stress”) and at 30 and 60 min post-test, for LR1 and HR1 animals. Means and S.E.M. ( $n = 24$  for each group) are represented. Basal levels, taken another day, are also included for comparison. The global MANOVA of ACTH data showed that differences between groups were statistically significant across the three sampling times (\*global differences,  $p < 0.05$ ). The MANOVA of corticosterone data showed a group by sampling-time interactions and additional comparisons are indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

elty or anxiety on prolactin response to the novel environments.

In order to further study the relationship between anxiety and reactivity to stressors, animals were again classified into

two groups on the basis of their simultaneously high and low level of anxiety as measured by both, the time spent in the open arms of the elevated plus-maze and the central ambulations in the hole-board. This criteria led to two subgroups ( $n = 15$  in

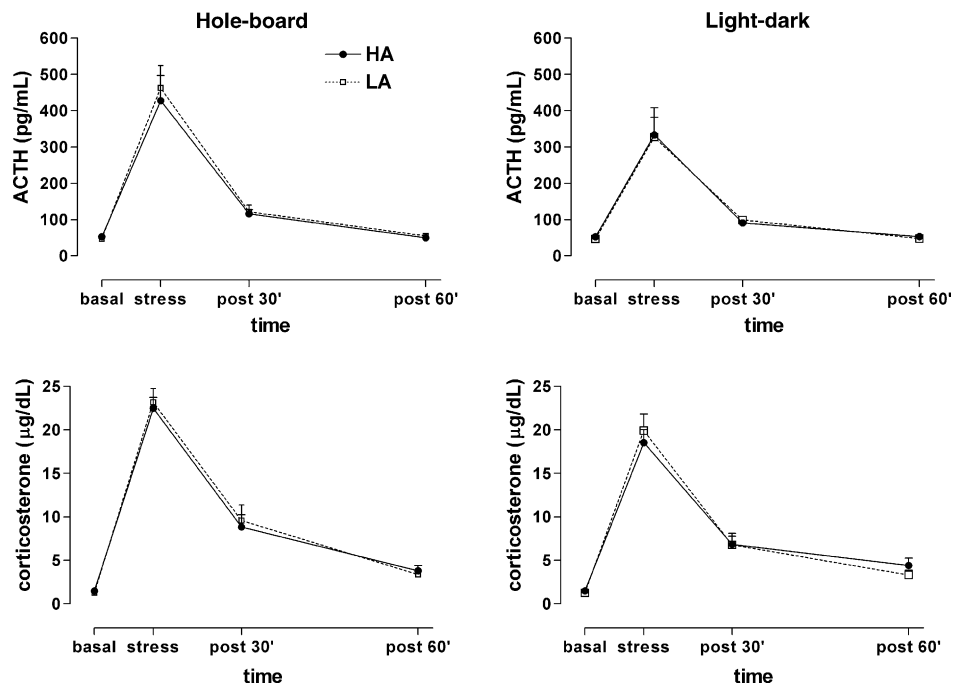


Fig. 4. ACTH and corticosterone responses immediately after the 20 min of exposure to the hole-board and the light–dark (“stress”) and at 30 and 60 min post-test, for LA and HA animals. Means and S.E.M. ( $n = 24$  for each group) are represented. Basal levels, taken another day, are also included for comparison. The global MANOVA of ACTH and corticosterone data revealed no effect of group or the interaction sampling-time by group.

Table 3  
ACTH and corticosterone plasma levels after 20 min of exposure to two novel environments for LR2 and HR2 rats

	Basal	Hole-board			Light-dark		
		Stress	Post 30	Post 60	Stress	Post 30	Post 60
ACTH (pg/ml)							
LR2	48.7 ± 2.5	443.1 ± 58.8	106.7 ± 9.3	49.2 ± 3.4	334.7 ± 48.6	91.2 ± 7.8	51.6 ± 3.4
HR2	50.7 ± 2.2	447.1 ± 71.5	130.6 ± 18.9	57.1 ± 4.3	325.1 ± 79.1	98.3 ± 8.7	50.5 ± 3.7
Corticosterone (µg/dl)							
LR2	1.2 ± 0.2	22.5 ± 1.4	7.9 ± 1.0	2.7 ± 0.5	19.0 ± 2.0	6.4 ± 1.0	3.1 ± 0.4
HR2	1.5 ± 0.2	23.2 ± 1.4	10.5 ± 2.0	4.4 ± 0.7	19.4 ± 1.5	7.2 ± 1.3	4.6 ± 0.9

Samples were taken immediately after the hole-board or the light-dark (stress) and 30 and 60 min after the termination of exposure. Basal levels, taken another day, are also shown. See text for details.

each): LA (time in open arms:  $126.3 \pm 7.6$  s; central ambulations:  $9.9 \pm 1.5$ ) and HA (time in open arms:  $41.8 \pm 6.8$  s; central ambulations:  $1.3 \pm 0.3$ ) rats. MANOVA analysis again did not reveal differences in ACTH, corticosterone or prolactin response to the tests in function of anxiety.

#### 4. Discussion

In the present experiment, a population of adult male rats was classified as HR-LR on the basis of its horizontal activity in a circular corridor, and as HA-LA according to time spent in the open arms of the plus-maze. After that, all animals were exposed for 20 min to two different novel environments (hole-board and light-dark) and blood samples were taken just after the termination of exposure to the environments and again 30 and 60 min later (post-tests). Whereas HA-LA did not differ in plasma ACTH, corticosterone or prolactin responses to the two environments, HR showed a higher ACTH and corticosterone responses than LR rats, if the criterion to classify the animals was the activity during the first 15 min in the circular corridor. No group difference was found in prolactin response. In addition, in no case an interaction between reactivity to novelty and fear/anxiety traits was observed, precluding a complex relationship between both.

ACTH, corticosterone and prolactin responses to the hole-board were significantly higher than that seen in response to the light-dark. Therefore, the present data indicate that the hole-board is more stressful than the light-dark. In a previous report we also observed the hole-board to be slightly more stressful than the circular corridor or the plus-maze [37]. A likely explanation is that the hole-board is particularly stressful because of its relatively large open (unprotected) space and the lack of possibility of choosing a less stressful environment (dark box) as compared to the light-dark. Probably, the element of control may attenuate levels of stress in the light-dark. However, HR animals presented a higher and prolonged HPA response in both environments, regardless of the differences in the magnitude of the stressor and the hypothesised differences in controllability.

Good correlations were observed between the endocrine response to the hole-board and the light-dark, supporting and extending our previous report of a good within-individual reliability of the HPA response to different novel environments [37]. The finding that not only HPA hormones, but also another

prototypical stress marker such as prolactin showed a good correlation in two different novel environments, strongly suggests that stable individual factors are determining the physiological response to stressors. However, no consistent correlations were found between the HPA and prolactin responses to the novel environments, despite the apparently similar sensitivity of the two endocrine systems to stress. This lack of consistent correlations confirms previous results from our [36] and other [14] laboratories and suggests that stress-related factors underlying activation of the two endocrine systems are different. It thus supports the hypothesis that emotionality is a multifactorial construct [48] that can be approached by different physiological or behavioural tests.

No differences between groups were observed either in plasma morning levels of ACTH and corticosterone, which indicates that basal activity of the HPA axis is not influenced by behavioural traits of interest. Whereas fear/anxiety was not found to influence the HPA and prolactin responses to the novel environments, HR rats showed a higher HPA response than LR rats, if the activity during the first period in the circular corridor (HR1-LR1) was considered. The effect disappeared when only the activity in the second period (HR2-LR2) was considered. No interaction between the reactivity to novelty and anxiety factors was observed, suggesting a contribution of reactivity to novelty which is independent on the level of fear/anxiety. During prolonged exposures to novel environments, particularly square ones, the activity strongly decline over time and the contribution of the initial activity to total activity is usually strong. Therefore, it is unclear the extent to which we are measuring the same underlying factor irrespective of the shape of and length of exposure to the novel environment. Clearly, a more thoroughly characterisation of the novelty-seeking trait is needed, taking into account that not only reactivity to novel environments, but also interest for novel situations and objects should be considered [6,29].

It is of note that differences between HR1 and LR1 rats in the ACTH response to the novel environments were observed at all sampling times, whereas differences in corticosterone were restricted to the post-test periods. This is not a surprising finding than can be explained as follows. Differences between groups in plasma ACTH could progressively emerge during the prolonged exposure to the novel environments, and the greater ACTH response of HR1 rats could be reflected in plasma corticosterone only in the post-test period considering the delay

between ACTH release and maximum corticosterone secretion (at least 15 min).

The finding that HR1 rats showed a higher HPA response than LR1 rats to novel environments is in accordance with previous results from other labs [26,44,45]. However, differences in the response to other stressors remain controversial [8,18,26]. Since in all previous reports HR rats were demonstrated to be, when tested, LA [17,26], the separate contribution of each trait to the enhanced HPA response to the novel environments remained unclear. Our present results extend the above previous findings by demonstrating that the higher response of HR rats is not influenced by the fear/anxiety trait, at least under the present conditions. In a previous report [26], it was found that HR rats also showed important differences in some central variables of the HPA axis. Thus, HR rats were found to have higher basal levels of mRNA for the corticotropin-releasing factor (CRF) in the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (pPVN) and lower levels of mRNA for glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampal formation. CRF neurons in the pPVN are considered to be critical for the responsiveness of pituitary–adrenal hormones to stress, and this response appears to be restrained by the negative feedback of corticosterone through its interaction with GR in several brain areas, including the hippocampal formation [16]. Therefore, HR rats appear to be characterised by an increase capability of the HPA axis to respond to stress. However, why such capability is not always found after stressors more severe than novel environments is unclear. The increased HPA responsiveness to stress in HR rats is in good agreement with the positive relationship between ACTH response to a psychologically induced stressor and novelty-seeking scores found in humans [41].

The lack of effect of the fear/anxiety trait to the HPA response to stress remains to be discussed. As commented in the Introduction, there are discrepancies between labs and between strains regarding the contribution of fear/anxiety to the activation of the HPA axis. These data, together with our present results, may support the view that emotional reactivity, as evaluated in the present experiment by the release of HPA hormones and prolactin, cannot be equated to fear/anxiety, as evaluated by the behaviour displayed in threatening situations. In fact, the own concept of fear/anxiety is probably multifactorial [48] and there are numerous examples of dissociation between anxiety measured in different tests, including between elevated plus-maze and both hole-board (i.e. ref. [2]) and light–dark (i.e. ref. [25]). On the basis of the results of the factorial analysis and in order to confirm that anxiety has no effect on HPA response to the novel environments, we classify the animals as LA or HA on the basis of both the time spent in the open arms of the elevated plus-maze and the central ambulations in the hole-board. That is, those showing anxious behaviour in the two situations. In spite of this approach, hormonal response to the novel environment was again found to be independent on the anxiety trait. These results strongly suggest that anxiety, as evaluated by the behaviour of animals, and the concomitant activation of the neuroendocrine system are dissociated. Anxiety-related behaviour may involve some type of conscious processing of the aversive stimuli closely related to emotional experience, whereas the

neuroendocrine response may be controlled by parallel but independent brain circuits, the two diverging early in the processing of the situation. In accordance with the present results, the relationship between basal levels of anxiety and HPA reactivity has usually found to be non-significant in humans [41,49,52,54]. However, the present results does not preclude that differences could be found when rats showing extreme differences in anxiety are tested. Thus, it has been observed an enhanced ACTH response to an elevated platform in outbred Wistar rats extremely differing in the exploration of the open arm of the plus-maze [31].

In conclusion, the present results have demonstrated a good within-subject reliability in the endocrine response to novel environments and a higher HPA, but not prolactin, response of rats displaying a high level of activity in the circular corridor as compared to those showing low activity. In contrast, no effect of the fear/anxiety trait was observed, what argues against the hypothesis that higher levels of (non-pathological) anxiety should be reflected in a higher physiological response to stressors.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Delegación del Gobierno sobre el Plan Nacional sobre Drogas (Ministerio del interior) and the ISCIII (G03/005, Redes temáticas, Ministerio de Sanidad).

## References

- [1] Abel EL. Behavior and corticosteroid response of Maudsley reactive and nonreactive rats in the open field and forced swimming test. *Physiol Behav* 1991;50:151–3.
- [2] Adamec RE, Shallow T, Budgell J. Blockade of CCK<sub>B</sub> but not CCK<sub>A</sub> receptors before and after the stress of predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Behav Neurosci* 1997;111:435–49.
- [3] Armario A, Gil M, Marti J, Pol O, Balasch J. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;39:373–7.
- [4] Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Castellanos JM. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 1986;39:471–5.
- [5] Bagdy G, Makara GB. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions differentially affect serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist-induced oxytocin, prolactin and corticosterone responses. *Endocrinology* 1995;134:1127–31.
- [6] Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res* 1996;77:23–43.
- [7] Blizard DA, Adams N. The Maudsley reactive and nonreactive strains: a new perspective. *Behav Genet* 2002;32:277–99.
- [8] Bouyer JJ, Vallee M, Deminière JM, Le Moal M, Mayo W. Reaction of sleep-wakefulness cycle to stress is related to differences in hypothalamo–pituitary–adrenal axis reactivity in rat. *Brain Res* 1998;804:114–24.
- [9] Brush FR. The Syracuse strains, selectively bred for differences in active avoidance learning, may be models of genetic differences in trait and state anxiety. *Stress* 2003;6:77–85.
- [10] Brush FR, Isaacson MD, Pellegrino LJ, Rykaszewski IM, Shain CN. Characteristics of the pituitary–adrenal system in the Syracuse high- and low-avoidance strains of rats (*Rattus norvegicus*). *Behav Genet* 1991;21:35–48.

- [11] Buda M, Lachuer J, Devauges V, Barbagli B, Blizard D, Sara SJ. Central noradrenergic reactivity to stress in Maudsley rat strains. *Neurosci Lett* 1994;167:33–6.
- [12] Castanon N, Dulluc J, Le Moal M, Mormède P. Maturation of the behavioral and neuroendocrine differences between the Roman rat lines. *Physiol Behav* 1994;55:775–82.
- [13] Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992;267:1244–52.
- [14] Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieu A, Hendley ED, Mormède P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res* 1996;743:77–85.
- [15] De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 1990;47:1117–24.
- [16] De Kloet ER. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol* 1991;12:95–164.
- [17] Dellu F, Mayo W, Piazza PV, Le Moal M, Simon H. Individual differences in behavioural response to novelty in rats. Possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Pers Individual Diff* 1993;15:411–8.
- [18] Dellu F, Mayo W, Vallee M, Maccari S, Piazza PV, Le Moal M, et al. Behavioral reactivity to novelty during youth as a predictive factor of stress-induced corticosterone secretion in the elderly—a life-span study in rats. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:441–53.
- [19] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 1999;67:19–26.
- [20] Fernandes C, González MI, Wilson CA, File SE. Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64:731–8.
- [21] File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 1975;44:53–9.
- [22] Gavalda A, Benyassi A, Arancibia S, Armario A. Chronic but not acute exposure to stress is associated with hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) release into median eminence. *J Neuroendocrinol* 1993;5:421–5.
- [23] Gentsch C, Lichtsteiner M, Driscoll P, Feer H. Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 1982;28:259–63.
- [24] Hennessy MB, Levine S. Sensitive pituitary–adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol Behav* 1978;21:295–7.
- [25] Holmes A, Kinney JW, Wrenn CC, Li Q, Yang RJ, Ma L, et al. Galanin GAL-RI receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1031–44.
- [26] Kabbaj M, Devine DP, Savage VR, Akil H. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *J Neurosci* 2000;20:6983–8.
- [27] Kant GJ, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sci* 1983;33:2657–63.
- [28] Keck ME, Welt T, Muller MB, Uhr M, Ohl F, Wigger A, et al. Reduction of hypothalamic vasopressinergic hyperdrive contributes to clinically relevant behavioral and neuroendocrine effects of chronic paroxetine treatment in a psychopathological rat model. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:235–43.
- [29] Klebaur JE, Bardo MT. Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;63:131–6.
- [30] Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, et al. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:925–35.
- [31] Landgraf R, Wigger A. Born to be anxious: neuroendocrine and genetics correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress* 2003;6:111–9.
- [32] Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, Neumann ID. Hyper-reactive hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol* 1999;11:405–7.
- [33] Liebsch G, Linthorst AC, Neumann ID, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 1998;19:381–96.
- [34] Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 1998;94:301–10.
- [35] Maier SE, Vandenhoff P, Crowne DP. Multivariate analysis of putative measures of activity, exploration, emotionality, and spatial behavior in the hooded rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 1988;102:378–87.
- [36] Márquez C, Belda X, Armario A. 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* 2002;926:181–5.
- [37] Márquez C, Nadal R, Armario A. Responsiveness of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:179–87.
- [38] Martí O, García A, Valles A, Harbuz MS, Armario A. 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* 2001;13:129–36.
- [39] Nadal R, Rotllant D, Márquez C, Armario A. Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 2005;165:72–9.
- [40] Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MS, Landgraf R. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci* 2001;115:429–36.
- [41] Oswald LM, Mathena JR, Wand GS. Comparison of HPA axis hormonal responses to naloxone vs. psychologically-induced stress. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:371–88.
- [42] Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:525–9.
- [43] Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 1989;245:1511–3.
- [44] Piazza PV, Deminière JM, Maccari S, Mormède P, Le Moal M, Simon H. Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol* 1990;1:339–45.
- [45] Piazza PV, Maccari S, Deminière JM, Le Moal M, Mormède P, Simon H. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2088–92.
- [46] Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 1997;85:57–69.
- [47] Ramos A, Correia EC, Izidio GS, Bruske GR. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behav Genet* 2003;33:657–68.
- [48] Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;22:33–57.
- [49] Roy MP, Kirschbaum C, Steptoe A. Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:375–91.
- [50] Salomé N, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, Landgraf R, et al. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* 2004;55:715–23.
- [51] Salomé N, Viltart O, Darnaudéry M, Salchner P, Singewald N, Landgraf R, et al. Reliability of high and low anxiety-related behaviour: influence of laboratory environment and multifactorial analysis. *Behav Brain Res* 2002;136:227–37.

- [52] Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA. Differential hypothalamic–pituitary–adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:01944–8.
- [53] Steimer T, Driscoll P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003;6:87–100.
- [54] van Eck MM, Nicolson NA, Berkhof H, Sulon J. Individual differences in cortisol responses to a laboratory speech task and their relationship to responses to stressful daily events. *Biol Psychol* 1996;43:69–84.

## **DISCUSIÓN**



El presente trabajo se centra en el estudio de las diferencias individuales en la respuesta endocrina al estrés. Mientras que la mayoría de estudios abordan este tema utilizando cepas de roedores seleccionados genéticamente, nosotros estamos interesados en el estudio de la susceptibilidad al estrés utilizando poblaciones de ratas adultas genéticamente diversas (*outbred*) de la cepa Sprague-Dawley, con el objetivo de prevenir posibles sesgos genéticos.

Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la velocidad de recuperación de los niveles basales de ACTH y corticosterona tras una exposición al estrés es un buen marcador de la intensidad del estrés (García et al., 2000). Hasta el momento se había asumido que la respuesta inicial de la ACTH a un estímulo estresante era un buen marcador de la intensidad de estrés. Sin embargo, como hemos comprobado en el presente trabajo, puede darse el caso de que los niveles plasmáticos de ACTH no discriminen entre estímulos estresantes severos (Márquez et al., 2002), confirmando la importancia del estudio de la dinámica de liberación de las hormonas del eje HPA después de finalizar la exposición a la situación estresante. Los datos de este trabajo apoyan que estudiado en las condiciones adecuadas, el eje HPA puede ser un muy buen marcador de la intensidad del estrés.

Basándonos en este enfoque, hemos descrito la dinámica de adaptación a un paradigma de estrés crónico, estudiando detalladamente tanto la dinámica de liberación hormonal a lo largo de los días, como diferentes variables que pueden proporcionarnos información sobre el impacto final del estrés crónico. Hemos podido observar que aunque las diferencias individuales en la respuesta al estrés van haciéndose menos pronunciadas a lo largo del protocolo de estrés crónico, la respuesta a la primera exposición al estímulo estresante predice en parte el impacto final sobre el eje HPA a nivel central (Márquez et al., 2004).

El hecho de que el perfil de la respuesta a una primera situación estresante pueda ser un índice de susceptibilidad a padecer patologías asociadas al estrés nos ha llevado a intentar caracterizar más detalladamente los factores que pueden estar determinando esta respuesta a una primera exposición a una situación estresante. Como paso previo a la caracterización de factores



pronóstico de la respuesta de estrés hemos estudiado la consistencia y estabilidad de la respuesta al estrés de las hormonas del eje HPA. Hemos observado que la liberación de ACTH y corticosterona es bastante consistente frente a diferentes estímulos estresantes de intensidad moderada (ambientes nuevos), independientemente de las características particulares de cada ambiente, lo que sugiere que la liberación de las hormonas del eje HPA puede ser considerada una característica individual (rasgo) de cada animal. Sin embargo, cuando se han comparado situaciones estresantes que difieren ampliamente en cuanto a características cualitativas e intensidad, esta consistencia es mucho menor. Puesto que la mayor parte de los datos en la literatura en cuanto a susceptibilidad al estrés y diferencias individuales han utilizado situaciones estresantes de intensidad moderada, decidimos iniciar el estudio acerca de qué factores de personalidad podrían estar relacionados con la respuesta al estrés utilizando ambientes nuevos. Gracias a la estrategia de caracterización conductual que nos ha permitido estudiar independientemente la influencia del rasgo de ansiedad del de actividad/exploración en ambientes nuevos, hemos descrito que la ansiedad no parece afectar el nivel de activación del eje en estas situaciones, pero los animales HR (altamente reactivos a la exposición a un ambiente nuevo, *high responders*) muestran una mayor y más prolongada liberación de ACTH que los LR (poco reactivos a un ambiente nuevo, *low responders*), traduciéndose este hecho en diferencias en los niveles de corticosterona en el periodo post-estrés.

### **¿Qué información nos aporta el eje HPA acerca del estrés?**

Considerando la importancia que la liberación de glucocorticoides puede tener en la aparición o desarrollo de determinadas patologías asociadas al estrés, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido continuar el estudio del eje HPA como marcador de la intensidad de estrés. Como apuntábamos en la Introducción, existen diferentes características de una variable que debemos tener en cuenta cuando queremos interpretar los resultados obtenidos en términos de intensidad de estrés: (i) el grado de severidad mínimo que una variable particular es capaz de detectar de manera fiable y consistente (umbral); (ii) el rango de variación que podemos observar en relación a la variable de interés; y (iii) el rango de intensidades de estrés que una variable es capaz de detectar.

En cuanto al primer aspecto, y en concordancia con datos previos de nuestro laboratorio (Armario et al., 1986a), hemos confirmado que el eje HPA muestra un umbral de activación relativamente bajo, como se puede desprender de la activación causada por la exposición a ambientes nuevos o por la incisión en la cola del animal como método de extracción de muestras de sangre (Márquez et al., 2004, 2005, 2006).

En segundo lugar, los niveles de ACTH y corticosterona muestran un rango muy amplio de respuesta. En ratas macho y en nuestras condiciones, los niveles basales de ACTH se encuentran entre 20 y 100 pg/ml, pudiendo aumentar tras un estrés severo hasta 2000-4000

pg/ml. En cuanto a la corticosterona, encontramos niveles basales de alrededor de 1  $\mu\text{g/dl}$  que pueden aumentar hasta 30 y 40  $\mu\text{g/dl}$  tras un estrés severo (García et al., 2000, Márquez et al., 2002, Márquez et al., 2004). De todos modos, aunque la ACTH y la corticosterona nos ofrece un rango de valores mucho mayor que los niveles plasmáticos de glucosa, para interpretar correctamente la información que nos aportan estas hormonas hemos de tener en cuenta una serie de consideraciones. En primer lugar, hemos de conocer cuál es su dinámica de liberación. Debido al desfase temporal entre la liberación de ACTH y la síntesis y liberación de corticosterona, los datos obtenidos antes de los 15-20 minutos pueden llevarnos a conclusiones equivocadas, ya que los niveles de corticosterona pueden no haber alcanzado su nivel máximo. En segundo lugar, aunque los niveles de ACTH pueden alcanzar niveles elevados, cuando se estudia su liberación durante la exposición prolongada a un estímulo, se observa una disminución progresiva explicada en parte por un agotamiento hipofisario. Por tanto, el estudio puntual de los niveles de esta hormona tras un estrés prolongado puede llevarnos a conclusiones erróneas. Otro punto importante es que se pueden alcanzar niveles máximos de corticosterona con niveles moderados de ACTH, por lo que en muchas situaciones, el analizar sólo los niveles de corticosterona puede conducirnos a error (Martí y Armario, 1998, Márquez et al., 2004).

En tercer lugar, el estudio de la activación del eje HPA ante situaciones de estrés es capaz de detectar de manera precisa un amplio rango de intensidades de estrés. En el presente trabajo hemos descrito diferencias sutiles en la liberación de ACTH y corticosterona entre diferentes ambientes nuevos (corredor circular, laberinto elevado en cruz, tabla de agujeros y prueba de luz-oscuridad). Teniendo en cuenta el amplio uso de estas pruebas conductuales en el campo de la psicofarmacología, parece sorprendente que no se hayan comparado de manera directa sus propiedades estresantes. Nuestros datos indican que los ambientes más desprotegidos (la tabla de agujeros) serían más estresantes que aquellos más protegidos (corredor circular) o aquellos en los que la exploración es voluntaria (prueba de luz-oscuridad) (Márquez et al., 2005, 2006). Estos datos son concordantes con datos previos que sugerían que la activación del eje HPA estaría determinada por el grado de *tigmotaxis* (falta de protección en espacios abiertos) de la situación (Pellow et al., 1985), así como por el grado de imposición de la situación por parte del experimentador (Kabbaj et al., 2000). De todos modos, importantes diferencias cualitativas en las pruebas conductuales utilizadas tan sólo se reflejan en pequeños cambios hormonales. Por lo tanto, el nivel de activación del eje HPA no siempre revela aspectos importantes de la situación estresante. Como ejemplo muy significativo, la activación del eje HPA, incluyendo el periodo post-estrés, fue similar tras la exposición a choques eléctricos controlables e incontrolables (Maier et al., 1986), a pesar de que la controlabilidad de la situación estresante se ha descrito como crítica en cuanto a las consecuencias conductuales del choque. En el mismo sentido, datos de nuestro laboratorio han demostrado una respuesta HPA similar tras la exposición a choques eléctricos temporalmente regulares o irregulares (Márquez

et al., datos no publicados). Por tanto, aunque la activación del eje HPA es un buen marcador de estrés, es incapaz de reflejar determinadas características cualitativas de las situaciones estresantes.

Cuando hemos comparando la respuesta del eje HPA frente a dos estímulos estresantes intensos como el choque eléctrico y la IMO, hemos observado que los niveles de ACTH y corticosterona eran similares medidos justo tras la finalización del estrés (1 hora), pero las diferencias entre los dos estímulos se hacían evidentes durante los 90 min post-estrés: tanto los niveles de ACTH como los de corticosterona descendían rápidamente tras el choque, mientras que continuaban elevados tras la IMO (Márquez et al., 2002). La información obtenida con las hormonas del eje HPA es concordante con la aportada por los otros marcadores independientes del eje HPA como la hiperglicemia, los niveles plasmáticos de prolactina o la reducción de ingesta de comida. Por tanto, parece evidente que necesitamos valorar los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona en la etapa post-estrés para evaluar apropiadamente la intensidad de la situación estresante. De todos modos, estos otros marcadores de estrés muestran umbrales de activación diferentes a las hormonas del eje HPA, como es el caso de los niveles de glucosa, que sólo se pueden considerar fiables ante exposiciones a estímulos estresantes de intensidad intermedia, o en el caso de la inhibición de la ingesta de comida, que muestra también un umbral elevado y puede observarse solamente tras situaciones estresantes relativamente severas (Vallès et al., 2000, Márquez et al., 2002).

En nuestros trabajos, hemos descrito también una correlación consistente entre el peso relativo de la adrenal y la capacidad de liberación de glucocorticoides, tanto tras estímulos estresantes suaves (incisión en la cola) como tras estímulos de elevada intensidad. Esta correlación no se observó con niveles hormonales basales o ante situaciones estresantes moderadas. Es decir, el peso relativo de la adrenal estaría positivamente relacionado tanto con la sensibilidad de la adrenal a estimulaciones suaves y breves con ACTH, como con la capacidad máxima de liberación de corticosterona (Márquez et al., 2004).

Un dato importante es que los niveles basales de ACTH y corticosterona no parecen estar relacionados con la reactividad del eje HPA al estrés (Márquez et al., 2005), ni aunque se analicen los niveles de ACTH y corticosterona en la fase nocturna del ritmo circadiano, cuando los niveles son relativamente elevados. Estos datos son relevantes porque podrían explicar parte de los resultados aparentemente contradictorios que se encuentran en la literatura respecto al eje HPA como marcador biológico de diferentes psicopatologías.

## Diferencias individuales y adaptación al estrés crónico

Aunque el estudio de las diferencias individuales en la respuesta aguda del eje HPA al estrés es de interés, muchas situaciones de estrés son crónicas y por lo tanto era importante investigar la relación entre la respuesta inicial a un estímulo estresante de elevada intensidad y la capacidad de adaptación al mismo tras una exposición repetida. Para ello realizamos un experimento en el que se expuso a los animales a una situación estresante de intensidad severa (una hora diaria de IMO) durante 13 días (Márquez et al., 2004). Para poder estudiar con detalle el proceso de habituación se siguió la dinámica de liberación hormonal en diferentes días, la ingesta diaria de comida y el cambio del peso corporal. Al día siguiente a la última exposición a la IMO (día 14) se sacrificaron los animales en condiciones basales para valorar la actividad central del eje HPA, así como el peso del timo y la adrenal.

Como era de esperar, la exposición a la IMO causó una intensa respuesta fisiológica, que a nivel de las hormonas del eje HPA se tradujo en una prolongada activación post-estrés. Sin embargo, la experiencia previa con la IMO aceleró notablemente el proceso de recuperación post-estrés, confirmando datos previos de nuestro laboratorio con la IMO y con otro estímulo de gran intensidad como la administración de solución salina hipertónica (García et al., 2000). De hecho, una sola experiencia previa con la IMO es suficiente para acelerar el proceso de recuperación post-estrés (Martí et al., 2001), lo que indica claramente que las hormonas periféricas del eje HPA son extraordinariamente sensibles a la experiencia previa de los animales con un estímulo estresante, incluso si es de gran intensidad como la IMO. Considerando el período post-estrés, se observó una progresiva reducción de los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa con la repetición de la exposición a la IMO. Sin embargo, esta reducción de la respuesta no fue lineal a lo largo de los días: parece existir un proceso de adaptación rápido durante los primeros días, seguido de otro posterior mucho más lento. Es probable que frente a estímulos de intensidad elevada o de tipo traumático podría ser adaptativo para el organismo mantener un cierto nivel de respuesta.

El estudio de las correlaciones reveló que la respuesta de la ACTH durante la primera IMO no correlacionaba con la respuesta en los días subsiguientes, mientras que la de días posteriores sí correlacionaba entre sí. Aparentemente, la respuesta durante la primera exposición no predice la activación periférica tras la exposición repetida, sugiriendo que están implicados mecanismos diferentes.

Por otro lado, nuestros resultados han confirmado que existen cambios fisiológicos prototípicos tras la exposición a un estrés crónico de elevada intensidad: reducción de la ingesta de comida y de la curva de crecimiento de peso corporal, reducción del tamaño del timo e hipertrofia adrenal (Ruisseau et al., 1978, Armario et al., 1988, Armario et al., 1990b, Ottenweller et al., 1992, Martí et al., 1993, Ottenweller et al., 1994, Martí y Armario, 1997). También hemos

observado un aumento en los niveles basales de ACTH y corticosterona, ya detectado en las primeras etapas del estrés crónico, que se mantiene a lo largo de todo el experimento. El incremento en los niveles basales de corticosterona a las 24 h de la exposición aguda o crónica a estímulos estresantes intensos es un fenómeno muy consistente en la literatura (v.g. García y Armario, 2001).

A nivel central, la exposición repetida a la IMO causó un aumento tónico de la expresión del gen del CRF en el PVN así como una disminución de la expresión de GR en el CA1 y en el GD, también en concordancia con resultados previos (Gómez et al., 1996). Sorprendentemente, se observó una correlación positiva entre los niveles de ACTH tras la primera exposición a la IMO y los niveles de mRNA del CRF en el PVN al final del protocolo de estrés, correlación que vino apoyada por la diferencia de medias en función del mismo criterio de liberación de ACTH en el primer día. Por lo tanto, aquellos animales que responden más intensamente a la primera exposición al estrés son aquellos que muestran un mayor impacto final a nivel del estado tónico central del eje HPA, a pesar de que la respuesta inicial no parece correlacionar con la respuesta en los días sucesivos. Se podría argumentar que los animales que mostraban mayores niveles de ACTH se caracterizarían también por unos mayores niveles de expresión de CRF anteriores al estrés crónico, sin que el estrés crónico hubiera cambiado esta condición. Sin embargo, esto es poco probable. En otro experimento llevado a cabo en nuestro laboratorio no se encontró relación entre la respuesta periférica al choque eléctrico o la IMO y el estado basal del eje HPA a nivel central valorado una semana después (Márquez et al., datos no publicados). Por lo tanto parece que los animales con mayor capacidad de respuesta del eje HPA a estímulos estresantes intensos son los que acaban teniendo una mayor activación tónica central del eje tras situaciones crónicas.

La duración de los cambios en las variables centrales del eje HPA causados por la IMO crónica no la hemos investigado y existen pocos estudios en la literatura. En un estudio reciente se ha descrito que el aumento en los niveles de mRNA del CRF en el PVN tras un protocolo de estrés crónico variable se observa 16 horas después de la última exposición al estrés, pero vuelve a niveles normales a partir del cuarto día post-estrés (Ostrander et al., 2006). En cambio la inhibición de la transcripción de GR en la formación hipocámpal tras estrés crónico puede persistir más de un semana (Kitraki et al., 1999). Estudios de nuestro laboratorio tras una sola exposición a la IMO no han observado cambios en la expresión basal del gen del CRF en el PVN tras una semana (Vallès et al., 2003).

## **Diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés: consistencia**

Puesto que el eje HPA es uno de los sistemas prototípicos de la respuesta de estrés y su activación está positivamente relacionada con la intensidad de la situación estresante (Hennessy y Levine, 1978, Armario et al., 1986a, De Boer et al., 1990), parece lógico asumir que los individuos que perciben las situaciones como más estresantes muestren también una mayor reactividad del eje HPA. Tal y como se ha comentado en la Introducción, se han dedicado muchos esfuerzos para establecer una relación entre rasgos de personalidad y reactividad diferencial del eje HPA. Sin embargo debemos preguntarnos si es realmente posible clasificar a los individuos como hiper o hiporeactivos en términos de actividad del eje HPA y bajo qué condiciones. Es sorprendente la falta de datos al respecto en la literatura. El presente trabajo aporta por primera vez datos en animales acerca de la estabilidad y consistencia de la respuesta hormonal periférica del eje HPA ante situaciones estresantes que difieren tanto cualitativamente como cuantitativamente.

En el presente trabajo hemos estudiado, utilizando diseños intra-sujetos, la consistencia de la respuesta del eje HPA ante diferentes situaciones estresantes. Las correlaciones entre los niveles de ACTH y los de corticosterona fueron en general altos ( $r$  alrededor de +0.70). Cuando se investigaron las correlaciones entre la respuesta individual de cada hormona a distintos ambientes nuevos ampliamente utilizados en psicofarmacología (corredor circular, laberinto elevado en cruz, tabla de agujeros y prueba de luz-oscuridad), se observó una buena consistencia. Sin embargo, conviene destacar que las correlaciones encontradas entre los niveles de ACTH justo después de 15 minutos de exposición a las pruebas conductuales fueron más altas que las obtenidas entre los niveles de corticosterona (Márquez et al., 2005). Es muy probable que la menor consistencia de la respuesta de la corticosterona en este experimento fuera debida al tiempo de toma de muestra, ya que cuando se estudió la correlación entre los niveles de ACTH o entre los de corticosterona justo después de la exposición a 20 min (no a los 15 min) de la prueba de luz-oscuridad o la tabla de agujeros, las correlaciones entre pruebas fueron similares para ambas hormonas, alrededor de 0.70 (Márquez et al., 2006). Por lo tanto, la elección de los momentos de toma de muestra es un aspecto clave cuando se pretende estudiar diferencias individuales en la reactividad al estrés. Este hecho adquiere especial relevancia si tenemos en cuenta que algunos estudios de caracterización de diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés han utilizado periodos demasiado cortos tras la exposición a los ambientes nuevos (v.g. 10 min), en los que se hace difícil la evaluación de la activación real de la corteza adrenal (Gentsch et al., 1982, Abel, 1991).

Hemos demostrado también que no sólo las hormonas del eje HPA sino la prolactina, otro marcador prototípico de la respuesta de estrés, muestra una buena correlación entre dos

ambientes nuevos: la tabla de agujeros y la prueba de luz-oscuridad (Márquez et al., 2006). Estos datos sugieren que existen realmente factores individuales estables (rasgos) que están determinando la respuesta a las situaciones estresantes y que podrían permitirnos clasificar a los animales en función de su fenotipo de respuesta de estrés. Sin embargo conviene matizar que no se encontraron correlaciones entre los niveles de ACTH (o corticosterona) y los de prolactina, a pesar de que ambos sistemas muestran una sensibilidad similar ante situaciones estresantes. Esta baja correlación del eje HPA con la prolactina se ha observado también en respuesta a estímulos estresantes severos (Márquez et al., 2002) y confirma también datos de otros laboratorios (Courvoisier et al., 1996). Esto apoya la hipótesis que la emotividad es un constructo multifactorial que debe ser abordado utilizando diferentes variables tanto fisiológicas como conductuales (Ramos y Mormède, 1998). La utilización simultánea de diferentes marcadores de estrés puede permitir alcanzar conclusiones más globales y fiables en cuanto al rompecabezas de las diferencias individuales en la respuesta al estrés.

Mientras que hemos demostrado una alta consistencia en la respuesta del eje HPA o de la prolactina a diversos ambientes nuevos, esta consistencia fue mucho menor cuando se estudiaron las correlaciones de las diferentes hormonas tras exposición a la tabla de agujeros y a la IMO. Es decir, que frente a situaciones de estrés moderado los animales muestran un patrón consistente de respuesta hormonal, pero esta consistencia se reduce cuando las situaciones difieren en intensidad o en el tipo de estrés. Este hecho es de vital importancia si se intentan establecer relaciones entre la activación neuroendocrina y otras variables, como rasgos conductuales o de personalidad. Por otro lado, nuestros resultados permiten reconciliar resultados aparentemente contradictorios, ya que podría darse el caso que un rasgo determinado estuviese prediciendo la activación hormonal ante situaciones de estrés moderado y no lo hiciese ante situaciones más severas, o viceversa. No podemos descartar totalmente que estas diferencias en la consistencia de la respuesta del eje HPA al estrés sean debidas a características cualitativas de las situaciones estresantes, dado que todos los ambientes nuevos tienen importantes aspectos en común. No obstante, la interpretación más parsimoniosa de los resultados es que no podemos definir un individuo según su fenotipo hiper o hiporeactivo al estrés sin hacer referencia al tipo de situación estresante utilizada.

Podríamos argumentar que si queremos estudiar las diferencias individuales en relación al estrés sería más apropiada la utilización de situaciones estresantes de intensidad intermedia, ya que con estímulos estresantes severos los animales podrían mostrar una respuesta demasiado elevada (efecto techo) capaz de enmascarar las diferencias individuales. Esta hipótesis asume que el impacto de un aumento de la intensidad de la situación estresante se reflejaría solamente en la saturación de la respuesta fisiológica (o psicológica) y no en la posibilidad de que existan niveles de activación a partir de los cuales se presenten alteraciones en los mecanismos adaptativos que podrían conducir a alteraciones cognitivas y emocionales. Por lo

tanto, el estudio de las diferencias individuales en respuesta a experiencias traumáticas no podría predecirse por el estudio de la reactividad frente a situaciones más moderadas.

## **Diferencias individuales en la respuesta del eje HPA al estrés: relación con rasgos conductuales**

Una vez caracterizada la consistencia de la reactividad neuroendocrina al estrés, decidimos profundizar en la relación entre la reactividad del eje HPA y de la prolactina al estrés y los rasgos conductuales de ansiedad y búsqueda de sensaciones. Como ya se ha comentado en la Introducción, los datos acerca de la relación de los rasgos de ansiedad y búsqueda de novedad con la reactividad del eje HPA distan mucho de mostrar una imagen clara y consistente. Clásicamente se ha considerado que el rasgo de ansiedad debería estar positivamente relacionado con la reactividad del eje HPA a situaciones estresantes, es decir, aquellos animales más ansiosos (HA) responderían más a situaciones estresantes que los de baja ansiedad (LA). Sin embargo, los animales HR, caracterizados por un alto nivel del rasgo de búsqueda de novedad también parecen mostrar una mayor reactividad del eje HPA, a pesar de que normalmente son también LA. ¿Tanto los animales HA como los HR se caracterizarían por una mayor reactividad del eje HPA al estrés? Esta es una cuestión crítica, ya que hasta el momento nadie había estudiado los rasgos de ansiedad y búsqueda de novedad simultáneamente para discernir entre la aportación de cada uno de ellos a la actividad del eje HPA. Dado que la mayoría de los datos acerca de la relación entre la reactividad del eje HPA y los rasgos de conducta se ha llevado a cabo utilizando estímulos estresantes moderados, en el presente trabajo nos inclinamos inicialmente por el estudio de la respuesta del eje HPA a ambientes nuevos.

Utilizando una población adulta de ratas macho, clasificamos a los animales como HR-LR en función de su actividad horizontal en el corredor circular, y como HA-LA en función del tiempo en brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Márquez et al., 2006). Tras la caracterización conductual, los animales se expusieron a la tabla de agujeros y a la prueba de luz-oscuridad durante 20 minutos para estudiar la reactividad del eje HPA y de la prolactina. Los animales HR mostraron una mayor y más prolongada actividad del eje HPA en ambas situaciones, pero sólo cuando se consideró la actividad inicial en el corredor circular. Este hecho era independiente del tipo de ambiente nuevo, es decir de las diferencias cualitativas entre ambos ambientes y el grado de voluntariedad de la exploración. Sorprendentemente, no se encontró efecto del rasgo de ansiedad en estas condiciones. Tampoco se observaron diferencias en la liberación de prolactina en función de ninguno de los rasgos conductuales.

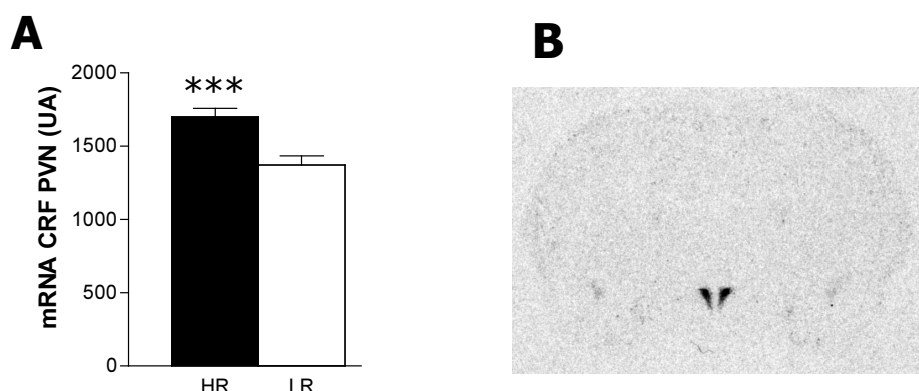
Nuestros datos acerca de la influencia de la búsqueda de novedad sobre la reactividad a ambientes nuevos tras estímulos de intensidad moderada concuerdan con datos previos de otros laboratorios (Piazza et al., 1990, Piazza et al., 1991, Kabbaj et al., 2000). Sin embargo, en



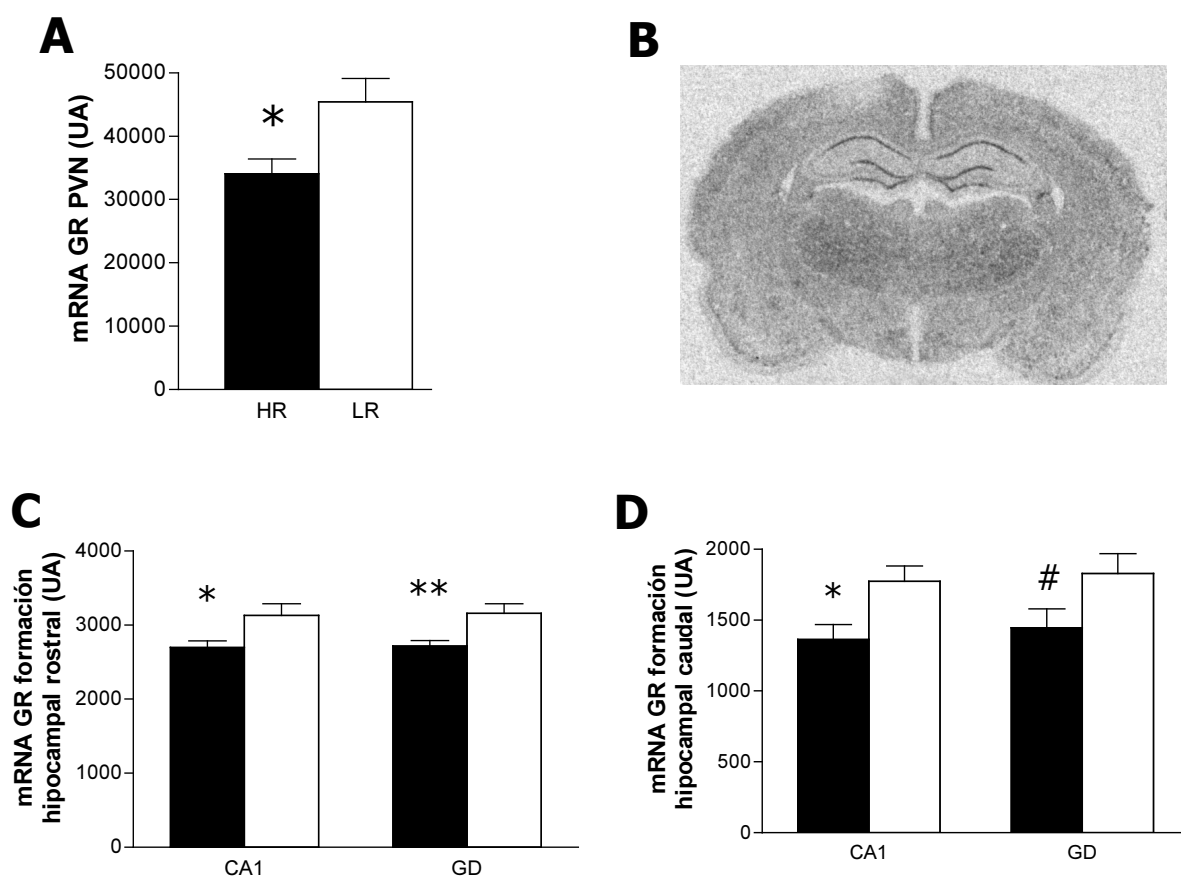
todos estos estudios, los animales diferían simultáneamente en los rasgos de búsqueda de novedad y el de ansiedad, siendo los animales HR menos ansiosos y los LR más ansiosos, y la aportación de cada rasgo independientemente no estaba clara hasta el momento. Nuestros datos demuestran que estas diferencias en función del grado de reactividad a ambientes nuevos son independientes del rasgo de ansiedad.

En concordancia con los datos periféricos, se ha descrito que los animales HR muestran también alteraciones del eje HPA a nivel central (Kabbaj et al., 2000): los animales HR tienen niveles basales más elevados de mRNA de CRF en el PVN y menores de mRNA de GR en la formación hipocampal. Por otro lado, en el mismo estudio, los HR mostraban menores niveles de mRNA de CRF en la amígdala central, datos sugerentes de una menor ansiedad (Kabbaj et al., 2000). Puesto que las neuronas de CRF en el PVN se consideran críticas en la reactividad del eje HPA al estrés y esta respuesta se ve frenada por la retroinhibición de la corticosterona a través de los receptores GR en diferentes áreas encefálicas, entre ellas la formación hipocampal (De Kloet, 1991), los animales HR muestran signos de hiperactividad del eje HPA a nivel central y periférico.

En nuestro laboratorio hemos replicado estos datos prestando especial atención a la contribución separada de la búsqueda de novedad y de la ansiedad (Márquez et al., datos no publicados). Cuando se consideraba la actividad inicial del corredor circular, los animales HR mostraban mayores niveles de mRNA del CRF en el PVN (Figura 7) y una menor expresión de GR en el PVN en CA1 y GD, tanto a nivel rostral como caudal de la formación hipocampal (Figura 8), siendo estos cambios independientes del nivel de ansiedad. Es de destacar que no se observó ninguna diferencia en las variables analizadas en función de la actividad final en el corredor circular. Por tanto, los animales HR, seleccionados en función de la actividad inicial en el corredor, se caracterizarían por una mayor capacidad del eje HPA de responder al estrés.



**Figura 7:** Efectos de la actividad inicial en el corredor circular sobre los niveles de mRNA del CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo (A). Los animales HR muestran mayores niveles. B: imagen representativa de la hibridación *in situ* para esta sonda. \*\*\*  $p < 0.001$ , t-test; UA: unidades arbitrarias.



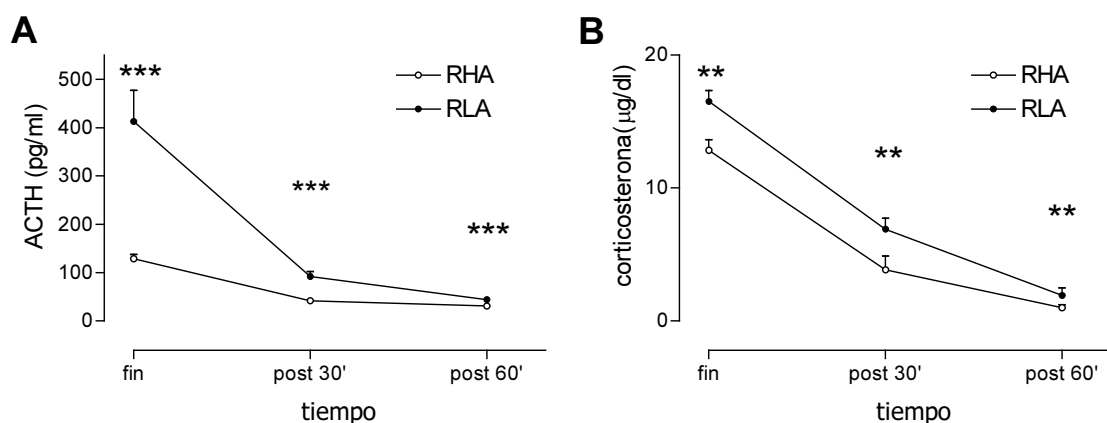
**Figura 8:** Efectos de la actividad inicial en el corredor circular sobre los niveles de mRNA de GR en el PVN (**A**) y la formación hipocampal a nivel rostral (**C**) y caudal (**D**). Los animales HR muestran menores niveles; **B:** imagen representativa de la hibridación *in situ* para esta sonda. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , t-test; UA: unidades arbitrarias.

Los datos indican que existe un efecto diferencial de la actividad en el corredor circular sobre el eje HPA cuando estudiamos la conducta inicial (primeros 15 minutos) o final (últimos 15 minutos). Las diferencias encontradas en los parámetros del eje HPA están relacionadas exclusivamente con la actividad inicial. Es posible que las conductas desplegadas por los animales en los primeros momentos de exposición al ambiente nuevo y la perseverancia en la exploración serían reflejo de procesos psicobiológicos diferentes. De hecho, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la actividad en la segunda mitad del período de exposición al corredor circular está relacionada con el poder reforzante de la morfina, valorado en la prueba del condicionamiento de la preferencia por un lugar (Nadal et al., 2005).

Sin embargo, en un estudio reciente en el que se compara dos cepas de ratones que difieren en el rasgo de búsqueda de novedad no se han encontrado diferencias en los niveles de

corticosterona tras una exposición de 15 minutos a la tabla de agujeros (Kliethermes y Crabbe, 2006). Tal y como se ha comentado en la Introducción, otro punto de controversia son las inconsistencias encontradas en función del tipo de estrés y entre laboratorios (Dellu et al., 1996a, Bouyer et al., 1998, Kabbaj et al., 2000)

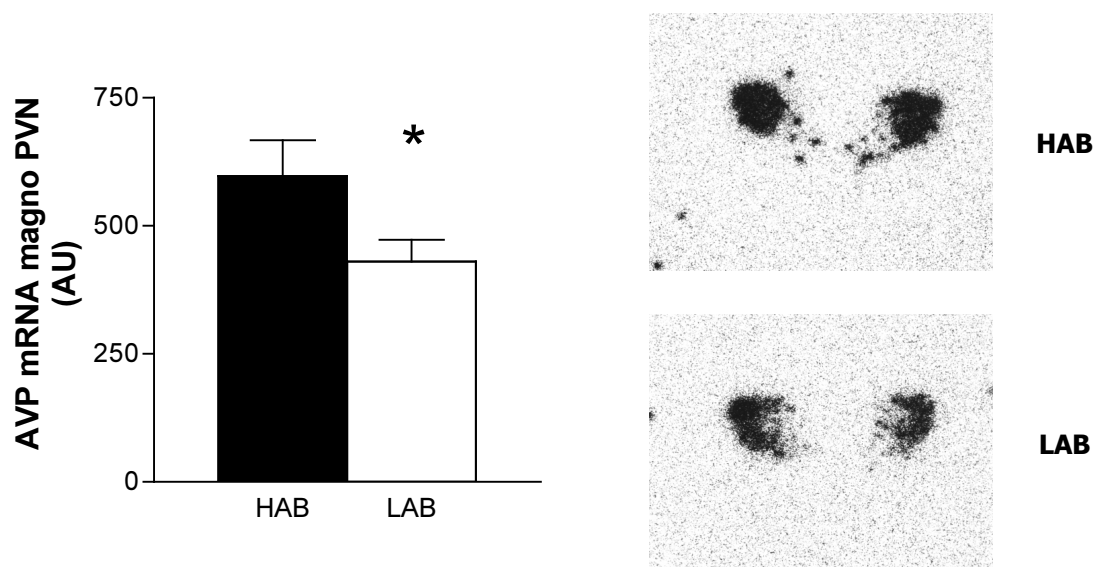
Respecto al rasgo de ansiedad, la idea clásica de que aquellos animales más ansiosos deberían mostrar una mayor reactividad endocrina al estrés ha quedado ampliamente cuestionada. Nuestros datos sugieren que la ansiedad no estaría positivamente relacionada con la reactividad del eje HPA a situaciones estresantes de intensidad moderada (Márquez et al., 2006). De hecho, los datos en humanos parecen apoyar la hipótesis de una escasa relación entre ansiedad y reactividad del eje HPA al estrés (ver Introducción). Es posible que ansiedad y reactividad al estrés vengan reguladas por mecanismos neurobiológicos diferentes y que sólo en determinadas condiciones de diferencias extremas en ansiedad sea posible encontrar la relación esperada. Como éste es el caso de las líneas HAB-LAB o las RHA-RLA, pusimos en marcha estudios de colaboración utilizando estas cepas. En colaboración con el Dr. Alberto Fernández-Teruel de la Unidad de Psicología Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona pudimos confirmar las diferencias esperadas en cuanto a la reactividad periférica del eje HPA en ratas romanas *inbred* de 5 meses de edad (Márquez et al., datos no publicados). Como ya se ha comentado, estos animales han sido seleccionados en función de su comportamiento en una prueba de evitación activa en una caja lanzadera y difieren ampliamente en su nivel de ansiedad. Los animales RLA mostraron mayores niveles de ACTH y corticosterona en respuesta a 20 minutos de exposición a un ambiente nuevo (Figura 9).



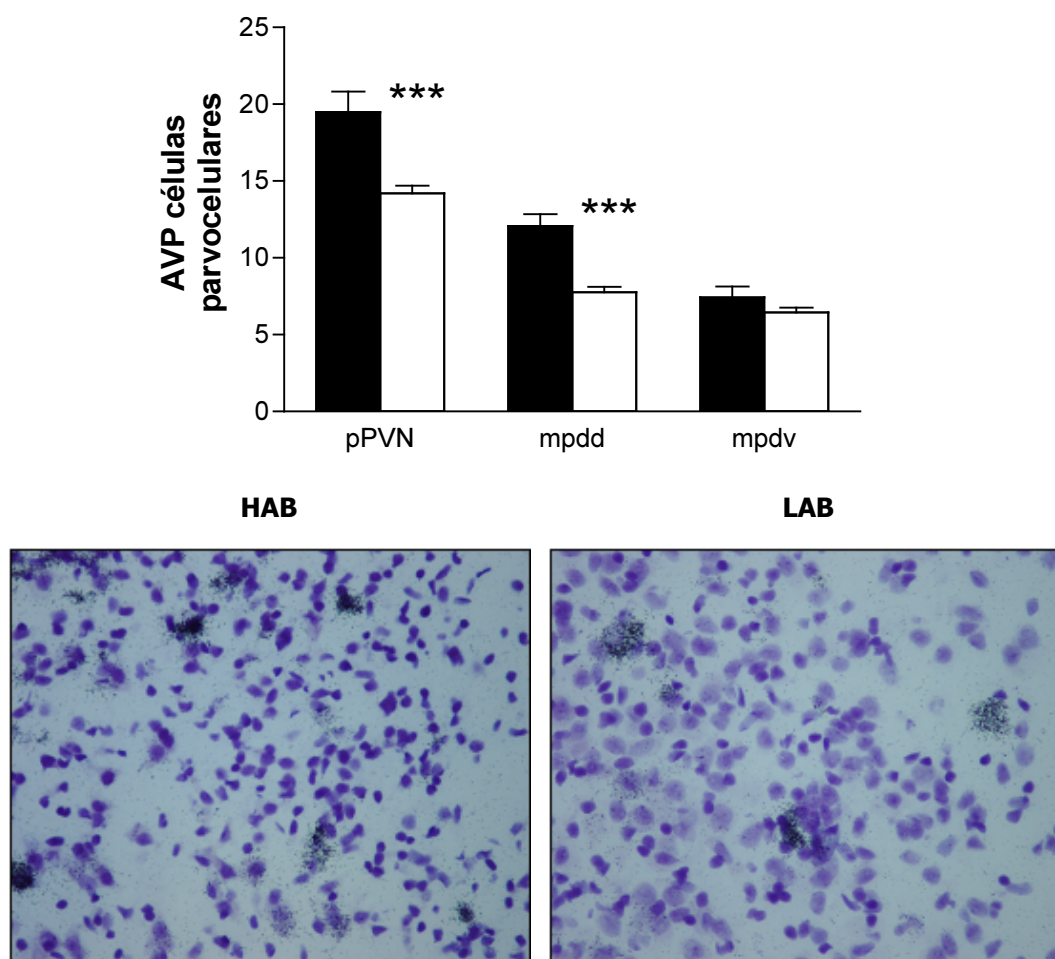
**Figura 9:** Respuesta de ACTH (A) y corticosterona (B) a la exposición de 20 minutos de ambiente nuevo en las ratas *inbred* Romanas de alta evitación (RHA) y Romanas de baja evitación (RLA) (n=10 por cada grupo). \*\*\* p<0.001; \*\*p<0.01, ANOVA de medidas repetidas con la cepa como factor entre-sujetos y tiempo como factor intra-sujetos. No se obtuvieron muestras basales. Fin: respuesta justo después de 20 minutos de exposición a un ambiente nuevo.

Los animales más ansiosos (RLA) muestran además mayores niveles de mRNA de CRF en el pPVN, sin diferencias en la expresión de GR o MR a nivel central (datos no presentados), apoyando la hipótesis de la hiperactividad del eje HPA en los más ansiosos.

En otro estudio (Márquez et al., datos no publicados), caracterizamos la actividad central del eje HPA en las rats HAB-LAB, en colaboración con el Dr. Reiner Landgraf del Max Planck Institut of Psychiatry (Munich, Alemania). Estos animales parecen ser un buen modelo de ansiedad patológica y eran de especial interés para nuestros estudios debido a que el criterio de selección (tiempo en brazos abiertos del laberinto elevado en cruz) era el mismo que el utilizado en nuestros experimentos para caracterizar la ansiedad. Los estudios previos en estos animales habían mostrado una mayor expresión de AVP en el PVN de los animales HAB (para revisión ver Landgraf y Wigger, 2003), pero no se había llevado a cabo una caracterización completa del eje HPA a nivel central. Los animales HAB mostraron no sólo los cambios ya descritos en la AVP (Figura 10 y 11), sino también mayores niveles de expresión del mRNA del CRF en la región parvocelular del PVN (Figura 12) y menores niveles en la amígdala central (Figura 13), sin diferencias significativas en la expresión de GR o MR en ninguna de las áreas analizadas. Por lo tanto, en estos animales la regulación diferencial de la expresión del CRF y la AVP podrían ser factores implicados en las alteraciones conductuales, que no se limitan a la ansiedad.

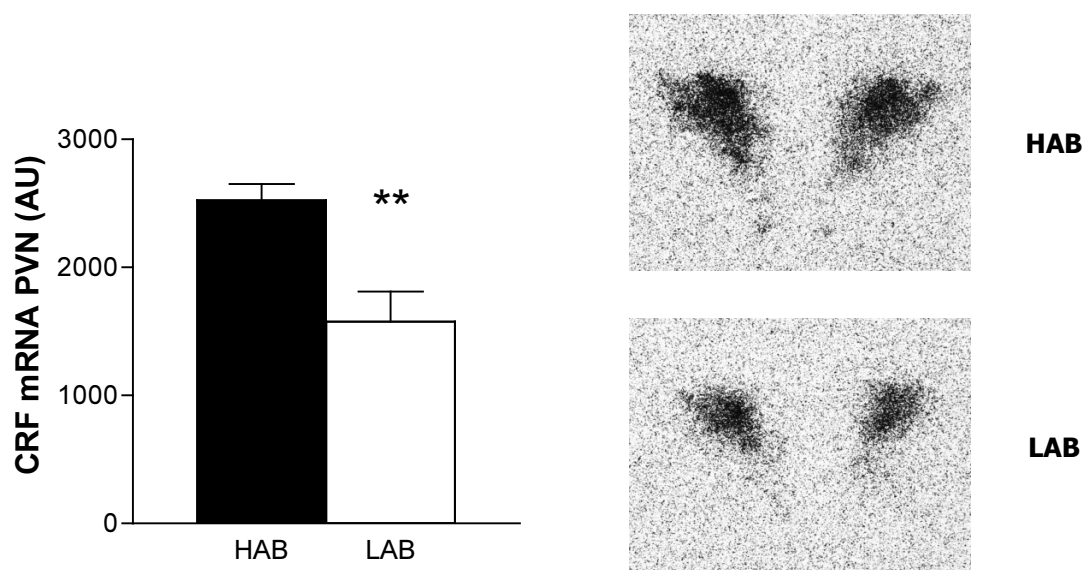


**Figura 10:** Niveles de expresión del mRNA para la AVP en la zona magnocelular del PVN. Se representan los valores correspondientes a la media y SEM (n=18) en unidades arbitrarias (AU). En la parte derecha de la figura se muestran imágenes de autoradiografía de la hibridación *in situ* representativas de la expresión del mRNA de AVP en esta zona para cada grupo. \* p<0.05, t-test.

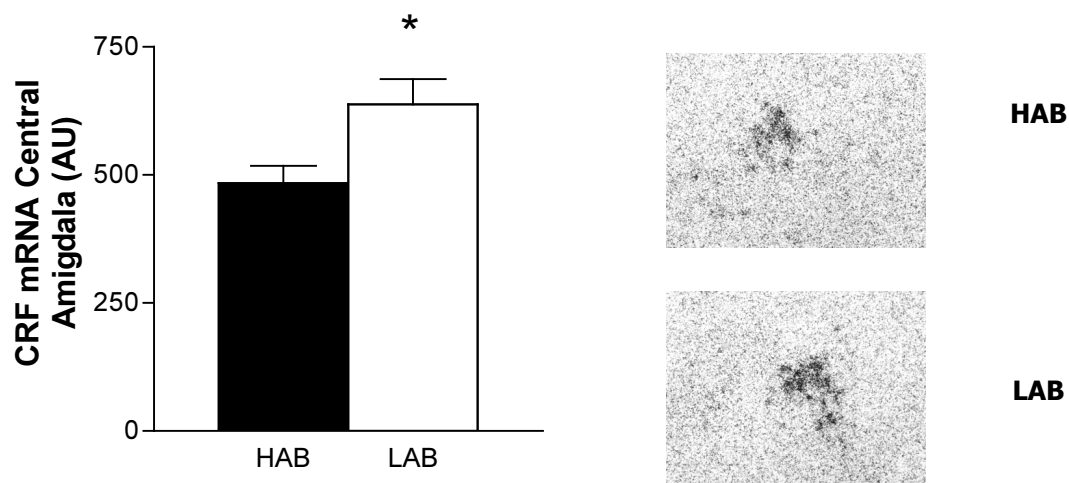


**Figura 11:** Niveles de expresión del mRNA para la AVP en las zonas parvocelular del PVN. Se representan los valores correspondientes a la media y SEM (n=20) en unidades arbitrarias (AU). En la parte inferior de la figura se muestran imágenes representativas de la expresión del mRNA de AVP en la parte dorsal del PVN parvocelular medial para cada grupo. Las imágenes corresponden a la emulsión en los cortes en los que se realizó la hibridación *in situ*. Los núcleos celulares se contratiñieron con azul de toluidina. pPVN: región parvocelular del PVN; mpdd: subdivisión medial parvocelular dorsal; mpdv: subdivisión medial parvocelular ventral. \*\*\*  $p < 0.001$ , t-test

Es importante destacar que las líneas de ratas Romanas han sido seleccionadas por criterios absolutamente diferentes de las HAB-LAB y, a pesar de ello, tienen en común una mayor respuesta HPA a ambientes nuevos y unos mayores niveles de expresión del gen del CRF en el PVN, sugiriendo que en condiciones más extremas de ansiedad, es posible que los animales más ansiosos se caractericen por una mayor reactividad del eje HPA al estrés. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos de poblaciones normales de animales y humanos, con diferencias menos extremas en ansiedad, la relación entre ansiedad y eje HPA sigue siendo un tema conflictivo. Conviene no olvidar que las líneas de ratas mencionadas difieren también en otros aspectos de la conducta, que podría ser los más relevantes para explicar la actividad diferencial del eje HPA.



**Figura 12:** Niveles de expresión del mRNA para el CRF en la zona parvocelular del PVN. Se representan los valores correspondientes a la media y SEM (n=21) en unidades arbitrarias (AU). En la parte derecha de la figura se muestran imágenes de autoradiografía de la hibridación *in situ*, representativas de la expresión del mRNA de CRF en esta zona para cada grupo. \*\* p<0.01, t-test.



**Figura 13:** Niveles de expresión del mRNA para el CRF en la amígdala central. Se representan los valores correspondientes a la media y SEM (n=15) en unidades arbitrarias (AU). En la parte derecha de la figura se muestran imágenes de autoradiografía de la hibridación *in situ*, representativas de la expresión del mRNA de CRF en esta zona para cada grupo. \* p<0.05, t-test.

En resumen, nuestros datos indican que el eje HPA es capaz de discriminar entre situaciones estresantes de distinta intensidad y parece existir una gran consistencia en la respuesta de este eje y de la prolactina al estrés dentro de cada individuo, siempre y cuando las características de las situaciones estresantes sean similares. Cuando las situaciones difieren notablemente en cualidad e intensidad, la consistencia se pierde, lo que sugiere que las variables individuales que están determinando la respuesta al estrés son dependientes del tipo de estímulo estresante. Por lo tanto, es teóricamente difícil definir un fenotipo de hipo o hiper-reactividad al estrés sin considerar el tipo de estrés o la variable fisiológica de referencia. De los rasgos conductuales estrechamente relacionados con la reactividad del eje HPA al estrés, el de búsqueda de sensaciones parece el más consistente, en tanto que la relación con la ansiedad es mucho más discutible.

## **CONCLUSIONES**





1. Aunque la respuesta inicial de la ACTH y de la corticosterona no puede discriminar la intensidad de dos estímulos estresantes intensos (choque eléctrico e inmovilización), estas diferencias emergen claramente en el análisis de los niveles de estas hormonas en los tiempos posteriores a la finalización de la exposición al estrés.
2. Las diferencias entre dos estímulos estresantes de intensidad elevada (choque eléctrico e inmovilización) observadas mediante la valoración de los niveles de las hormonas del eje HPA en los tiempos post-estrés también se ponen de manifiesto con otros marcadores de estrés: hiperglicemia, aumento de los niveles de prolactina y reducción de la ingesta de comida.
3. La valoración de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona tras la exposición a diferentes pruebas conductuales indica que los ambientes más desprotegidos (tabla de agujeros) son más estresantes que aquellos más protegidos (corredor circular) o aquellos en los que la exploración es voluntaria (prueba de luz-oscuridad), aunque estas claras diferencias cualitativas entre las pruebas conductuales se reflejan tan sólo en pequeños cambios hormonales.
4. Los niveles basales de ACTH y corticosterona medidos en la fase diurna o en la fase nocturna del ritmo circadiano no parecen estar relacionados con la reactividad del eje HPA al estrés. El peso relativo de la adrenal está relacionado tanto con la sensibilidad de la adrenal a estimulaciones suaves y breves de ACTH, como con la capacidad máxima de liberación de corticosterona.
5. Las diferencias en la respuesta de la ACTH a una primera inmovilización no están relacionadas con los niveles alcanzados tras la exposición repetida. Más bien al contrario, los que muestran una mayor respuesta inicial se adaptan más rápidamente con la consiguiente reducción de las diferencias individuales.
6. La exposición crónica a un estímulo estresante severo (inmovilización) causa adaptación de la respuesta de la ACTH, la corticosterona y la glucosa a lo largo de los días, que se muestra de manera más evidente en el periodo post-estrés. Por lo tanto, estos parámetros muestran una gran sensibilidad a la experiencia previa con el estrés.
7. La adaptación de la ACTH y la corticosterona a la inmovilización repetida no es lineal, observándose dos fases: una inicial y rápida, en la que se reduce substancialmente la reactividad del eje HPA, y otra posterior, en la que sólo se observan reducciones más modestas a lo largo de los días.

8. La exposición crónica a la inmovilización da lugar a cambios fisiológicos prototípicos como reducción de la ingesta de comida y del aumento normal de peso corporal, reducción del tamaño del timo e hipertrofia adrenal.
9. La exposición de manera crónica a la inmovilización causa también cambios tónicos en la actividad del eje HPA: aumento de los niveles de mRNA para el CRF en el PVN y disminución del mRNA de GR en la formación hipocampal. La respuesta de la ACTH ante la primera exposición a la inmovilización predice en parte el impacto final del estrés crónico sobre la actividad tónica central del eje HPA.
10. La consistencia de las diferencias individuales en la reactividad de la ACTH, de la corticosterona y de la prolactina a la exposición aguda al estrés son muy dependientes de la situación estresante. Observamos una alta consistencia cuando comparamos la respuesta a diferentes situaciones de intensidad moderada, pero no cuando se compara la respuesta a estímulos estresantes que difieren ampliamente tanto cualitativa como cuantitativamente (ambiente nuevo *versus* inmovilización).
11. La actividad exploratoria inicial en un corredor circular está relacionada con una mayor reactividad periférica del eje HPA tras la exposición a ambientes nuevos. En cambio, la persistencia en la actividad exploratoria del corredor circular no predice diferencias en los niveles de ACTH y corticosterona tras el estrés. Este efecto se observa tanto cuando la exploración es voluntaria (prueba de luz-oscuridad) como cuando se trata de un ambiente inescapable (tabla de agujeros).
12. El rasgo de ansiedad no parece estar relacionado con una reactividad diferencial de la ACTH y la corticosterona tras la exposición a ambientes nuevos. Sin embargo, datos de la literatura y datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que en condiciones de ansiedad patológica puede aparecer una alteración en la reactividad del eje HPA, aunque el substrato neurobiológico subyacente no está aún bien definido.

## **REFERENCIAS**



## Referencias:

- Abel, E. L., 1991. Behavior and corticosteroid response of Maudsley reactive and nonreactive rats in the open field and forced swimming test. *Physiol Behav* 50, 151-153.
- Adan, R. A. and Gispen, W. H., 2000. Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol* 405, 13-24.
- Aguilera, G., Pham, Q. and Rabadan-Diehl, C., 1994. Regulation of pituitary vasopressin receptors during chronic stress: relationship to corticotroph responsiveness. *J Neuroendocrinol* 6, 299-304.
- Allport, G. W. and Odbert, H. S., 1936. Trait names: a psycho-lexical study. *Psychological Monograph* 47.
- Armstrong, W., 1995. Hypothalamic suproptic and paraventricular nuclei. In: Paxinos, G. (Ed.), *The rat nervous system*. (2nd edition). Academic Press, Sydney, pp. 377-387.
- Andreis, P. G., Neri, G., Belloni, A. S., Mazzocchi, G., Kasprzak, A. and Nussdorfer, G. G., 1991a. Interleukin-1 beta enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology* 129, 53-57.
- Andreis, P. G., Neri, G., Mazzocchi, G., Musajo, F. and Nussdorfer, G. G., 1992. Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex: the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* 131, 69-72.
- Andreis, P. G., Neri, G. and Nussdorfer, G. G., 1991b. Corticotropin-releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the rat adrenal gland. *Endocrinology* 128, 1198-1200.
- Andres, R., Martí, O. and Armario, A., 1999. Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. *Am J Physiol* 277, R863-868.
- Angelucci, L., 2000. The glucocorticoid hormone: from pedestal to dust and back. *Eur J Pharmacol* 405, 139-147.
- Antoni, F. A., 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 7, 351-378.
- Antoni, F. A., Fink, G. and Sheward, W. J., 1990. Corticotrophin-releasing peptides in rat hypophysial portal blood after paraventricular lesions: a marked reduction in the concentration of corticotrophin-releasing factor-41, but no change in vasopressin. *J Endocrinol* 125, 175-183.
- Armario, A., 1998. Estrés: concepto y respuesta fisiológica. In: Tresguerres, J. et al. (Eds.), *Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. Síntesis, Madrid, pp. 2176-2205.
- Armario, A., Campmany, L., Borrás, M. and Hidalgo, J., 1990a. Vitamin E-supplemented diets reduce lipid peroxidation but do not alter either pituitary-adrenal, glucose, and lactate responses to immobilization stress or gastric ulceration. *Free Radic Res Commun* 9, 113-118.
- Armario, A., Gavalda, A. and Martí, J., 1995. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20, 879-890.
- Armario, A., Hidalgo, J. and Giralt, M., 1988. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47, 263-267.
- Armario, A., Lopez-Calderon, A., Jolin, T. and Castellanos, J. M., 1986a. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 39, 471-475.
- Armario, A., Martí, J. and Gil, M., 1990b. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15, 341-347.

## REFERENCIAS

- Armario, A., Martí, O., Molina, T., de Pablo, J. and Valdes, M., 1996. Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinology* 21, 17-24.
- Armario, A., Montero, J. L. and Balasch, J., 1986b. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav* 37, 559-561.
- Aubry, J. M., Bartanusz, V., Driscoll, P., Schulz, P., Steimer, T. and Kiss, J. Z., 1995. Corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA levels in roman high- and low-avoidance rats: response to open-field exposure. *Neuroendocrinology* 61, 89-97.
- Bakshi, V. P. and Kalin, N. H., 2002. Animal models and endophenotypes of anxiety and stress disorders. In: Davis, K. L. et al. (Eds.), *Neuropsychopharmacology: The 5th Generation in Progress*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 883-900.
- Bakshi, V. P., Smith-Roe, S., Newman, S. M., Grigoriadis, D. E. and Kalin, N. H., 2002. Reduction of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing hormone 2 (CRH2) receptors in lateral septum or CRH1 receptors in amygdala. *J Neurosci* 22, 2926-2935.
- Bardo, M. T., Donohew, R. L. and Harrington, N. G., 1996. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res* 77, 23-43.
- Beardslee, S. L., Papadakis, E., Altman, H. J., Harrington, G. M. and Commissaris, R. L., 1989. Defensive burying behavior in maudsley reactive (MR/Har) and nonreactive (MNRA/Har) rats. *Physiol Behav* 45, 449-451.
- Bereiter, D. A., Zaid, A. M. and Gann, D. S., 1984. Adrenocorticotropin response to graded blood loss in the cat. *Am J Physiol* 247, E398-404.
- Bergland, R. M. and Page, R. B., 1978. Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102, 1325-1338.
- Bergland, R. M. and Page, R. B., 1979. Pituitary-brain vascular relations: a new paradigm. *Science* 204, 18-24.
- Berkowitz, G. S., Lapinski, R. H., Lockwood, C. J., Florio, P., Blackmore-Prince, C. and Petraglia, F., 1996. Corticotropin-releasing factor and its binding protein: maternal serum levels in term and preterm deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 174, 1477-1483.
- Birnbaumer, M., 2000. Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11, 406-410.
- Bohus, B. and Koolhaas, J. M., 1993. Stress and the cardiovascular system: central and peripheral physiological mechanisms. In: Stanford, S. C. and Salmon, P. (Eds.), *Stress: from synapse to syndrome*. Academic Press, San Diego, pp. 75-117.
- Bonaz, B. and 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, R1438-1449.
- Bouyer, J. J., Vallee, M., Deminière, J. M., Le Moal, M. and Mayo, W., 1998. Reaction of sleep-wakefulness cycle to stress is related to differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis reactivity in rat. *Brain Res* 804, 114-124.
- Bradberry, C. W., Gruen, R. J., Berridge, C. W. and Roth, R. H., 1991. Individual differences in behavioral measures: correlations with nucleus accumbens dopamine measured by microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 39, 877-882.
- Brambilla, F., 2001. Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships. *Physiol Behav* 73, 365-369.
- Broadhurst, P. L., 1975. The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet* 5, 299-319.
- Brush, F. R., 1991. Genetic determinants of individual differences in avoidance learning: behavioral and endocrine characteristics. *Experientia* 47, 1039-1050.
- Brush, F. R., Isaacson, M. D., Pellegrino, L. J., Rykaszewski, I. M. and Shain, C. N., 1991. Characteristics of the pituitary-adrenal system in the Syracuse high- and low-avoidance strains of rats (*Rattus norvegicus*). *Behav Genet* 21, 35-48.
- Carrasco, G. A. and Van de Kar, L. D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272.
- Castanon, N., Dulluc, J., le Moal, M. and Mormède, P., 1992. Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the Roman rat lines. *Physiol Behav* 51, 1235-1241.
- Castanon, N., Dulluc, J., Le Moal, M. and Mormède, P., 1994. Maturation of the behavioral and neuroendocrine differences between the Roman rat lines. *Physiol Behav* 55, 775-782.

- Castanon, N. and Mormède, P., 1994. Psychobiogenetics: adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 19, 257-282.
- Castanon, N., Perez-Diaz, F. and Mormède, P., 1995. Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman High and Low Avoidance rat lines. *Behav Genet* 25, 371-384.
- Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W. and De Souza, E. B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15, 6340-6350.
- Champagne, D., Beaulieu, J. and Drolet, G., 1998. CRFergic innervation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus: a tract-tracing study. *J Neuroendocrinol* 10, 119-131.
- Chaouloff, F., Castanon, N. and Mormède, P., 1994. Paradoxical differences in animal models of anxiety among the Roman rat lines. *Neurosci Lett* 182, 217-221.
- Charlton, B. G., 1990. Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J Endocrinol* 126, 5-8.
- Chautard, T., Spinedi, E., Voirol, M., Pralong, F. P. and Gaillard, R. C., 1999. Role of glucocorticoids in the response of the hypothalamo-corticotrope, immune and adipose systems to repeated endotoxin administration. *Neuroendocrinology* 69, 360-369.
- Chrousos, G. P. and Gold, P. W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* 267, 1244-1252.
- Cloninger, C. R., 1986. A unified biosocial theory of personality and its role in the development of anxiety states. *Psychiatr Dev* 4, 167-226.
- Cloninger, C. R., 1987. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psychiatry* 44, 573-588.
- Cloninger, C. R., 1994. Temperament and personality. *Curr Opin Neurobiol* 4, 266-273.
- Cloninger, C. R., Svrakic, D. M. and Przybeck, T. R., 1993. A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50, 975-990.
- Commissaris, R. L., Harrington, G. M., Ortiz, A. M. and Altman, H. J., 1986. Maudsley reactive and non-reactive rat strains: differential performance in a conflict task. *Physiol Behav* 38, 291-294.
- Copland, A. M. and Balfour, D. J., 1987. Spontaneous activity and brain 5-hydroxyindole levels measured in rats tested in two designs of elevated X-maze. *Life Sci* 41, 57-64.
- Costa, P. T., Jr. and McCrae, R. R., 1997. Stability and change in personality assessment: the revised NEO Personality Inventory in the year 2000. *J Pers Assess* 68, 86-94.
- Courvoisier, H., Moisan, M. P., Sarrieau, A., Hendley, E. D. and Mormède, P., 1996. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res* 743, 77-85.
- Croiset, G., Nijssen, M. J. and Kamphuis, P. J., 2000. Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *Eur J Pharmacol* 405, 225-234.
- Cullinan, W. E., Herman, J. P. and Watson, S. J., 1995. A neuroanatomy of stress. In: Friedman, M. J. et al. (Eds.), *Neurobiological and clinical consequences of stress. From normal adaptation to post-traumatic stress disorder*. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 3-26.
- Dallman, M. F., Akana, S., Schribner, K., Bradbury, M., Walker, C., Strack, A. and Cascio, C., 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology* 4, 517-526.
- Dallman, M. F. and Jones, M. T., 1973. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92, 1367-1375.
- Dal-Zotto, S., Martí, O. and 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, 175-181.
- Dal-Zotto, S., Martí, O., Delgado, R. and Armario, A., 2004. Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress. *Psychopharmacology (Berl)* 177, 230-237.



## REFERENCIAS

- Darlington, D. N., Barraclough, C. A. and Gann, D. S., 1992. Hypotensive hemorrhage elevates corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) but not vasopressin mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 130, 1281-1288.
- Dautzenberg, F. M. and Hauger, R. L., 2002. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci* 23, 71-77.
- Dautzenberg, F. M., Kilpatrick, G. J., Hauger, R. L. and Moreau, J., 2001. Molecular biology of the CRH receptors-- in the mood. *Peptides* 22, 753-760.
- Davidson, R. J., 1999. The neurobiology of personality and personality disorders. In: Charney, D. S. et al. (Eds.), *Neurobiology of mental illness*. Oxford University Press, New York, pp. 841-854.
- De Boer, S. F., Koopmans, S. J., Slangen, J. L. and Van der Gugten, J., 1990. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 47, 1117-1124.
- de Goeij, D. C., Jezova, D. and Tilders, F. J., 1992. Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 577, 165-168.
- de Goeij, D. C., Kvetnansky, R., Whitnall, M. H., Jezova, D., Berkenbosch, F. and Tilders, F. J., 1991. Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 53, 150-159.
- De Kloet, E., 1991. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol* 12, 95-164.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S. and Joels, M., 1993. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol* 13, 433-455.
- Dellu, F., Mayo, W., Piazza, P. V., Le Moal, M. and Simon, H., 1993. Individual differences in behavioural response to novelty in rats. Possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Pers Individual Diff* 15, 411-418.
- Dellu, F., Mayo, W., Vallee, M., Maccari, S., Piazza, P. V., Le Moal, M. and Simon, H., 1996a. Behavioral reactivity to novelty during youth as a predictive factor of stress-induced corticosterone secretion in the elderly--a life-span study in rats. *Psychoneuroendocrinology* 21, 441-453.
- Dellu, F., Piazza, P. V., Mayo, W., Le Moal, M. and Simon, H., 1996b. Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* 34, 136-145.
- Depue, R. A. and Collins, P. F., 1999. Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. *Behav Brain Sci* 22, 491-517; discussion 518-469.
- Derijk, R., Van Rooijen, N., Tilders, F. J., Besedovsky, H. O., Del Rey, A. and Berkenbosch, F., 1991. Selective depletion of macrophages prevents pituitary-adrenal activation in response to subpyrogenic, but not to pyrogenic, doses of bacterial endotoxin in rats. *Endocrinology* 129, 330-338.
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S. and Spencer, R. L., 1993. Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res* 616, 89-98.
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S. and Spencer, R. L., 1997. Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65, 360-368.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C. and Tasker, J. G., 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23, 4850-4857.
- Dimsdale, J. E. and Moss, J., 1980. Short-term catecholamine response to psychological stress. *Psychosom Med* 42, 493-497.
- Dobráková, M., Kvetnansky, R., Oprsalová, Z. and Jezova, D., 1993. Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18, 163-174.
- Domjan, M. and Burkhardt, B., 1993. *Principios de aprendizaje y de conducta*. Debate, Madrid.
- Donohoe, T. P., 1984. Stress-induced anorexia: implications for anorexia nervosa. *Life Sci* 34, 203-218.

- Drolet, G. and Rivest, S., 2001. Corticotropin-releasing hormone and its receptors; an evaluation at the transcription level in vivo. *Peptides* 22, 761-767.
- Dunn, A. J. and Berridge, C. W., 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev* 15, 71-100.
- Ekman, P. and Davidson, R. J., 1994. *The Nature of emotion: Fundamental questions*. Oxford University Press, New York.
- Ellenbroek, B. A. and Cools, A. R., 2002. Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav Genet* 32, 349-361.
- Engler, D., Redei, E. and Kola, I., 1999. The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis. *Endocr Rev* 20, 460-500.
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A. and Driscoll, P., 1999. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 67, 19-26.
- Eysenck, H. J. and Eysenck, M. W., 1987. *Personalidad y diferencias individuales*. Ediciones Piramide, Madrid.
- Farrell, P. A., Garthwaite, T. L. and Gustafson, A. B., 1983. Plasma adrenocorticotropin and cortisol responses to submaximal and exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 55, 1441-1444.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nunez, J. F., Goma, M., Driscoll, P. and Tobena, A., 1992. Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett* 137, 185-188.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Nunez, J. F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W. and Tobena, A., 1991. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. *Brain Res Bull* 26, 173-176.
- Fernandez-Teruel, A., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T. and Tobena, A., 2002. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav* 73, 233-245.
- Frank, E., Salchner, P., Aldag, J. M., Salome, N., Singewald, N., Landgraf, R. and Wigger, A., 2006. Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav Neurosci* 120, 60-71.
- Frijda, N. H., 1986. *The emotions*. Cambridge University Press, New York.
- Funder, D. C., 1997. *The personality puzzle* (2nd edition). Norton & Company Inc, New York.
- Gallo-Payet, N. and Payet, M. D., 2003. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech* 61, 275-287.
- García, A. and Armario, A., 2001. Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 363-374.
- García, A., Martí, O., Valles, A., Dal-Zotto, S. and Armario, A., 2000. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72, 114-125.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Driscoll, P. and Feer, H., 1982. Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiol Behav* 28, 259-263.
- Gerra, G., Avanzini, P., Zaimovic, A., Sartori, R., Bocchi, C., Timpano, M., Zambelli, U., Delsignore, R., Gardini, F., Talarico, E. and Brambilla, F., 1999. Neurotransmitters, neuroendocrine correlates of sensation-seeking temperament in normal humans. *Neuropsychobiology* 39, 207-213.
- Ginsberg, A. B., Frank, M. G., Francis, A. B., Rubin, B. A., O'Connor, K. A. and Spencer, R. L., 2006. Specific and time-dependent effects of glucocorticoid receptor agonist RU28362 on stress-induced pro-opiomelanocortin hnRNA, c-fos mRNA and zif268 mRNA in the pituitary. *J Neuroendocrinol* 18, 129-138.

## REFERENCIAS

- Gray, J. A. and McNaughton, N., 2000. *The neuropsychology of anxiety* (2nd edition). Oxford University Press, New York.
- Grota, L. J., Bienen, T. and Felten, D. L., 1997. Corticosterone responses of adult Lewis and Fischer rats. *J Neuroimmunol* 74, 95-101.
- Groves, P. M. and Thompson, R. F., 1970. Habituation: a dual-process theory. *Psychol Rev* 77, 419-450.
- Halbreich, U., 1987. *Hormones and depression*. Raven Press, New York.
- Harbuz, M. S. and Lightman, S. L., 1989. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol* 122, 705-711.
- Hauger, R. L., Millan, M. A., Lorang, M., Harwood, J. P. and Aguilera, G., 1988. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 123, 396-405.
- Hennessy, M. B. and Levine, S., 1978. Sensitive pituitary-adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol Behav* 21, 295-297.
- Henniger, M. S., Ohl, F., Holter, S. M., Weissenbacher, P., Toschi, N., Lorsch, P., Wigger, A., Spanagel, R. and Landgraf, R., 2000. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111, 153-163.
- Herman, J. P., 1995. In situ hybridization analysis of vasopressin gene transcription in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat: regulation by stress and glucocorticoids. *J Comp Neurol* 363, 15-27.
- Herman, J. P. and Cullinan, W. E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20, 78-84.
- Herman, J. P., Cullinan, W. E., Ziegler, D. R. and Tasker, J. G., 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16, 381-385.
- Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C. and Cullinan, W. E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24, 151-180.
- Honkaniemi, J., Kainu, T., Ceccatelli, S., Rechardt, L., Hokfelt, T. and Pelto-Huikko, M., 1992. Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Neuroreport* 3, 849-852.
- Hooks, M. S., Colvin, A. C., Juncos, J. L. and Justice, J. B., Jr., 1992. Individual differences in basal and cocaine-stimulated extracellular dopamine in the nucleus accumbens using quantitative microdialysis. *Brain Res* 587, 306-312.
- Hooks, M. S., Jones, G. H., Smith, A. D., Neill, D. B. and Justice, J. B., Jr., 1991. Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse* 9, 121-128.
- Hooks, M. S., Juncos, J. L., Justice, J. B., Jr., Meiergerd, S. M., Povlock, S. L., Schenk, J. O. and Kalivas, P. W., 1994a. Individual locomotor response to novelty predicts selective alterations in D1 and D2 receptors and mRNAs. *J Neurosci* 14, 6144-6152.
- Hooks, M. S., Sorg, B. A. and Kalivas, P. W., 1994b. The relationship between mRNA levels and the locomotor response to novelty. *Brain Res* 663, 312-316.
- Hubert, W. and de Jong-Meyer, R., 1992. Saliva cortisol responses to unpleasant film stimuli differ between high and low trait anxious subjects. *Neuropsychobiology* 25, 115-120.
- Imaki, T., Naruse, M., Harada, S., Chikada, N., Imaki, J., Onodera, H., Demura, H. and Vale, W., 1996. Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 38, 166-170.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M. and 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, 240-246.
- Itoi, K., Jiang, Y. Q., Iwasaki, Y. and Watson, S. J., 2004. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16, 348-355.
- Jezova, D., Makatsori, A., Duncko, R., Moncek, F. and Jakubek, M., 2004. High trait anxiety in healthy subjects is associated with low neuroendocrine activity during psychosocial stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 1331-1336.

- Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P. and Gold, P. W., 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 16, 115-130.
- Jongen-Relo, A. L., Pothuizen, H. H., Feldon, J. and Pryce, C. R., 2002. Comparison of central corticosteroid receptor expression in male Lewis and Fischer rats. *Brain Res* 953, 223-231.
- Kabbaj, M., Devine, D. P., Savage, V. R. and Akil, H., 2000. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *J Neurosci* 20, 6983-6988.
- Kant, G. J., Leu, J. R., Anderson, S. M. and Mougey, E. H., 1987. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 40, 775-779.
- Kant, G. J., Mougey, E. H., Pennington, L. L. and Meyerhoff, J. L., 1983. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma beta-endorphin, beta-LPH corticosterone and prolactin. *Life Sci* 33, 2657-2663.
- Kant, G. J., Pastel, R. H., Bauman, R. A., Meininger, G. R., Maughan, K. R., Robinson, T. N., 3rd, Wright, W. L. and Covington, P. S., 1995. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 57, 359-365.
- Keller-Wood, M., Kimura, B., Shinsako, J. and Phillips, M. I., 1986. Interaction between CRF and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids. *Am J Physiol* 250, R396-402.
- Keller-Wood, M. E. and Dallman, M. F., 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.
- Keller-Wood, M. E., Shinsako, J. and Dallman, M. F., 1983. Integral as well as proportional adrenal responses to ACTH. *Am J Physiol* 245, R53-59.
- Keller-Wood, M. E., Shinsako, J., Keil, L. C. and Dallman, M. F., 1981. Insulin-induced hypoglycemia in conscious dogs. I. Dose-related pituitary and adrenal responses. *Endocrinology* 109, 818-824.
- Kitraki, E., Karandrea, D. and Kittas, C., 1999. Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology* 69, 331-338.
- Klebaur, J. E. and Bardo, M. T., 1999. Individual differences in novelty seeking on the playground maze predict amphetamine conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 63, 131-136.
- Kliethermes, C. L. and Crabbe, J. C., 2006. Genetic independence of mouse measures of some aspects of novelty seeking. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. and Blokhuis, H. J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 925-935.
- Kopin, I. J., 1995. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann N Y Acad Sci* 771, 19-30.
- Kosslyn, S. M., Cacioppo, J. T., Davidson, R. J., Hugdahl, K., Lovallo, W. R., Spiegel, D. and Rose, R., 2002. Bridging psychology and biology. The analysis of individuals in groups. *Am Psychol* 57, 341-351.
- Kovacs, K. J. and Sawchenko, P. E., 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16, 262-273.
- Lamiell, J., 1981. Towards an idiographic psychology of personality. *American Psychologist* 36, 276-289.
- Landgraf, R. and Wigger, A., 2003. Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress* 6, 111-119.
- Landgraf, R., Wigger, A., Holsboer, F. and Neumann, I. D., 1999. Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol* 11, 405-407.
- Lazarus, R. S., 1993. From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol* 44, 1-21.
- Lemaire, V., Aourousseau, C., Le Moal, M. and Abrous, D. N., 1999. Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 11, 4006-4014.
- Lesch, K. P., 2001. Molecular foundation of anxiety disorders. *J Neural Transm* 108, 717-746.

## REFERENCIAS

- Levin, N., Blum, M. and Roberts, J. L., 1989. Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 125, 2957-2966.
- Levine, S., 1985. A definition of stress? In: Moberg, G. P. (Ed.), *Animal stress*. American Physiological Society, Baltimore, pp. 51-69.
- Liebsch, G., Linthorst, A. C., Neumann, I. D., Reul, J. M., Holsboer, F. and Landgraf, R., 1998a. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 19, 381-396.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F. and Landgraf, R., 1998b. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94, 301-310.
- Lilly, M. P., 1994. Effect of surgery on the pituitary-adrenal response to repeated hemorrhage. *Am J Physiol* 266, R1976-1984.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. and Meaney, M. J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.
- Lovenberg, T. W., Chalmers, D. T., Liu, C. and De Souza, E. B., 1995. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136, 4139-4142.
- Luo, X., Kiss, A., Makara, G., Lolait, S. J. and Aguilera, G., 1994. Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 6, 689-696.
- Ma, X. M. and Aguilera, G., 1999. Transcriptional responses of the vasopressin and corticotropin-releasing hormone genes to acute and repeated intraperitoneal hypertonic saline injection in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 68, 129-140.
- Ma, X. M. and Lightman, S. L., 1998. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol* 510 ( Pt 2), 605-614.
- Maier, S. F., Ryan, S. M., Barksdale, C. M. and Kalin, N. H., 1986. Stressor controllability and the pituitary-adrenal system. *Behav Neurosci* 100, 669-674.
- Makara, G. B. and Haller, J., 2001. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 65, 367-390.
- Makara, G. B., Mergl, Z. and 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.
- Makino, S., Schulkin, J., Smith, M. A., Pacak, K., Palkovits, M. and Gold, P. W., 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136, 4517-4525.
- Makino, S., Takemura, T., Asaba, K., Nishiyama, M., Takao, T. and Hashimoto, K., 1997. Differential regulation of type-1 and type-2alpha corticotropin-releasing hormone receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 47, 170-176.
- Mansi, J. A., Rivest, S. and Drolet, G., 1996. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology* 137, 4619-4629.
- Márquez, C., Belda, X. and 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* 926, 181-185.
- Márquez, C., Nadal, R. and Armario, A., 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 601-612.
- Márquez, C., Nadal, R. and Armario, A., 2005. Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30, 179-187.

- Márquez, C., Nadal, R. and Armario, A., 2006. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 168, 13-22.
- Marti, J. and Armario, A., 1996. Forced swimming behavior is not related to the corticosterone levels achieved in the test: a study with four inbred rat strains. *Physiol Behav* 59, 369-373.
- Martí, J. and Armario, A., 1996. Forced swimming behavior is not related to the corticosterone levels achieved in the test: a study with four inbred rat strains. *Physiol Behav* 59, 369-373.
- Martí, O., Andres, R. and Armario, A., 1999. Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *Am J Physiol* 277, R869-877.
- Martí, O. and Armario, A., 1997. Influence of Regularity of Exposure to Chronic Stress on the Pattern of Habituation of Pituitary-Adrenal Hormones, Prolactin and Glucose. *Stress* 1, 179-189.
- Martí, O. and Armario, A., 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16, 241-260.
- Martí, O., Gavalda, A., Gómez, F. and Armario, A., 1994a. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology* 60, 1-7.
- Martí, O., Gavalda, A., Jolin, T. and Armario, A., 1993. Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* 18, 67-77.
- Martí, O., Marti, J. and Armario, A., 1994b. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55, 747-753.
- Mason, J. W., 1968. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom Med* 30, Suppl:631-653.
- McCann, B. S., Carter, J., Vaughan, M., Raskind, M., Wilkinson, C. W. and Veith, R. C., 1993. Cardiovascular and neuroendocrine responses to extended laboratory challenge. *Psychosom Med* 55, 497-504.
- McCleery, J. M. and Goodwin, G. M., 2001. High and low neuroticism predict different cortisol responses to the combined dexamethasone--CRH test. *Biol Psychiatry* 49, 410-415.
- McCrae, R. R. and Costa, P. T., Jr., 1997. Personality trait structure as a human universal. *Am Psychol* 52, 509-516.
- McEwen, B. S., 1995. Stressful experience, brain and emotions: Developmental, genetic and hormonal influences. In: Gazzaniga, M. S. (Ed.), *The cognitive neurosciences*. Bradford Books, New York, pp. 1117-1135.
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J. R. and Plotsky, P. M., 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18, 49-72.
- Meyerhoff, J. L., Oleshansky, M. A. and Mougey, E. H., 1988. Psychologic stress increases plasma levels of prolactin, cortisol, and POMC-derived peptides in man. *Psychosom Med* 50, 295-303.
- Michelson, D., Licinio, J. and Gold, P. W., 1995. Mediation of the stress response by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In: Friedman, M. J. et al. (Eds.), *Neurobiological and clinical consequences of stress. From normal adaptation to post-traumatic stress disorder*. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 225-238.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M. and Tabira, T., 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887-897.
- Moberg, G. P., 1985. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: Moberg, G. P. (Ed.), *Animal stress*. American Physiological Society, Baltimore, pp. 245-267.
- Munck, A., Guyre, P. M. and Holbrook, N. J., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5, 25-44.

## REFERENCIAS

- Nadal, R., Armario, A. and Janak, P. H., 2002. Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 162, 333-338.
- Nadal, R., Rotllant, D., Marquez, C. and Armario, A., 2005. Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. *Behav Brain Res* 165, 72-79.
- Natelson, B. H., Tapp, W. N., Adamus, J. E., Mittler, J. C. and Levin, B. E., 1981. Humoral indices of stress in rats. *Physiol Behav* 26, 1049-1054.
- Ogilvie, K. M., Lee, S. and Rivier, C., 1998. Divergence in the expression of molecular markers of neuronal activation in the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus evoked by alcohol administration via different routes. *J Neurosci* 18, 4344-4352.
- Ohl, F., Toschi, N., Wigger, A., Henniger, M. S. and Landgraf, R., 2001. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci* 115, 429-436.
- Ons, S., 2005. Expresión de genes de activación temprana en el sistema nervioso central de rata en respuesta al estrés: un estudio comparativo entre Arc y c-fos. In: *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia*, pp. 173. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Ons, S., Martí, O. and 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, 1111-1118.
- Ortiz, J., DeCaprio, J. L., Kosten, T. A. and Nestler, E. J., 1995. Strain-selective effects of corticosterone on locomotor sensitization to cocaine and on levels of tyrosine hydroxylase and glucocorticoid receptor in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 67, 383-397.
- Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., Choi, D. C., Richtand, N. M. and Herman, J. P., 2006. Hypoactivity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis during Recovery from Chronic Variable Stress. *Endocrinology* 147, 2008-2017.
- Ottenweller, J. E., Servatius, R. J. and Natelson, B. H., 1994. Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. *Physiol Behav* 55, 337-340.
- Ottenweller, J. E., Servatius, R. J., Tapp, W. N., Drastal, S. D., Bergen, M. T. and Natelson, B. H., 1992. A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiol Behav* 51, 689-698.
- Owens, M. J. and Nemeroff, C. B., 1991. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev* 43, 425-473.
- Pacak, K. and Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22, 502-548.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S., 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275, R1247-1255.
- Parkes, D., Rivest, S., Lee, S., Rivier, C. and 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, 1357-1367.
- Paterson, A., Whiting, P. J., Gray, J. A., Flint, J. and Dawson, G. R., 2001. Lack of consistent behavioural effects of Maudsley reactive and non-reactive rats in a number of animal tests of anxiety and activity. *Psychopharmacology (Berl)* 154, 336-342.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. and Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
- Pellow, S. and File, S. E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24, 525-529.
- Piazza, P. V., Deminière, J. M., Le Moal, M. and Simon, H., 1989. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245, 1511-1513.
- Piazza, P. V., Deminière, J. M., Maccari, S., Mormède, P., Le Moal, M. and Simon, H., 1990. Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol* 1, 339-345.
- Piazza, P. V. and Le Moal, M., 1997. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 359-372.

- Piazza, P. V., Maccari, S., Deminière, J. M., Le Moal, M., Mormède, P. and Simon, H., 1991. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2088-2092.
- Pinnock, S. B. and Herbert, J., 2001. Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress. *Eur J Neurosci* 13, 576-584.
- Plomin, R. and Kosslyn, S. M., 2001. Genes, brain and cognition. *Nat Neurosci* 4, 1153-1154.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P. E. and Vale, W., 1994. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8777-8781.
- Pratt, W. B., 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268, 21455-21458.
- Radosevich, P. M., Nash, J. A., Lacy, D. B., O'Donovan, C., Williams, P. E. and Abumrad, N. N., 1989. Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of ir-beta-endorphin, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog. *Brain Res* 498, 89-98.
- Ramos, A., Berton, O., Mormède, P. and Chaouloff, F., 1997. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 85, 57-69.
- Ramos, A., Mellerin, Y., Mormède, P. and Chaouloff, F., 1998. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res* 96, 195-205.
- Ramos, A. and Mormède, P., 1998. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 33-57.
- Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M. and de Kloet, E. R., 1989. On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50, 117-123.
- Reul, J. M. and de Kloet, E. R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.
- Reul, J. M. and Holsboer, F., 2002. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2, 23-33.
- Rex, A., Voigt, J. P. and Fink, H., 1999. Behavioral and neurochemical differences between Fischer 344 and Harlan-Wistar rats raised identically. *Behav Genet* 29, 187-192.
- Riccio, D. C., MacArdy, E. A. and Kissinger, S. C., 1991. Associative processes in adaptation to repeated cold exposure in rats. *Behav Neurosci* 105, 599-602.
- Rivest, S., Laflamme, N. and Nappi, R. E., 1995. Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus. *J Neurosci* 15, 2680-2695.
- Rivest, S. and Rivier, C., 1991. Influence of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the alteration of neuroendocrine functions induced by intermittent footshock or interleukin. *Endocrinology* 129, 2049-2057.
- Rivier, C., Rivier, J. and Vale, W., 1982. Inhibition of adrenocorticotropin hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* 218, 377-379.
- Rivier, C. and Vale, W., 1983a. Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113, 939-942.
- Rivier, C. and Vale, W., 1983b. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305, 325-327.
- Rivier, C. and 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, 1320-1328.
- Rivier, J., Rivier, C. and Vale, W., 1984. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science* 224, 889-891.
- Romero, L. M. and Sapolsky, R. M., 1996. Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol* 8, 243-258.
- Rots, N. Y., Cools, A. R., Oitzl, M. S., de Jong, J., Sutanto, W. and de Kloet, E. R., 1996. Divergent prolactin and pituitary-adrenal activity in rats selectively bred for different dopamine responsiveness. *Endocrinology* 137, 1678-1686.



## REFERENCIAS

- Ruisseau, P. D., Tache, Y., Brazeau, P. and Collu, R., 1978. Pattern of adenohipofyseal hormone changes induced by various stressors in female and male rats. *Neuroendocrinology* 27, 257-271.
- Salmon, P., Pearce, S., Smith, C. C., Manyande, A., Heys, A., Peters, N. and Rashid, J., 1989. Anxiety, type A personality and endocrine responses to surgery. *Br J Clin Psychol* 28 (Pt 3), 279-280.
- Salome, N., Salchner, P., Viltart, O., Sequeira, H., Wigger, A., Landgraf, R. and Singewald, N., 2004. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* 55, 715-723.
- Sánchez-Elvira, A. and Paniagua, E., 2003. Introducción al estudio de las diferencias individuales. Sanz y Torres, Madrid.
- Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P. and Vale, W., 1987. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238, 522-524.
- Sapolsky, R. M., 1992. *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death*. MIT Press, Cambridge.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M. and Munck, A. U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55-89.
- Sara, S. J., Dyon-Laurent, C. and Herve, A., 1995. Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Brain Res Cogn Brain Res* 2, 181-187.
- Sawchenko, P. E., Li, H. Y. and 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. and Swanson, L. W., 1990. Organization of CRF immunoreactive cells and fibers in the rat brain: immunohistochemical studies. In: De Souza, E. B. and Nemeroff, C. B. (Eds.), *Corticotropin-releasing factor: basic and clinical studies of a neuropeptide*. CRC Press, Boca Raton, pp. 29-52.
- Scherer, K. R., 1999. Appraisal theory. In: Dalgleish, T. and Power, M. (Eds.), *Handbook of emotion and cognition*. Wiley, Chichester, England, pp. 637-663.
- Schommer, N. C., Kudielka, B. M., Hellhammer, D. H. and Kirschbaum, C., 1999. No evidence for a close relationship between personality traits and circadian cortisol rhythm or a single cortisol stress response. *Psychol Rep* 84, 840-842.
- Schwartz, M. W., Dallman, M. F. and Woods, S. C., 1995. Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol* 269, R949-957.
- Senba, E. and Ueyama, T., 1997. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29, 183-207.
- Senba, E., Umemoto, S., Kawai, Y. and 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, 283-294.
- Sewer, M. B. and Waterman, M. R., 2003. CAMP-dependent protein kinase enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. *J Biol Chem* 278, 8106-8111.
- Sharp, B. M., Matta, S. G., Peterson, P. K., Newton, R., Chao, C. and McAllen, K., 1989. Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta. *Endocrinology* 124, 3131-3133.
- Smagin, G. N. and Dunn, A. J., 2000. The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *Eur J Pharmacol* 405, 199-206.
- Smith, C. C., Hauser, E., Renaud, N. K., Leff, A., Aksentijevich, S., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., Gold, P. W. and Sternberg, E. M., 1992. Increased hypothalamic [3H]flunitrazepam binding in hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyporesponsive Lewis rats. *Brain Res* 569, 295-299.
- Smith, R., Lovelock, M., Owens, P. C., Chan, E. C. and Falconer, J., 1988. The effect of repetitive haemorrhage on plasma cortisol, beta-endorphin and N-terminal pro-opiomelanocortin in conscious sheep. *Horm Metab Res* 20, 612-615.
- Stefanski, V., 2001. Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis. *Physiol Behav* 73, 385-391.

- Steimer, T. and Driscoll, P., 2003. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6, 87-100.
- Steimer, T., la Fleur, S. and Schulz, P. E., 1997. Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)- and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behav Genet* 27, 503-512.
- Stephens, A., 1993. Stress and the cardiovascular system: a psychosocial perspective. In: Stanford, S. C. and Salmon, P. (Eds.), *Stress: from synapse to syndrome*. Academic Press, San Diego, pp. 119-141.
- Sternberg, E. M., Young, W. S., 3rd, Bernardini, R., Calogero, A. E., Chrousos, G. P., Gold, P. W. and Wilder, R. L., 1989. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4771-4775.
- Stohr, T., Szuran, T., Welzl, H., Pliska, V., Feldon, J. and Pryce, C. R., 2000. Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 809-819.
- Suda, T., Tozawa, F., Yamada, M., Ushiyama, T., Tomori, N., Sumitomo, T., Nakagami, Y., Demura, H. and Shizume, K., 1988. Insulin-induced hypoglycemia increases corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid levels in rat hypothalamus. *Endocrinology* 123, 1371-1375.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J. and Vale, W. W., 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36, 165-186.
- Taghzouti, K., Lamarque, S., Kharouby, M. and Simon, H., 1999. Interindividual differences in active and passive behaviors in the forced-swimming test: implications for animal models of psychopathology. *Biol Psychiatry* 45, 750-758.
- Trullas, R. and Skolnick, P., 1993. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 111, 323-331.
- Turnbull, A. V. and Rivier, C., 1997. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 215, 1-10.
- Ulrich-Lai, Y. M. and Engeland, W. C., 2002. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* 76, 79-92.
- Umemoto, S., Kawai, Y. and Senba, E., 1994a. Differential regulation of IEGs in the rat PVH in single and repeated stress models. *Neuroreport* 6, 201-204.
- Umemoto, S., Kawai, Y., Ueyama, T. and 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, 763-773.
- Umemoto, S., Noguchi, K., Kawai, Y. and Senba, E., 1994b. Repeated stress reduces the subsequent stress-induced expression of Fos in rat brain. *Neurosci Lett* 167, 101-104.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.
- Vallès, A., Martí, O. and Armario, A., 2003. Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *Eur J Neurosci* 18, 1353-1361.
- Vallès, A., Martí, O. and Armario, A., 2005. Mapping the areas sensitive to long-term endotoxin tolerance in the rat brain: a c-fos mRNA study. *J Neurochem* 93, 1177-1188.
- Vallès, A., Martí, O., García, A. and Armario, A., 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol* 279, R1138-R1144.
- van Eck, M., Berkhof, H., Nicolson, N. and Sulon, J., 1996. The effects of perceived stress, traits, mood states, and stressful daily events on salivary cortisol. *Psychosom Med* 58, 447-458.
- van Oers, J. W., Hinson, J. P., Binnekade, R. and Tilders, F. J., 1992. Physiological role of corticotropin-releasing factor in the control of adrenocorticotropin-mediated corticosterone release from the rat adrenal gland. *Endocrinology* 130, 282-288.

## REFERENCIAS

- Van Oers, J. W. and Tilders, F. J., 1991. Antibodies in passive immunization studies: characteristics and consequences. *Endocrinology* 128, 496-503.
- Veldhuis, H. D., Van Koppen, C., Van Ittersum, M. and De Kloet, E. R., 1982. Specificity of the adrenal steroid receptor system in rat hippocampus. *Endocrinology* 110, 2044-2051.
- Vernikos, J., Dallman, M. F., Bonner, C., Katzen, A. and Shinsako, J., 1982. Pituitary-adrenal function in rats chronically exposed to cold. *Endocrinology* 110, 413-420.
- Vigas, M., 1984. Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. In: Usdin, E. R. et al. (Eds.), *Stress. Role of catecholamines and other neurotransmitters*. Gordon and Breach Sci. Publ., New York, pp. 27-35.
- Vinson, G. P., Hinson, J. P. and Toth, I. E., 1994. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 6, 235-246.
- Walker, C. D., Rivest, R. W., Meaney, M. J. and Aubert, M. L., 1989. Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: use of two genetically selected lines (Roman low- and high-avoidance rats) as a model. *J Endocrinol* 123, 477-485.
- Watanabe, Y., Stone, E. and McEwen, B. S., 1994. Induction and habituation of c-fos and zif/268 by acute and repeated stressors. *Neuroreport* 5, 1321-1324.
- Weiss, J. M., 1972. Psychological factors in stress and disease. *Scientific American* 60, 104-113.
- Whitnall, M. H., 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40, 573-629.
- Wilkinson, C. W., Shinsako, J. and Dallman, M. F., 1979. Daily rhythms in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin are determined primarily by the time of feeding in the rat. *Endocrinology* 104, 350-359.
- Windle, R. J., Wood, S. A., Lightman, S. L. and Ingram, C. D., 1998. The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139, 4044-4052.
- Young, E. A., Akana, S. and Dallman, M. F., 1990. Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. *Neuroendocrinology* 51, 536-542.
- Zuckerman, M., 1986. Sensation seeking and the endogenous deficit theory of drug abuse. *NIDA Res Monogr* 74, 59-70.
- Zuckerman, M. and Kuhlman, D. M., 2000. Personality and risk-taking: common biosocial factors. *J Pers* 68, 999-1029.

Si se me permite una anécdota personal, durante todos estos años, mientras intentaba explicar a mis amigos y a la gente que iba pasando por mi vida, qué era "eso" de la Neurobiología del estrés sobre la que trabajaba en el laboratorio, muchos afirmaban estar estresados, que se me ofrecían como sujetos experimentales o que seguramente encontraría muchas ofertas de trabajo, que era un tema muy importante y de actualidad en nuestra sociedad. Os tomo la palabra, si algún día me paso a hacer investigación en humanos espero teneros aún cerca para utilizaros en mis experimentos.

Bromas a parte, parece mentira que haya llegado el momento de dar gracias a la gente que me ha acompañado durante todos estos años en mi camino. Es un momento bonito el de agradecer la ayuda o la compañía a los que están o han estado a tu lado en la realización de algo importante. Aunque es también es difícil darle matices y personalizar una sola palabra, que tiene dentro tantas emociones y acciones diferentes.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Antonio Armario García y la Dra. Roser Nadal Alemany, su ayuda durante todos estos años, sin la que el trabajo que ahora se acaba no habría sido posible. Gracias por guiarme, por exigirme un trabajo de calidad, y por los largos momentos de discusión y análisis de los resultados. A vuestro lado he aprendido la mayoría de lo que sé ahora sobre investigación en Neurociencia. Estoy segura que el espíritu crítico y todo el trabajo que he realizado hasta ahora con vosotros será una buena base en el camino que ahora comienza.

A Antonio, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por compartir sus conocimientos, formándome a través de su experiencia. Gracias por darme la oportunidad de aprender todo lo que he aprendido en el laboratorio.

A Roser, gràcies per ensenyarme tant fent-me partícip dels teus coneixements, i també per la teva complicitat. En aquest treball queden reflexats els llargs dies davant l'ordinador "fent i refent números", acompanyats dels petits reforçaments de xocolata, d'amagat. Gràcies per haver-me entés i per recolzar-me en més d'un moment difícil.

Quiero agradecer también a la Universidad Autònoma de Barcelona la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador, así como la beca asociada a proyecto concedida por el Plan Nacional Sobre Drogas del Ministerio del Interior, que me han permitido realizar esta tesis doctoral.

Quiero dar gracias también a mis compañeros de laboratorio, que tanto me han ayudado y con los que ha sido un placer trabajar, porque junto a ellos le he dado sentido a lo de ser un

## AGRADECIMIENTOS

“grupo” de investigación. Los largos experimentos diurnos y nocturnos, los momentos de café en el seminario y las miles de anécdotas y de fiestas (todo hay que decirlo), aunque no se leen entre las líneas de este trabajo, están ahí y bien guardados en mi memoria.

Gracias a Arancha y Astrid, por enseñarme y ayudarme en los inicios en el laboratorio.

Gràcies Xavi, perquè ha estat un plaer i una sort enorme compartir des del principi tots aquests anys de formació i investigació. Per les risas i moments de catarsi, per acompanyar-me en la il·lusió dels resultats i per ser el meu amic. He tingut molta sort d'estar al teu costat en el dia a dia d'aquesta feina.

Gràcies David, per ser un bon company i per fer-me sentir especial i anyorada en aquests últims mesos. Em quedo amb la teva tranquil·litat, amb les nostres converses i inquietuds musicals, i si pot ser, amb una invitació a la casa de Llançà (es broma).

Gracias Raúl por estar a mi vera estos años. Por estar siempre a punto para echarme una mano y ayudarme en todo lo que he necesitado. Porque aunque hayamos tenido algún momento bajo, ganan por goleada los muchos buenos momentos “altos”. A ver si algún día rescatamos esos pasos de tango! Ha sido genial compartir estos años contigo.

Sheila, muchísimas gracias por la complicidad durante todo este tiempo, por ser mi sucursal de actividades culturales en Barcelona y Girona, y espero que en algún momento, también nos veamos en Buenos Aires. Y gracias por las energías transoceánicas, llegaron a buen puerto, te lo aseguro.

Y aunque no hayamos compartido tanto tiempo, me gustaría dar las gracias también a Silvia, a Humberto, por su mirada sincera y siempre amigable, y a Raul Andero, a ver si nos seguimos cruzando en el camino. Mucha suerte a todos vosotros y a las nuevas generaciones del grupo. **Ánimo!**

Octavi, de tu també me'n recordo. De tu, de les teves converses i crítiques he après moltíssim. Espero que no perdem el contacte, i que em continuïs “no preguntant” pels temes importants, tu ja m'entens, i explicant-me les teves historietes, tot compartint una xocolata o un suc d'aquests increïbles del Forn de Sant Jordi.

Olga, muchísimas gracias por tu amistad. Muchas gracias por tu ayuda en todo el tema administrativo, pero sobre todo, por tu amistad, tu fuerza y tu alegría. Porque cada vez te admiro más como persona y tengo mucha suerte de haber compartido contigo muchos buenos (y malos) momentos. También, como no, te voy a estar toda la vida agradecida por hacer llegar a mis manos esa cámara de fotos que me ha hecho pasar tan buenos momentos mirando el mundo. Un besazo enorme!

Pilar i Josep, moltes gràcies per cuidar les meves ratetes, sense les quals sí que no hauria estat possible aquest treball. És una gozada haver treballat amb vosaltres i poder haver contat amb la vostra sempre disponible ajuda i confiança.

Muchas gracias también a todos los compañeros de Fisio, tanto a los de peces (Joan Carles, Cris, Adri, Pep, Mila, Laura, Laia, Camen, Simon, Lluís), como a los de MT (Natalia (hola nata!), Quino, Albert, Sergi, Javier, Juanma, Mercé, Amalia), por haber compartido conmigo sus risas y discusiones de trabajo en la cotidianidad laboral todo este tiempo.

Joan Carles, gràcies per decorar-me la tesis, i per haber-me rescatat de les dos dimensions des d'aquell dia de lluna plena. Merci per la teva amistat i per fer-me sentir tan especial (tot i que ja saps que em sobrestimes!). Merci a tu i a la Cris pels bons moments i les llargues converses després del cine. A veure si les reprenem!

També vull agrair al Dr. Ferran Balada la seva confiança. Gràcies Ferran per portar-me de la mà en els meus primers passos en la Neurociència.

Gracias también a la Dra. Carmen Sandi por los ánimos y la ayuda en estos últimos meses. Carmen, gracias por tu proximidad y por darle un bonito tono a la luz al final del túnel. A bientôt!

Gracias también a los de la AENC. A los veteranos: Carles, Arancha, Diego y Anna Llach, y a los de mi generación: Ana, Esther, Xavi, Guillem, Hugo, Mar, Jovita, Natalia. Porque ha sido una gozada organizar actividades con vosotros y vivir la multidisciplinaridad en vivo y en directo. Bueno, y claro, por esas Neurofarras que nos hemos pegado, que no sólo de ciencia vive el hombre...

Quiero dar también las gracias a los que me han acompañado en estos años desde fuera del laboratorio, disfrutando conmigo de las alegrías de los resultados, que seguramente no entendían muy bien, y ayudándome a remontar en los momentos en los que la motivación bajaba. Gracias por intentar entender e interesaros por eso que me absorbía en el laboratorio. Pero sobretodo gracias por quererme, cuidarme y hacerme sentir vuestra amistad.

La palabra Gracias se queda corta contigo, Isa. Como tu me dijiste un día, odio repetir una y otra vez las mismas palabras para explicar algo que cambia y que se siente bien adentro. Ya lo sabes, tengo una suerte enorme de haber crecido y seguir creciendo contigo y de poder compartir ahora las dos maravillosas flores de tu jardín, que me llenan de paz y alegría cada vez que las veo. Millones de gracias por tu amor, por tus risas, por tu calma, por tu abrazo, por tu confianza, por saber lo que pienso y lo que me pasa antes que yo misma. Gracias por ser mi Amiga.

## AGRADECIMIENTOS

Y a ti Silvia, ser una de las de siempre y seguir siéndolo es para mí muy importante. Gracias por tu tranquilidad y comprensión, por decir millones de cosas con sólo una mirada o un gesto. Y gracias por la ilusión que me diste con tu regalo de Navidad, pronto aumentamos esta familia!

Ana, Anita... gracias por haber compartido conmigo miles de horas y buenos momentos, tanto en la universidad, como fuera de ella. Millones de gracias por ser mi compañera de doctorado y discutir conmigo de "cosas de ciencia", y millones de gracias por escucharme y aguantarme mis momentos de catarsis (bueno, que yo también aguanté los tuyos, eh!). La verdad es que hemos vivido un montón de cosas juntas durante todos estos años. No me queda duda que seguiremos siendo buenas amigas y compañeras de actos culturales varios, aunque me tendrás que seguir haciendo chantajes gastronómicos para que vaya a verte a tu casa...

Isa, Silvia, Ana, egoístamente, espero teneros muy cerca durante muuuucho tiempo, que aunque me mudo, no os vais a librar de mí! Muchas gracias por estar muy cerquita en los buenos momentos, y también en los malos, los que desgarran, dándome calorcito en el corazón.

Gracias Gerard por deslumbrarme con tu alegría y vitalidad, por hacer del despiste un arte. Gracias por compartir conmigo tu sensibilidad, por compartir tu punto creativo hasta en el momento más cotidiano de la vida, por ayudarme con tu sonrisa en mis momentos bajos, y por potenciar con ella mis momentos de felicidad. Me has impregnado de tu mundo mágico y eso ya se me queda por dentro para siempre, como la música de tulipanes azules. Gracias por buscar conmigo la Fonda Almayer, casi la encontramos en los límites del mar de la Cala Saona.

Gracias a Anna y Vanesa, por compartir vuestra cotidianidad, alegría y buenos momentos en el piso estrechamente conmigo. Y por aguantarme en mis momentos autistas y en la histeria de estas últimas semanas. Porque uno de los mejores recuerdos del periodo final de la tesis va a ser esos desayunos familiares a las 7 de la mañana. Un placer compartir este trozo de mi vida con vosotras.

Y gracias a mis amigos que me han hecho descubrir que otro Sabadell es posible:

A David y Jordi Gardeñas, por sus risas compartidas, momentos jazzísticos y excursiones varias. Y miles de gracias por esa peazo calçotada para celebrar la alegría del depósito de la tesis.

Gracias a Lucky, por su chispa e ironía que tantas risas me han provocado en este último año.

Gracias Bome por explicarme tus sueños y compartir conmigo tus cuentos. Espero que la alegría de tus proyectos siga creciendo y que pronto me puedas enseñar tu Aracerta particular. A ver si al final no vas a ser hijo de la Estrella Negra...

Gracias Sandra, y gracias Silvia (en la distancia y o en Sabadell, aunque siempre cerquita), por seguir queriéndome y cuidándome desde los años de la carrera. Todo un lujo conservaros.

Y gracias también a la última adquisición en mi lista de personas importantes. Núria, milions de gracies pels regals sonors que m'han acompanyat i calmat durant aquestes últimes setmanes. Gracies pel teu somriure perenne i la teva mirada de complicitat xisposa. Perque haver-te conegut ha estat un raig d'alegria. Ojalà sempre fos tan fàcil tobar i coneixer persones com tu!

També gracies als altres jaimeros que m'han alegrat culturalment aquest últim any amb el seu bon rotllo i el seu bon criteri per triar cinema. És un gust i una sort haber-me creuat amb gent amb tanta iniciativa i tantes inquietuds.

Clara, David y Ferran, muchas gracias por las ayudas de ultima hora en lo del diseño de la tesis y por prestarme la paz de Ferran en las sobremesas de este último mes. Es una gozada tener vecinos así.

A la gente del pueblo, por ser mi aire fresco y cargadores de pilas en las vacaciones: Silvia (ay! Mi Silvi!), Patri, Gonzaliche, Fran, Chavino, Jacinto y Elena, Tito, Juanmi, Pipe, Paco y al clan de mis primos. Sin vosotros y los encantos de Alcántara esto se hubiese llevado mucho peor.

A "los de Girona": Chus, Toti, Susana, Moki, Begoña, Roser y Marta. Por los buenos momentos en las huidas a Girona, los conciertos de Not Yet y esas cenas mensuales de resumen de nuestra cotidianidad (mmmm... se me hace la boca agua). Que bien haberos conocido, gracias Shei!

Gracias también a Björk, Tortoise, Cannonball Adderley, Avishai Cohen, Tandoori Lenoir, La Negra (con Yelsy escondido en el contrabajo), Ojos de Brujo, Ben Harper, los momentos de Locura y alegría del Bicho, PJ Harvey, y en estos últimos días de la tesis a Céu, Silje Nergaard y Susheela Raman. Por acompañarme fielmente en mis momentos de trabajo. Sin vosotros, estos años hubiesen sido definitivamente menos amenos. Gracias también a las flores de mi ventana, al profesor Bartleboom y al Océano de Alessandro Baricco, por llenar de magia e imágenes preciosas mi cabeza repetidamente desde que os descubrí.

Por último quiero dar gracias a mi familia por haberme apoyado tanto, por ser mis incondicionales, no sólo durante estos años, sino durante toda mi vida. Gracias a mis hermanas, Mari y Esther, porque cada una a vuestra manera habéis estado a mi lado todos estos años. ¡Si es que me conocéis desde el principio! Gracias Papa y Mama, por intentar entenderme y respetarme cuando tomaba decisiones que quizás pensabais que no eran las más adecuadas. Gracias por cuidarme tanto y quererme más. Gracias mil y tres mil veces por preocuparos por mi, por recibir con orgullo las alegrías de lo que os iba explicando, y por entender mis periodos de ausencias. Gracias por estar siempre ahí.

Muchas Gracias a todos, con mayúsculas.

Y ahora si... FIN.



AGRADECIMIENTOS

