



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Neurociències

**Interacció entre estímuls estresants
emocionals i psicoestimulants:**

Activació de poblacions neuronals específiques en àrees clau del sistema
nerviós central.

Juan Antonio Ortega Sánchez

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona



Director

Antonio Armario García

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

2018

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

Ministerio de Ciencia e Innovación/Ministerio de Economía y Competitividad:

SAF2011-28313

SAF2014-53876-R

Generalitat de Catalunya

SGR2009-16

SGR2014-1020

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral,
Juan Antonio Ortega Sánchez se desempeñó como
Técnico de soporte a la investigación (TSR) en el Departamento de Biología Celular,
Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biociencias
de la Universitat Autònoma de Barcelona (2013-2016)
y desde 2017 se desarrolla como Técnico de soporte
a la investigación (TSR) en el Departamento de
Ciencias Experimentales y de la Salud
de la Universitat Pompeu Fabra
en el Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona.

*Dedicado a mis padres y hermano.
Sin vuestro apoyo, yo no habría llegado hasta aquí.*

Resumen

Resumen

Aunque la mayoría de los estudios sobre estrés agudo se centran en la respuesta a cada estímulo por separado, la posible interacción entre estímulos estresantes, de diferente o similar naturaleza, tiene una gran relevancia teórica ya que en la naturaleza los organismos pueden enfrentarse a más de un estímulo de manera simultánea (o casi simultánea). Independientemente de su naturaleza, los estímulos estresantes tienen en común la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), que puede ser activado por estímulos de naturaleza física o emocional. Dependiendo de sus características, los estímulos estresantes son procesados de manera en gran parte diferenciada por el SNC, aunque las señales finalmente convergen en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), estructura clave en la regulación del eje HPA. Muchas drogas como la cocaína y la anfetamina son capaces de activar amplias zonas del SNC y el propio eje HPA, siendo consideradas como estímulos estresantes farmacológicos. Estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto, en ratas, interacciones entre psicoestimulantes (anfetamina) y estímulos estresantes emocionales (v.g. natación forzada) cuando ambos se administran de manera simultánea, reduciéndose la activación del eje HPA y la hiperglucemia asociada al estrés emocional. Esta sinergia negativa también se observa con la exposición a la natación forzada y la administración de otro psicoestimulante como el metilfenidato, a dosis terapéuticamente relevantes en el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD).

El primer objetivo de la presente tesis ha sido el estudio de cómo la exposición simultánea a psicoestimulantes (anfetamina o metilfenidato) y estímulos estresantes emocionales (natación forzada) afecta a la activación de poblaciones neuronales específicas en áreas del SNC relacionadas con el procesamiento de ambos tipos de estímulos. Al objeto de extender la posibilidad de interacción a la exposición conjunta a estímulos estresantes de tipo emocional, hemos también estudiado de forma preliminar las consecuencias de la exposición simultánea al olor a depredador y a la inmovilización en plancha. La caracterización de las poblaciones neuronales activadas se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante doble hibridación *in situ* fluorescente (FISH) del gen de expresión temprana *c-fos* en combinación con marcadores específicos de fenotipos neuronales. Nuestro interés se ha centrado en las neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas de la corteza prefrontal medial, las neuronas D1R⁺ o D2R⁺ del estriado, las neuronas CRH⁺ del PVN y las neuronas tirosina hidroxilasa (TH)⁺ del área tegmental ventral y el locus coeruleus.

Los resultados indican que la exposición simultánea a dos estímulos da lugar a diversos tipos de interacción respecto a las poblaciones neuronales activadas. Los efectos son más evidentes con la anfetamina, que por sí misma causa activación de un gran número de áreas del SNC, que con el metilfenidato, que por sí mismo apenas tuvo efecto. Pudieron observarse los siguientes patrones de respuesta: i) una falta de efecto aditivo, cuando la activación de un estímulo predomina sobre el otro; ii) un efecto aditivo, que parece reflejar una contribución independiente de cada estímulo; iii) una sinergia negativa, de tal manera que un estímulo reduce la activación causada por el otro; y iv) una sinergia positiva, en la que la exposición simultánea causa mayor activación que la suma de cada uno de los estímulos. También se han observado sinergias negativas tras la exposición simultánea al olor a gato y a la inmovilización. En conjunto, los datos presentados aportan una mejor comprensión de la interacción entre estímulos estresantes emocionales y dos psicoestimulantes importantes respecto a la adicción y el tratamiento del ADHD. Además, aportan evidencias de una interacción entre estímulos emocionales procesados al mismo tiempo, lo que puede ser de interés en patologías como el trastorno de estrés postraumático.

Abstract

Although most acute stress studies focus on the response to each stimulus given separately, the possible interaction between stressors of different or similar nature has a critical theoretical relevance as in nature organisms can face more than one stimulus simultaneously (or almost simultaneously). Regardless of its nature (physical or emotional), stressors have in common the capability to activate the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA). Although depending on their characteristics stressors are differentially processed by the SNC, signals eventually converge at the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), the key area in the regulation of the HPA axis. Many drugs of abuse such as cocaine and amphetamine are able to activate a wide range of brain areas and also the HPA axis and, as such, are considered as pharmacological stressors. Previous research from our laboratory has demonstrated in rats some interactions between psychostimulants (amphetamine) and emotional stressors (forced swim) when both stimuli were administered simultaneously, resulting in reduced activation of the HPA axis and stress-induced hyperglycemia. The aforementioned interaction was also observed with the exposure to forced swim and the administration of another psychostimulant, methylphenidate, at doses that are used for the treatment of the attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD).

The first aim of the present work objective has been the study of how simultaneous exposure to psychostimulants (amphetamine or methylphenidate) and emotional stressors (forced swim) alter the activation of specific neuronal populations in brain areas related to the processing of both stimuli. In order to extend the possibility of interaction to simultaneous exposure to two emotional stressors, we have also preliminary studied the consequences of simultaneous exposure to predator odor and immobilization. The characterization of activated neuronal populations has been carried out mainly by double *in situ* hybridization (FISH) of the immediately early gene *c-fos* in combination with specific neuronal phenotype markers. Our interest has focused on glutamatergic and GABAergic neurons of the medial prefrontal cortex, D1R⁺ and D2R⁺ neurons of the striatum, CRH⁺ neurons of the PVN, and tyrosine hydroxylase (TH⁺) neurons of the ventral tegmental area and the locus coeruleus.

Our results indicate that simultaneous exposure to two stimuli leads to different types of interactions with respect to activated neuronal populations. The effects are more evident with amphetamine, which by itself, causes wide-spread activation of the brain, than with methylphenidate, which by itself has null or modest effect. The following response patterns were observed: i) lack of additive effect, when activation of one stimulus dominate over the other; ii) additive effect, which seems to reflect an independent contribution of each stimulus; iii) negative synergy, when one stimulus reduces the activation caused by the other stimulus; and iv) positive synergy, when simultaneous exposure causes more activation than the sum of each stimulus. Negative synergies have also been observed after simultaneous exposure to predator odor and immobilization. Taken together, the present data contribute to a better understanding of the interaction between emotional stressors and two types of psychostimulants that are important for addiction and the treatment of ADHD. In addition, we add some evidence on the interaction between two emotional stressors when processed simultaneously, what may be of interest in pathologies such as the post-traumatic stress disorder.

Índice

Abreviaturas	18
Introducción	22
1. <i>Concepto de estrés</i>	22
2. <i>Estrés y Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA)</i>	26
2.1. <i>Eje HPA</i>	27
2.2. <i>Núcleo Paraventricular del Hipotálamo y CRH</i>	28
2.3. <i>Hipófisis y ACTH</i>	32
2.4. <i>Glándula adrenal y glucocorticoides</i>	33
2.5. <i>Dinámica de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes</i>	36
2.6. <i>El eje HPA como marcador de la intensidad del estrés</i>	38
3. <i>Genes de expresión temprana</i>	39
3.1. <i>c-fos como marcador de activación neuronal</i>	41
3.2. <i>Aplicación de los IEG en el estudio del estrés</i>	43
4. <i>Vías de procesamiento central de los estímulos estresantes</i>	46
4.1. <i>Proyecciones directas al PVN</i>	47
4.2. <i>Proyecciones indirectas al PVN</i>	50
5. <i>Sustancias psicoactivas</i>	55
5.1. <i>Vías del refuerzo: Papel del sistema dopaminérgico</i>	57
5.2. <i>D-Anfetamina</i>	59
5.3. <i>Metilfenidato</i>	62
5.4. <i>Genes de expresión temprana y psicoestimulantes</i>	66
6. <i>Interacción entre estímulos estresantes</i>	69
Hipótesis y objetivos	78

Material y métodos	84
1. <i>Animales de experimentación y procedimientos generales</i>	84
2. <i>Administración de fármacos</i>	84
3. <i>Procedimientos de estrés.</i>	85
3.1. Natación forzada	85
3.2. Olor al depredador	85
3.3. Inmovilización en plancha	85
4. <i>Procedimientos histológicos</i>	86
4.1. Extracción y procesamiento del encéfalo	86
4.2. Obtención de las ribosondas	87
4.3. Hibridación <i>in situ</i>	87
5. <i>Captura y análisis de imágenes</i>	90
6. <i>Análisis estadístico de los datos</i>	91
Resultados	95
<i>Capítulo 1. Interacción entre anfetamina y estrés: efectos a nivel del SNC</i>	95
Introducción	95
Diseño experimental	96
Resultados	98
<i>Capítulo 2. Interacción entre metilfenidato y estrés: efectos a nivel del SNC</i>	120
Introducción	120
Diseño experimental	121
Resultados	122
<i>Capítulo 3. Interacción entre estímulos estresantes emocionales: efectos a nivel del SNC</i>	139
Introducción	139
Diseño experimental	140
Resultados	141

Discusión general	155
<i>Interacción entre psicoestimulantes y estrés</i>	<i>156</i>
Natación forzada	156
Anfetamina	163
Metilfenidato	168
Interacción entre anfetamina y natación forzada	172
Interacción entre metilfenidato y natación forzada	178
<i>Interacción entre estímulos estresantes emocionales</i>	<i>181</i>
Olor al depredador e inmovilización en plancha	181
Interacción entre el olor al depredador y la inmovilización en plancha	185
Conclusiones	192
Bibliografía	198

Abreviaturas

5-HT: serotonina.

A: adrenalina.

AcbC: región *Core* del Acb.

AcbSh: región *Shell* del Acb.

ACTH: hormona adrenocorticotropa.

AMPH: d-Anfetamina.

ARC: núcleo arqueado del hipotálamo.

AP-1: complejo de transcripción proteína activadora 1.

AVP: arginina-vasopresina.

BLA: complejo basolateral de la amígdala.

BNST: bed nucleus de la *stria terminalis*.

aBNST: subdivisión anterior del BNST.

pBNST: subdivisión posterior del BNST.

CeA: amígdala central.

CPu: estriado.

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CRHR₁: receptor 1 de CRH.

CRHR₂: receptor 2 de CRH.

dcPVN: región dorsal *cap* del PVN.

DA: dopamina

DAT: proteína recaptadora de DA.

DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo.

EM. eminencia media.

FH: formación hipocampal.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GC: glucocorticoides.

GR: receptor de glucocorticoides.

hnRNA: RNA heteronuclear.

HPA: eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

IL: subdivisión infralímbica de la mPFC.

IL-1 β : Interleukina 1 β .

IMO: inmovilización en plancha.

LH: hipotálamo lateral.

LS: septum lateral.

MeA: amígdala medial.

MePO: núcleo preóptico medial.

mpdPVN: subdivisión medial parvocelular dorsal del PVN.

mPFC: corteza prefrontal medial

mPVN: región magnocelular del PVN.

mpvPVN: región medial parvocelular ventral del PVN.

mRNA: RNA mensajero.

MR: receptor de mineralocorticoides.

MPH: metilfenidato.

NA: noradrenalina.

NET: proteína recaptadora de NA.

NTS: núcleo del tracto solitario.

OvLT: órgano vasculoso de la lámina terminal.

OXT: oxitocina.

Peri-PVN: neuronas GABAérgicas situadas en la periferia del PVN.

mPOA: área preóptica medial.

PAG: sustancia gris periacueductal.

PrL: subdivisión prelímbica de la mPFC.

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.

PVTh: núcleo paraventricular del tálamo.

SERT: proteína recaptadora de 5-HT.

SFO: órgano subfornical.

SGA: síndrome general de adaptación.

SMA: eje simpático-médulo-adrenal.

SN: sustancia negra.

smPVN: región submagnocelular del PVN.

SNC: sistema nervioso central

SO: núcleo supraóptico.

Ucn: urocortinas 1, 2 y 3.

vSUB: *subiculum* ventral.

VTA: área tegmental ventral.

Introducción

Introducción

1. Concepto de estrés

En la segunda mitad del siglo XIX el fisiólogo **Claude Bernard**, basándose en sus observaciones respecto al rol del hígado en la liberación de glucosa a partir de los depósitos de glicógeno y la función de los nervios simpáticos en el mantenimiento de la temperatura corporal, introdujo el concepto de “*milieu intérieur*”, que propone “*la habilidad de un organismo de mantener un fluido constante alrededor de las células, independientemente de las perturbaciones en el ambiente externo*” (Goldstein y Kopin, 2007).

A principios del siglo XX y basándose en el concepto propuesto por Claude Bernard, **Walter B. Cannon** acuñó el término “**homeostasis**” para describir los procesos fisiológicos corporales encargados del mantenimiento, dentro de unos rangos aceptables, de múltiples variables fisiológicas críticas para la supervivencia del organismo (v.g. presión del oxígeno, temperatura corporal o concentración de glucosa en sangre; Goldstein y Kopin, 2007). La homeostasis puede verse comprometida por una gran variedad de amenazas, como la exposición al frío, hemorragias o dolor, entre otras. Según Cannon, estas amenazas activan tanto el sistema nervioso simpático como la médula adrenal (sistema simpático-médulo-adrenal, SMA), restaurando la homeostasis. Por ejemplo, cuando la temperatura corporal aumenta, el sistema termorregulador provoca que el cuerpo empiece a sudar además de dirigir el flujo sanguíneo de las vísceras a la piel, aumentando la pérdida de calor. Además, Cannon extendió el tipo de amenazas que podían afectar la homeostasis incluyendo estímulos no sólo de naturaleza física sino también de naturaleza emocional, describiendo el concepto de reacción de alarma o de “**lucha-huida**” (del inglés, *fight or flight*).

El concepto de **homeostasis** fue revisado por **Sterling** y **Eyer** a principios de los años 80. Estos autores acuñaron el concepto de **alostasis** (estabilidad a través del cambio) basándose en sus observaciones sobre cómo algunas variables fisiológicas (v.g. presión

sanguínea, frecuencia cardíaca o niveles de glucosa en sangre) fluctuaban dentro de unos rangos a lo largo del día o en diferentes situaciones como proceso de adaptación a diferentes condiciones ambientales (ver revisión en McEwen y Stellar, 1993). Siguiendo la estela de estos dos autores, **McEwen** incorporó el concepto de **alostasis** al campo del estrés (McEwen, 1998; McEwen y Wingfield, 2003). Así, se distinguiría entre: **i) homeostasis**, en referencia al mantenimiento de la estabilidad de los parámetros vitales para la supervivencia del organismo (presión osmótica, pH, temperatura); y **ii) alostasis**, que hace referencia a los procesos que se activan en el organismo con la finalidad de mantener constantes dichos parámetros frente a perturbaciones ambientales físicas y/o sociales. La **carga alostática** sería el coste de la activación de los procesos encargados de conservar la homeostasis en los organismos (ver revisión en McEwen y Gianaros, 2011). Las consecuencias negativas del estrés sobre el organismo aparecerían cuando la carga alostática es excesiva y perdura en el tiempo.

Cannon nunca utilizó el término “*estrés*” y no fue hasta 1936 cuando **Hans Selye** publicó los estudios que le permitieron popularizar el término “*estrés*” tal y como lo conocemos hoy en día. Según su definición, el estrés es “*la respuesta no específica del cuerpo ante cualquier demanda sobre él*” (Selye, 1976). Por no específico se refería a un cuadro de respuestas comunes independientes de la naturaleza del estímulo causante o estresor (v.g. pérdida de peso, hipertrofia adrenal, ulceración gastrointestinal y pérdida de peso). Selye (1946) denominó a este cuadro de respuestas comunes el “**Síndrome General de Adaptación, SGA**” (de sus siglas en inglés, GAS) el cual consta de tres etapas: **i)** una “**reacción de alarma**”, resultando en una descarga del eje SMA; **ii)** una “**etapa de adaptación o resistencia**”, si el estímulo perdurase en el tiempo; y **iii)** una “**etapa de fatiga**” pudiendo ocurrir la muerte del organismo. Posteriormente demostró que la aparición del cuadro de respuestas comunes del GAS estaba estrechamente ligada a la activación de la corteza adrenal. Así, los glucocorticoides liberados por la corteza adrenal ayudarían a combatir al estímulo estresante, pero también serían los responsables de la aparición de patologías si el estímulo estresante perdurara en el tiempo (Goldestin y Kopin, 2007). Es importante remarcar que, en los primeros estudios de Selye existía cierta

controversia sobre si el concepto “estrés” se refería al causante de dichos cambios fisiológicos o bien, a la respuesta del organismo a dicho estímulo. Debido a esta confusión, en sus trabajos posteriores propuso dos nuevos términos con el fin de evitar tal confusión: i) “*stressor*” refiriéndose al estímulo estresante que da lugar a la perturbación del organismo y, ii) “*stress*” como la respuesta del organismo. Actualmente, la terminología más apropiada para estos conceptos distingue entre **estímulo estresante** (*stressor*), **estrés** como estado global del organismo y **respuesta de estrés** (Armario, 2006a). En resumen, lo que hoy en día conocemos como respuesta de estrés incluye los estudios de Cannon y Selye. Mientras el primero enfatizó en la activación del sistema SMA para mantener la homeostasis ante una perturbación, el segundo hizo hincapié en la activación de la corteza adrenal como principal sistema efector.

Numerosos autores han revisado la definición del concepto de estrés a lo largo de los años. El aspecto más criticado de la definición de Selye era el referente a la inespecificidad de la respuesta del organismo frente a un estímulo estresante. Hoy en día está bien establecido que, además de dicha respuesta común e inespecífica ante una situación estresante, existe también una respuesta específica característica del estímulo estresante concreto, relacionada con las cualidades del mismo, aunque esta afirmación es muy obvia con estímulos estresantes físicos y mucho menos con estímulos estresantes emocionales (Armario, 2006a). No obstante, el avance en el conocimiento más exhaustivo de los elementos implicados en la percepción, el procesamiento y la respuesta de los organismos frente a estímulos estresantes ha puesto de manifiesto la existencia de otros factores que influyen en la respuesta al estrés. En este sentido, a finales de los años 60, **Richard Lazarus** desarrolló las teorías del estrés psicológico y planteó que la respuesta de estrés aparecería cuando se sobrepasa la capacidad de afrontar la situación. Es decir, la situación se torna estresante sólo si se percibe como amenazadora, peligrosa e incontrolable y, por lo tanto, los individuos deben realizar un análisis cognitivo previo, consciente o no consciente (ver revisión en Lazarus 1993). De esta manera, la respuesta de los individuos ante una situación estresante, sería dependiente de la evaluación que lleva a cabo cada individuo (Korte *et al.*, 2005).

Dicho de manera simple, la respuesta a una situación estresante vendría influida por el **procesamiento cognitivo** y por las **estrategias de afrontamiento** del individuo. Dichas estrategias son el repertorio de respuestas que tiene el individuo para escapar de la fuente de experiencias perturbadoras/aversivas o para disminuir su impacto (Koolhaas *et al.*, 1999). A modo de síntesis, se han descrito dos tipologías de estrategias de afrontamiento frente a un estímulo estresante: **i) las proactivas**, cuya finalidad es hacer frente de manera directa a la situación aversiva (*fight*); y **ii) las reactivas**, que se basan en evitar o escapar de la situación estresante (*flight*).

A principios de los años 70, Weiss (1972) propuso el papel relevante que ejercían la predecibilidad y la controlabilidad sobre una situación estresante para determinar el impacto del estrés sobre el individuo. De hecho, se ha propuesto que la percepción cognitiva de impredecibilidad y/o ausencia de control es un factor crucial para considerar una situación como un factor estresante (Koolhaas *et al.*, 2011). Por lo tanto, la ausencia o la presencia del control sobre la situación estresante parece ser un factor crítico en la posible aparición de los numerosos efectos negativos del estrés.

Desde que Selye formulara por primera vez el concepto de estrés, no existe todavía un consenso claro sobre la definición de dicho concepto. Una de las definiciones que consideramos más completa y apropiada para poder situar nuestro trabajo en un marco teórico adecuado es la propuesta por Vigas (1984) que considera el estrés como: “*la respuesta del organismo, desarrollada a lo largo de la filogenia, frente a agentes reales o simbólicos que ponen en peligro la integridad del organismo y que no pueden afrontarse mediante los mecanismos homeostáticos normales*”. De esta definición destacamos la distinción entre dos categorías de estímulos estresantes: los **sistémicos** y los **emocionales** (Kovács *et al.*, 2005). Los estímulos estresantes de carácter **sistémico** representan una amenaza real para la homeostasis y se procesan a través de vías sensoriales somáticas, viscerales o circunventriculares. Son ejemplos la hipoxia, la hipoglucemia, la hemorragia o la infección. No obstante, los estímulos estresantes **emocionales** no representan una amenaza directa para la homeostasis, pero generan una respuesta de estrés anticipada ante

una posible alteración homeostática. Estas respuestas pueden ser innatas de una especie o adquiridas mediante condicionamiento clásico (aprendizaje basado en asociaciones de estímulos), siendo ejemplos la derrota social o el olor al depredador. Si bien esta clasificación es aceptada, algunos modelos animales de estrés comparten características de ambos componentes, por lo que se consideran estímulos estresantes **mixtos** (Kovács *et al.*, 2005). Así, estímulos estresantes como el choque eléctrico, la inmovilización en plancha o la natación forzada, aunque tienen un componente fundamentalmente emocional también tienen, en menor medida, un componente físico. Un buen ejemplo lo encontraríamos en el modelo de la natación forzada, donde la temperatura del agua resulta crítica, pudiendo producir hipotermia si la temperatura es inferior a 36 °C (Porsolt *et al.*, 1979; Dal-Zotto *et al.*, 2000).

2. Estrés y Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA)

En mamíferos, la exposición a situaciones de estrés implica la activación de dos grandes ejes fisiológicos: **i) el sistema nervioso vegetativo**, en especial la rama simpática (SMA), con la consecuente liberación de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) a la circulación sanguínea; y **ii) el eje HPA**, el cual es el responsable de la liberación de glucocorticoides al torrente circulatorio. Estos dos sistemas tienen como objetivo inducir cambios fisiológicos y conductuales/cognitivos que harán posible el correcto afrontamiento de la situación estresante y, por consiguiente, la supervivencia del individuo. Además, inhiben tanto procesos anabólicos como funciones que en ese momento no son esenciales para la supervivencia como el crecimiento o la reproducción. La activación del **eje SMA** conlleva un aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, así como de los niveles de glucosa en sangre (glucogenólisis). Es importante remarcar que las hormonas del eje SMA no responden de igual manera ante cualquier situación. Así, la A estaría más implicada en la activación emocional en situaciones de estrés, mientras que la NA se centraría en el ajuste y control de la actividad del organismo (Armario, 1998). Por su parte, la activación del **eje HPA** implica la liberación de glucocorticoides en sangre, los cuales potencian los mecanismos que ayudan a mantener los niveles de glucosa frente a una demanda

prolongada. En el presente trabajo nos centraremos fundamentalmente en el eje HPA y su regulación por el SNC.

2.1. Eje HPA

De los dos ejes anteriormente comentados, sin duda, el eje HPA (Figura 1) es el mejor caracterizado ya que juega un papel crítico en las consecuencias fisiopatológicas y psicopatológicas resultantes de la exposición a estímulos estresantes (Armario, 2006a). Aunque profundizaremos más adelante en el procesamiento de los estímulos estresantes en el sistema nervioso central (SNC, Ver Capítulo 4), es importante destacar que los estímulos estresantes de tipo **emocional** se procesan inicialmente en estructuras jerárquicamente superiores tales como la corteza prefrontal medial (mPFC), el septum lateral (LS), parte del estriado y la amígdala. Los estímulos estresantes **físicos** se procesan en núcleos del tronco encefálico y en los órganos circunventriculares (ver revisión en Herman y Cullinan, 1997). No obstante, independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, la información acaba convergiendo en las neuronas hipofisiotrópicas del **núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)**, en especial en la **región medial parvocelular dorsal del PVN (mpdPVN)**. Tras su activación, estas neuronas secretarán principalmente **hormona liberadora de corticotropina (CRH)** y **arginina-vasopresina (AVP)** al sistema portal hipofisario de la eminencia media. Éstas, a su vez, actuarán sobre las células adrenocorticotropas de la hipófisis anterior, promoviendo la síntesis y liberación al torrente circulatorio de la **hormona adrenocorticotropa (ACTH)**. La ACTH inducirá en la corteza adrenal la síntesis y liberación de **glucocorticoides** (corticosterona en la mayoría de roedores y principalmente cortisol en humanos). Éstos producen numerosos efectos fisiológicos destinados a controlar una correcta movilización de los recursos (estimulando procesos catabólicos e inhibiendo procesos anabólicos) y preparar al organismo para un posible estrés futuro (ver revisión en Sapolsky, 2000). Además, los glucocorticoides se encargan de inhibir la propia actividad del eje HPA a través de mecanismos de retroinhibición, actuando sobre múltiples áreas

como la hipófisis anterior, el PVN y estructuras suprahipotalámicas (ver revisión en de Kloet, 1998; 2003; Armario, 2006a).

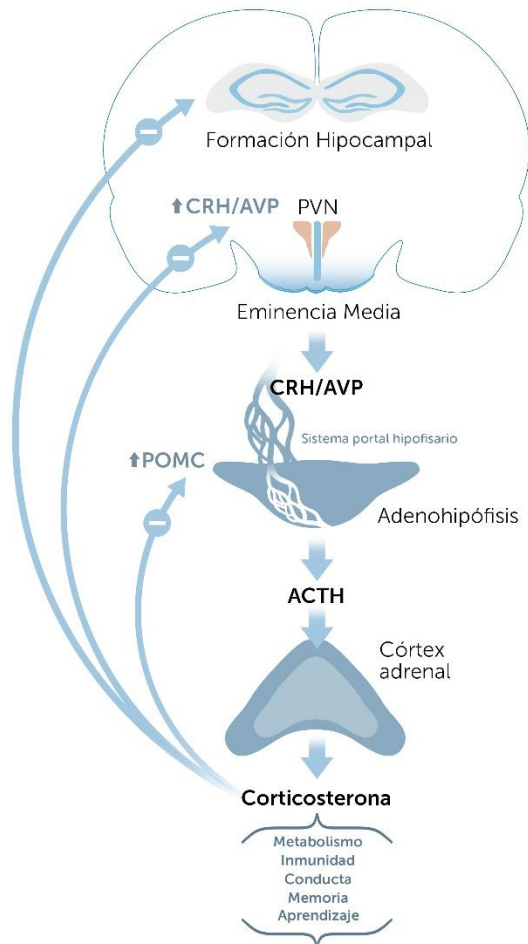


Figura 1. Esquema general del funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. ACTH: hormona adrenocorticotropa; AVP: arginina-vasopresina; CRH: hormona liberadora de corticotropina; POMC: proopiomelanocortina; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.

2.2. Núcleo Paraventricular del Hipotálamo y CRH

El PVN puede dividirse en diferentes regiones en base a criterios funcionales y morfológicos (Figura 2; Armario, 2006b): i) magnocelular, **mPVN**; ii) dorsal *cap*, **dcPVN**; iii) **mpdPVN**; iv) medial parvocelular ventral, **mpvPVN** y; v) submagnocelular, **smPVN**. La región mPVN consta de neuronas de gran tamaño que sintetizan AVP y oxitocina (OXT) y proyectan a la neurohipófisis a través de la zona interna de la eminencia media. Las regiones dcPVN, mpvPVN y smPVN contienen neuronas que

producen CRH, entre otros neuropéptidos, y proyectan al tronco encefálico. Por último, la región mpdPVN contiene neuronas pequeñas que sintetizan CRH y están implicadas en la activación del eje HPA. Cabe remarcar que existe un porcentaje de neuronas del mpdPVN que co-expresan AVP y que, junto con el CRH, ejercen un efecto sinérgico positivo sobre la liberación de ACTH (Armstrong, 2004; Engelmann *et al.*, 2004). En la respuesta de la ACTH a las situaciones estresantes podrían intervenir, además de las mencionadas CRH y AVP, otros secretagogos como la OXT, angiotensina II y las catecolaminas, aunque el papel de éstas últimas es más confuso. Por lo tanto, es probable que la respuesta de la ACTH a un estímulo estresante particular pudiera depender de una combinación de todos estos secretagogos liberados en la eminencia media (Antoni, 1986). Las neuronas que expresan CRH no sólo se encuentran en el PVN, sino que se pueden encontrar en muchas otras áreas del SNC como la corteza cerebral; la formación hipocampal (FH), el bed nucleus de la *stria terminalis* (BNST), la amígdala central (CeA), el Rafe y el núcleo de Barrington (Bar) y podrían estar implicadas en la regulación de las respuestas conductuales y autonómicas al estrés (Swanson *et al.*, 1983; Champagne *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999).

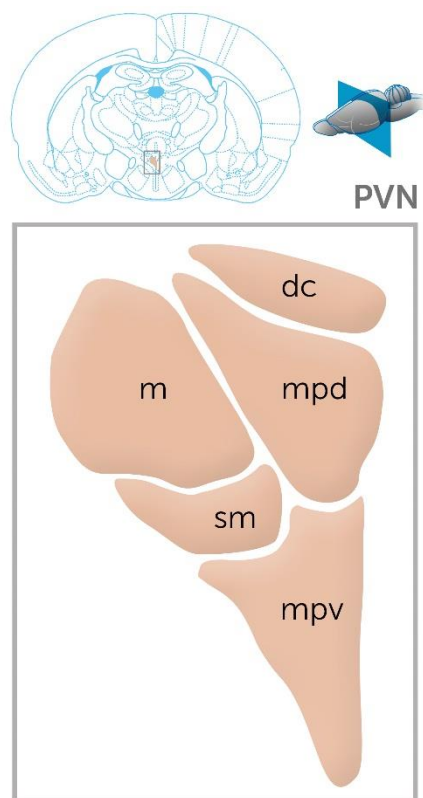


Figura 2. Esquema de las subdivisiones del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)

Según criterios funcionales y morfológicos, las principales regiones del PVN son: región magnocelular (m), región dorsal parvocelular (dc), región medial parvocelular dorsal (mpd), región medial parvocelular ventral (mpv) y región submagnocelular (sm). Adaptado de Armario, 2006b.

2.2.1. CRH y receptores de CRH.

El CRH es el principal miembro de una familia de neuropéptidos que incluye a las **urocortinas 1, 2 y 3** (Ucn1, Ucn2 y Ucn 3; Bale y Vale, 2004) y actúan a través de dos tipos de receptores: **receptor 1 (CRHR₁)** y **2** (con sus dos variantes, **CRHR_{2α}** y **CRHR_{2β}**). El CRH, al igual que la Ucn1, muestra una elevada afinidad por el CRHR₁, mientras que, a diferencia de lo que ocurre con las tres Ucn, muestra una baja afinidad por el CRHR₂. El CRH inicia la respuesta neuroendocrina del eje HPA a través de su unión al CRHR₁, un receptor de membrana acoplado a proteínas G localizado en las células corticotropas de la adenohipófisis (Bale y Vale, 2004). El CRHR₁ se encuentra ampliamente distribuido por el SNC, encontrándose en áreas que responden al estrés como la mPFC, la FH, el LS, la CeA, el tálamo, el cerebelo y núcleos del tronco del encéfalo (Aguilera, 2012). Esta localización extrahipotalámica (fuera del eje HPA) del CRHR₁ estaría relacionada con la mediación de las respuestas conductuales y autonómicas al estrés (Bale y Vale, 2004; Zorrilla y Koob, 2004), además de participar en procesos adictivos (ver revisión en Zorrilla y Koob, 2014). Por otra parte, el CRHR₂ tiene una distribución más restringida

en el SNC, limitándose a zonas como la FH, el LS y el hipotálamo, presentando mayor afinidad por las Ucn que el CRHR₁. En cuanto a la relación del CRHR₂ con el eje HPA, clásicamente se lo ha relacionado con la reducción de la actividad del eje HPA (Korosi y Baram, 2008). Sin embargo, recientemente se ha relacionado la activación de neuronas CRHR₂ positivas localizadas en el LS con la activación del mpdPVN, así como con la inducción de conductas ansiogénicas (Anthony *et al.*, 2014).

2.2.2. AVP y receptores de AVP.

Es importante considerar la función de la AVP en la liberación de ACTH debido al porcentaje de neuronas en el PVN que co-expresan tanto CRH como AVP. La AVP es un nonapéptido que se sintetiza principalmente en el núcleo supraóptico (SO) y en el mPVN (Engelmann *et al.*, 2004). Los axones de las neuronas que contienen AVP proyectan a la neurohipófisis y liberan AVP a la circulación sanguínea, participando en la regulación osmótica. Además, la AVP también se sintetiza en las neuronas parvocelulares de CRH del mpdPVN y se co-libera en el sistema portal hipofisiario en respuesta al estrés. Los efectos biológicos de la AVP se deben a su unión a tres tipos de receptores acoplados a proteínas G: V1a, V1b y V2 (ver revisión en Rotondo *et al.*, 2016). La función del V1a en el SNC está relacionada con la regulación del ritmo circadiano, la temperatura corporal y conductas sociales, además de desempeñar un papel crítico en el desarrollo de diversos trastornos psiquiátricos como la ansiedad, la depresión y el trastorno de estrés post-traumático. El receptor V1b es el responsable de las acciones de la AVP sobre las células corticotropas de la hipófisis. Por último, el V2 ejerce sus efectos fuera del SNC, principalmente en el riñón, incrementando la permeabilidad y la reabsorción de agua por parte de éste. La AVP potencia los efectos del CRH sobre la secreción de ACTH tanto *in vivo* como *in vitro* aunque por sí sola no tiene efecto sobre la síntesis de ACTH y ejerce un efecto débil sobre su liberación (Rivier y Vale, 1983; Makara *et al.*, 2004). Es importante remarcar que, en el mpdPVN y en condiciones normales, sólo una pequeña fracción de neuronas coexpresan CRH y AVP. Sin embargo, tras una activación prolongada del eje HPA (v.g. estrés crónico) tiene lugar un incremento sustancial del número de neuronas que coexpresan ambos neuropéptidos (de Goeij *et al.*, 1992). Si se tiene en cuenta que la

estimulación sostenida del eje HPA tiene como consecuencia una regulación a la baja de los receptores de CRH en la adenohipófisis (Hauger *et al.*, 1988), este incremento en la co-expresión de AVP permitiría mantener la liberación de ACTH en respuesta a una situación de estrés prolongado o crónico. Además de las neuronas de AVP que se encuentran en el hipotálamo y conforman la vía hipotálamo-neurohipofisial, existen neuronas que expresan AVP en numerosas áreas cerebrales como el septum, el BNST y la amígdala medial (MeA). La activación de neuronas AVP de la MeA y del BNST con proyecciones hacia el LS y la FH se ha relacionado con la modulación de la conducta y los procesos de memoria asociados al estrés (Alescio-Lautier *et al.*, 2000).

2.3. Hipófisis y ACTH

La hipófisis o glándula pituitaria está formada por dos regiones: la **neurohipófisis** y la **adenohipófisis** (Armstrong, 2004). La **neurohipófisis** incluye tres partes: **i)** la eminencia media (EM), **ii)** el tallo hipofisario y **iii)** el lóbulo posterior o *pars nervosa*. La **neurohipófisis** está formada por numerosos vasos fenestrados y recibe los axones de las neuronas magnocelulares procedentes del SO y del PVN. Además, recibe aferencias adrenérgicas desde el núcleo del tracto solitario (NTS), dopaminérgicas desde el peri-PVN y algunas proyecciones de diferentes péptidos neuroactivos como el ácido γ -aminobutírico (GABA) o serotonina (5-HT), que pueden influir en la liberación hormonal actuando directamente en la neurohipófisis. Por su parte, la **adenohipófisis** la componen: **i)** el lóbulo anterior (*pars distalis*), **ii)** el lóbulo intermedio (*pars intermedia*) y **iii)** la *pars tuberalis*. El lóbulo anterior contiene las células que sintetizan propiomelanocortina (POMC, precursora de la ACTH), prolactina (PRL), hormonas de crecimiento, tirotropina, hormona folículo-estimulante y hormona luteinizante. El lóbulo intermedio lo componen células glandulares que sintetizan péptidos emparentados con la POMC y reciben inervaciones dopaminérgicas desde el núcleo arqueado del hipotálamo, ARC (Williams, 2008). Por su parte, la *pars tuberalis* contiene neuronas ricas en receptores de melatonina, una de cuyas funciones es mediar la liberación de PRL en función del fotoperíodo (ver revisión en Wittkowski *et al.*, 1999).

La ACTH es un péptido de 30 aminoácidos formado a partir de la POMC cuyo procesamiento proteolítico da lugar tanto a la ACTH como a otras moléculas como lipotropina y endorfinas. La ACTH tiene una dinámica de liberación muy rápida, obteniendo sus valores máximos entre los 5 y 10 minutos después del inicio del estímulo estresante. Si el estímulo es sostenido, el máximo suele alcanzarse entre los 20 y 30 minutos (ver revisión en Armario, 2000).

2.4. *Glándula adrenal y glucocorticoides*

La glándula adrenal se compone de dos partes muy diferenciadas: la médula y la corteza. La **médula adrenal** contiene células cromafinas, las cuales son neuronas post-ganglionares simpáticas modificadas e inervadas por neuronas pre-ganglionares del simpático que sintetizan A y NA. Éstas influyen de manera importante en los niveles circulantes de A y, en menor medida, de NA. La **corteza adrenal** rodea a la médula y en ella se pueden distinguir tres capas: a) **zona glomerular**, más cercana a la superficie y que produce mineralocorticoides; b) **zona fascicular**, intermedia, que produce mayoritariamente glucocorticoides; y c) **zona reticular**, más profunda, considerada una fuente secundaria de andrógenos.

Los **glucocorticoides** ejercen dos tipos de funciones principales: las **moduladoras**, que tienen como finalidad alterar la respuesta del organismo frente a una situación estresante; y las **preparatorias**, cuya función es alterar la respuesta del organismo frente a una futura exposición a una situación estresante o ayudar en la adaptación a una situación de estrés crónico (ver revisión en Sapolsky *et al.*, 2000). Las funciones **moduladoras** se pueden subdividir en tres categorías: i) las **acciones permisivas** ejercen sus efectos gracias a los niveles de glucocorticoides presentes en el organismo antes de la situación estresante y posibilitan una respuesta inmediata y adecuada al estrés, independientemente de si existe o no un incremento en los niveles de glucocorticoides inducidos por la situación estresante. ii) las **acciones supresoras** tienen como finalidad prevenir las eventuales consecuencias negativas de una respuesta excesiva al estrés y, al contrario que las acciones permisivas, dependen de la magnitud de la liberación de glucocorticoides frente a una

situación estresante, apareciendo aproximadamente al cabo de una hora después del inicio del estímulo estresante. Entre estas acciones supresoras destacan los mecanismos de **retroinhibición negativa**, que se encargan de frenar la liberación masiva de ACTH y de glucocorticoides en respuesta a un estímulo estresante por parte del eje HPA. La acción de los glucocorticoides en la adenohipófisis, en el PVN y en estructuras extrahipotalámicas es crítica para volver a los niveles hormonales basales (Armario, 2006a). **iii)** las **acciones estimuladoras** son atribuibles al incremento en los niveles de glucocorticoides inducidos por la situación estresante y, a diferencia de las supresoras, tienen como finalidad potenciar los efectos de las hormonas liberadas durante la fase inicial de la respuesta al estrés. Siguen la misma dinámica temporal que las acciones supresoras y dependen de la magnitud de liberación de glucocorticoides. Finalmente, las **funciones preparatorias** no influyen sobre la respuesta inmediata a la situación estresante, sino que están destinadas a modular la respuesta a futuras situaciones estresantes.

Los glucocorticoides llevan a cabo las funciones anteriormente comentadas mediante efectos **genómicos** y **no genómicos** (ver revisión en de Kloet *et al.*, 1998, 2009; Haller *et al.*, 2008). Los efectos genómicos de los glucocorticoides se realizan mediante su unión a dos tipos de receptores intracelulares: el **receptor tipo I (receptor de mineralocorticoides, MR)** y el **receptor tipo II (receptor de glucocorticoides, GR)**. Éstos tienen una **afinidad**, una **distribución** en el SNC y un **mecanismo de acción** diferenciados entre sí que describiremos a continuación. Respecto a su **afinidad**, se ha demostrado que los MR tienen diez veces más afinidad por la corticosterona que los GR, implicando que, en condiciones basales, la gran mayoría de receptores MR se encuentran ocupados (ver revisión en Reul y de Kloet, 1985; de Kloet *et al.*, 1998). Por su parte, los GR presentan una gran afinidad por los glucocorticoides sintéticos como la dexametasona y su ocupación depende de la concentración plasmática de glucocorticoides, siendo su ocupación alta en la fase de máxima liberación de glucocorticoides del ritmo circadiano o en situaciones de estrés. Los GR se encuentran **distribuidos** de manera ubicua en el SNC. Además de su localización en las células corticotropas de la adenohipófisis, se

concentran en zonas clave para la activación del eje HPA como la mPFC, la FH, y el propio PVN. Por su parte, los MR tienen una localización mucho más específica, reduciéndose a estructuras como la mPFC, la FH y la amígdala (de Kloet, 1985). Cuando los glucocorticoides se unen a sus receptores, éstos sufren cambios y se trasladan al núcleo de la célula donde dimerizan y se unen a promotores de diferentes genes que expresan elementos de respuesta a glucocorticoides (del inglés, GRE) o GRE negativos (nGRE), actuando como activadores o inhibidores de la transcripción, respectivamente (Morsink *et al.*, 2006; Cain y Cidlowski, 2015). Además, los GR tienen la capacidad de interactuar con factores de transcripción tales como AP-1 y NFκB causando trans-represión.

Adicionalmente a estas acciones genómicas, existen evidencias acerca de acciones **no genómicas** de los glucocorticoides. Algunos de los efectos biológicos de los glucocorticoides son tan rápidos que no pueden ser mediados por sus acciones genómicas, que requieren de síntesis proteica. Se ha sugerido que dichas acciones podrían depender de receptores de membrana celular, algunos ligados a proteínas G, que en ocasiones son bloqueados por antagonistas MR o GR clásicos y en otros casos no (Makara y Haller, 2001; Haller *et al.*, 2008; ver revisión en Evanson *et al.*, 2010; Groeneweg *et al.*, 2012). Los GR de membrana tendrían una función inhibidora del PVN mediada por la neurotransmisión GABAérgica y los endocannabinoides, mientras que en el hipocampo los MR de membrana tendrían la función contraria, a través de la liberación pre-sináptica de glutamato y el aumento de la excitabilidad post-sináptica (ver revisión en Tasker *et al.*, 2006).

Clásicamente, se ha considerado que los mecanismos de retroinhibición pueden ser de dos tipos: **rápido** y **lento**. No obstante, Keller-Wood y Dallman (1984) apuntan la existencia de un tipo de retroinhibición **intermedio**, el cual correspondería a lo que los autores más clásicos catalogan como lento, en tanto que el lento, según su criterio, correspondería a situaciones donde existe una elevación crónica patológica o una administración prolongada (días) de glucocorticoides. Siguiendo la clasificación más clásica, la **retroinhibición rápida** empieza inmediatamente después de la liberación de

glucocorticoides y depende, únicamente, de la tasa de incremento de éstos en sangre, dejando de actuar una vez los niveles de glucocorticoides se estabilizan. Esta retroinhibición es incompatible con los receptores genómicos de los glucocorticoides dada la velocidad con la que se produce, por lo que se ha asociado a los receptores no genómicos aún sin describir. Pese al desconocimiento de los receptores implicados, existen evidencias que sugieren un papel de los endocannabinoides en el bloqueo de las señales estimuladoras aferentes al mpdPVN (Di *et al.*, 2003, 2009; Evanson *et al.*, 2010), además de un papel del óxido nítrico en el aumento de las señales GABAérgicas aferentes (Di *et al.*, 2009). Los efectos de la **retroinhibición lenta** suelen aparecer antes de los 60 minutos, pero se hacen más evidentes a las dos horas y pueden perdurar bastantes horas. En la retroinhibición lenta intervienen los receptores GR y MR y están implicados mecanismos genómicos que conducen a la inhibición de la expresión de los genes de CRH y AVP en el hipotálamo y de POMC en la hipófisis, tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés (ver revisión en Watts, 2005).

2.5. Dinámica de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes

Tras la exposición aguda a un estímulo estresante se pueden detectar cambios en todos los niveles del eje HPA, siendo fundamental el conocimiento de la dinámica temporal de dichos cambios.

En paralelo a la rápida liberación de la reserva disponible de CRH y otros factores hipotalámicos en la eminencia media y la consecuente liberación de ACTH por parte de la adenohipófisis, en el PVN se produce una **activación transcripcional** con el fin de restaurar la reserva de CRH en las neuronas parvocelulares del mpdPVN. Dicha activación transcripcional se puede medir mediante los niveles de transcrito primario del CRH (RNA heteronuclear, hnRNA). El hnRNA del CRH es una buena herramienta para el estudio de la respuesta central del eje HPA, ya que sus niveles son imperceptibles en condiciones basales y muestran un aumento pronunciado ya a los 5 minutos en respuesta a situaciones estresantes de diferente intensidad. La exposición a estímulos estresantes de intensidad moderada como la inmovilización en tubo (*restraint*) muestra un pico máximo

del hnRNA del CRH entre los 15 y 30 minutos posteriores al inicio del estímulo (Herman, 1992; Kovács y Sawchenko, 1996; Ma y Aguilera, 1999). Cuando el estímulo estresante es emocional, una vez alcanzado este pico y aunque el estímulo persista, los niveles de hnRNA del CRH irán disminuyendo de manera paulatina (Shepard *et al.*, 2005; Trnecková *et al.*, 2007). Sin embargo, con estímulos estresantes de carácter físico se pueden observar niveles elevados de hnRNA del CRH incluso 6 horas después del inicio del estímulo (Tanimura *et al.*, 1998). Por otra parte, los niveles de RNA mensajero (mRNA) del CRH sólo se elevan de manera consistente entre las 3 y 4 horas posteriores al inicio del estímulo estresante (revisión en Watts, 2005). Este incremento no suele ser sensible a estímulos estresantes de corta duración y/o baja intensidad debido a los altos niveles de mRNA de CRH ya presentes de manera constitutiva.

En la adenohipófisis, la ACTH se libera de manera muy rápida pudiéndose detectar claramente su respuesta a los 5 minutos del inicio del estímulo estresante. Si dicho estímulo perdura en el tiempo, se observará un pico máximo a los 15 minutos y éste se podría prolongar hasta una hora después del inicio del estímulo estresante (García *et al.*, 2000), disminuyendo paulatinamente hasta llegar casi a los niveles basales aunque el estímulo persista (Rivier y Vale, 1987; Garcia *et al.*, 2000). Los mecanismos por los que se produce esta disminución no están del todo establecidos, observándose dicha disminución incluso con la exposición a estímulos estresantes de elevada intensidad. Esta disminución es, en parte, debida a la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides en la adenohipófisis, pero también a la incapacidad de las células corticotropas de mantener una liberación tan elevada de ACTH de manera sostenida (Rivier y Vale, 1987; Martí y Armario, 1998).

La corticosterona sigue una dinámica temporal de liberación plasmática muy diferente de la ACTH. Si el estímulo es muy breve, se observará un pico máximo de respuesta alrededor de los 20 minutos mientras que, si el estímulo es prolongado, el pico se desplazará para alcanzar su máximo entre los 30 y 60 minutos posteriores al inicio del estímulo estresante (Dal-Zotto *et al.*, 2004).

2.6. *El eje HPA como marcador de la intensidad del estrés*

Sin tener en consideración la naturaleza y las características de los estímulos estresantes, un aspecto fundamental para el estudio del estrés es poder determinar la **intensidad** del estímulo estresante. Este factor es, a *priori*, fundamental para entender el impacto negativo del estrés sobre la conducta y la fisiología. Aunque numerosas variables fisiológicas se ven modificadas ante una situación estresante, sólo unas pocas lo hacen de manera proporcional a su intensidad. Por lo tanto, debemos enfatizar en la distinción entre variables que son marcadoras de estrés y aquellas que son **marcadoras de la intensidad del estrés** por tener una respuesta proporcional a la intensidad del estímulo estresante aplicado (Figura 3). Ejemplos de marcadores de la intensidad del estrés son los **niveles plasmáticos de catecolaminas** (en especial la A), las **hormonas del eje HPA**, la **PRL**, la **glucosa**, así como también la **reducción en la ingesta** en los días posteriores al estrés (Martí y Armario, 1998; Márquez *et al.*, 2002; Armario *et al.*, 2012).

Sin embargo, visto en detalle, cada uno de los marcadores biológicos de intensidad del estrés posee peculiaridades particulares respecto al grado de reactividad, dinámica temporal, saturación, capacidad de mantenimiento de la respuesta o dinámica de recuperación una vez finalizada la situación estresante. Conocer cada marcador en profundidad es muy importante para una correcta interpretación de los datos. Por ejemplo, la A, la ACTH y la PRL son variables muy sensibles a mínimas perturbaciones y presentan grandes variaciones en sus niveles plasmáticos. Sin embargo, la glucosa requiere un umbral elevado de intensidad de estrés para que se observen cambios consistentes (Armario, 2006b, 2012; Figura 3). Otra de las hormonas clave del eje HPA, la corticosterona, se considera un buen marcador de situaciones estresantes sólo cuando éstas son de intensidad baja o moderada debido a que la estereidogénesis se satura con niveles intermedios de ACTH. Por lo tanto, en situaciones de exposición a estímulos estresantes de intensidad elevada, los niveles plasmáticos de corticosterona no reflejan los niveles circulantes de ACTH (Kant *et al.*, 1983). Una solución al problema de la saturación es el seguimiento de los niveles hormonales del organismo durante el periodo post-estrés,

siendo la velocidad de recuperación de la respuesta de ACTH y corticosterona un buen método para discernir la intensidad del estímulo estresante (García *et al.*, 2000). De esta manera se pueden observar diferencias entre los estímulos de elevada intensidad (los choques eléctricos y la inmovilización en plancha) en los que se produce una saturación de la respuesta de ACTH (Márquez *et al.*, 2002).

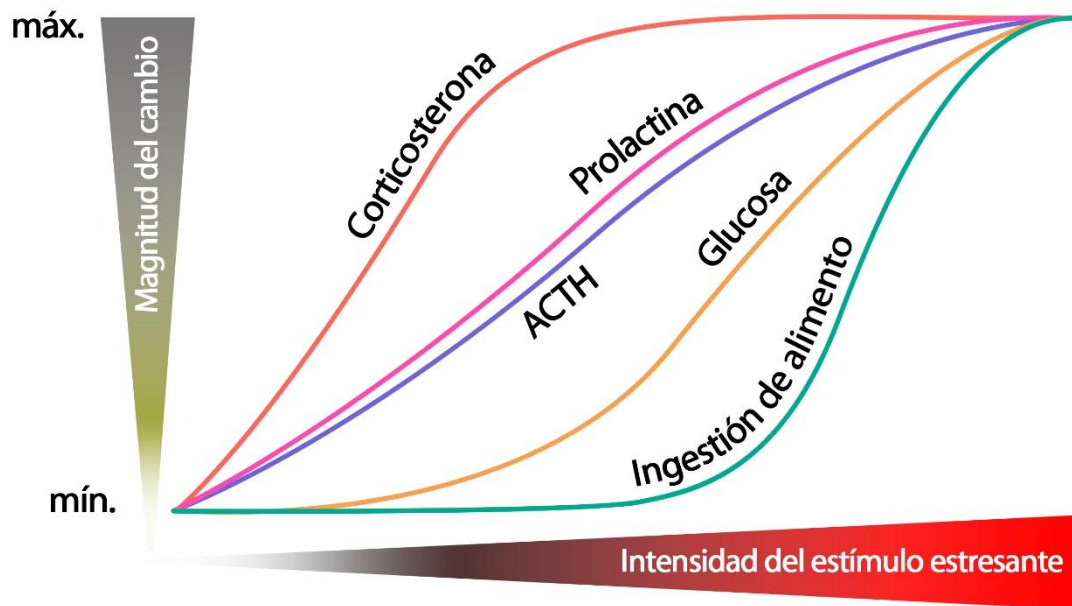


Figura 3. Representación esquemática de la respuesta de variables fisiológicas a distintas intensidades de estrés (Armario *et al.*, 2002).

3. Genes de expresión temprana

La estimulación neuronal desencadena dos procesos diferentes: cambios electrofisiológicos que permiten procesar y transmitir de manera inmediata la información correspondiente al estímulo; y cambios en las cascadas de segundos mensajeros que implican la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de diferentes genes y pueden alterar la respuesta de las neuronas a estímulos posteriores. Los factores de transcripción juegan un papel crítico en el desarrollo y funcionamiento del SNC, en las respuestas adaptativas del SNC a cualquier tipo de estímulo, y en la aparición de cambios conductuales.

Los **genes de expresión temprana** (IEG de sus siglas en inglés, “*immediate early genes*”) son genes que se activan de manera rápida, transitoria y no requieren de síntesis proteica previa debido a la presencia de factores de transcripción preexistentes en la célula no estimulada, que se conocen como **factores de transcripción constitutivos** (CTF de sus siglas en inglés, “*constitutive transcription factors*”) (ver revisión en Herdegen y Leah, 1998). Los IEG codifican para proteínas funcionalmente distintas como proteínas de liberación, enzimas citoplasmáticas y factores de transcripción (Nedivi *et al.*, 1993). Éstos últimos se han clasificado como **factores de transcripción inducibles** (ITF de sus siglas en inglés, “*inducible transcription factors*”) para diferenciarlos de sus homólogos de expresión constitutiva.

Uno de los ITF mejor caracterizados es el **proto-oncogen *c-fos*** que, por sus características, resulta una herramienta muy valiosa para el estudio de la activación del SNC frente a diferentes estímulos (Sheng y Greenberg, 1990). Desde una perspectiva histórica, dicho gen fue aislado en 1982 como el oncogen del virus del osteosarcoma de ratón Finkel-Biskis-Jiskins y, poco después, fue descrito su homólogo celular *c-Fos* (ver revisión en Herdegen y Leah, 1998). La proteína codificada por este gen (***c-Fos***) dimeriza con proteínas de la familia ***c-Jun***, formando el complejo de transcripción **proteína activadora 1 (AP-1)**. Dicho complejo está involucrado en la regulación de la expresión de un gran número de genes que cuentan, entre su promotor, con un sitio de unión AP-1 (AP-1RE). La expresión de *c-fos* puede inducirse por múltiples factores como, por ejemplo, factores neurotróficos, neurotransmisores, despolarización e incrementos en el Ca^{2+} intracelular (Herrera y Robertson, 1996; Herdegen y Leah, 1998). Esta activación del gen de *c-fos* es regulada por un promotor complejo que consta de diferentes elementos como son el elemento de respuesta al suero (SRE), AP-1RE y el elemento de respuesta al calcio (CRE) (Ginty *et al.*, 1994).

La inducción de *c-fos* es transitoria y existen mecanismos que reprimen, actuando a diferentes niveles, dicha inducción, para lo cual se requiere de síntesis proteica (Morgan

y Curran, 1991; ver revisión en Herdegen y Leah, 1998). Los GR suprimen la actividad del promotor de *c-fos* uniéndose directamente al SRE localizado en el promotor.

La eficacia en la expresión de *c-fos* puede ser regulada mediante la degradación de su mRNA debido a la presencia de ARE (*AU-rich element*) en la región 3' de su transcrito, confiriéndole una vida media de aproximadamente 15 minutos (Shyu *et al.*, 1989; ver revisión en Herdegen y Leah, 1998; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002). Igualmente, los niveles de la proteína vienen regulados por su degradación: durante las dos primeras horas, *c-Fos* muestra una rápida degradación con una vida media de la proteína de aproximadamente 45 minutos. A partir de ese momento, la degradación se torna más lenta y la estabilidad de la proteína *c-Fos* aumenta, alcanzando una vida media de entre 90 y 120 minutos. Dicho aumento en la estabilidad coincide con el momento en el que la síntesis de proteína *c-Fos* ha concluido y aproximadamente el 90% de moléculas de *c-Fos* están asociadas a proteínas Jun (Kovary y Bravo, 1991a, 1991b). En concreto, la degradación de la proteína *c-Fos* es dependiente de la formación de dímeros *c-Jun:c-Fos* (Papavassiliou *et al.*, 1992). Es importante destacar que, debido a la rápida síntesis de proteínas *c-Fos* y al incremento tardío de los niveles de *c-Jun* tras la estimulación, aparece una ventana libre de proteínas Jun en la que las proteínas de *c-Fos* pueden formar heterodímeros con GR y otros factores de transcripción (ATF-2, ATF-2, CBP, p65), afectando a la expresión génica en el periodo más sensible inmediatamente posterior a la activación celular (ver revisión en Herdegen y Leah, 1998).

3.1. *c-fos* como marcador de activación neuronal

La expresión de *c-fos* se considera una buena herramienta de cartografía anatómica-funcional para identificar circuitos activados frente a una gran variedad de estímulos (ver revisión en Hoffman y Lyo, 2002). Gracias a su rápida inducción y su débil expresión en condiciones basales (Kovács, 1998; Armario, 2006a), la expresión de *c-fos* ha sido clave en el estudio del estrés, permitiendo conocer cómo el SNC responde y procesa la información concerniente a diferentes tipos de estímulos estresantes (ver revisión en Imaki *et al.*, 1995a; Kovács, 1998; Sawchenko *et al.*, 2000),

Pese a ser una herramienta muy potente, el uso de *c-fos* tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, no debe equipararse la expresión de *c-fos* con el incremento en la **actividad electrofisiológica** de las neuronas ya que, pese a que ambos procesos pueden ir de la mano, algunas veces pueden disociarse, observándose despolarización sin expresión de *c-fos* (Luckman *et al.*, 1994). Además, la despolarización *per se* no es suficiente para inducir la expresión de *c-fos*, necesitando la actuación de cascadas de segundos mensajeros (Robertson *et al.*, 1995). Por consiguiente, no podemos afirmar con total seguridad que un área concreta no participe en el procesamiento de un estímulo estresante valorando únicamente la ausencia o presencia de *c-fos*. Una solución podría ser la utilización de otros IEG con patrones de expresión complementarios (Herdegen *et al.*, 1995; ver revisión en Senba y Ueyama, 1997). Por ejemplo, se ha demostrado tras una exposición a la natación forzada que la expresión de *zif268* es detectable en diversos núcleos donde no se observa expresión de *c-fos* (Cullinan *et al.*, 1995).

Una segunda limitación del *c-fos* deriva de su **dinámica de expresión**. La exposición aguda a un estímulo estresante emocional incrementa los niveles de mRNA de *c-fos*, alcanzando su pico máximo de expresión entre los 30 y 60 minutos posteriores al inicio del estímulo estresante si se mantiene la exposición a la situación, mostrando una reducción paulatina de sus niveles aunque la exposición persista. Sin embargo, la proteína c-Fos muestra su pico máximo de expresión a las 2 horas y sus niveles disminuyen progresivamente hasta alcanzar los niveles basales pasadas 4 horas (Imaki *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1994; Umemoto *et al.*, 1997; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002; Trneckova *et al.*, 2007; Marín-Blasco *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando el estímulo estresante es de carácter sistémico como la administración de endotoxinas (Rivest y Laflamme, 1995) o la hipovolemia (Tanimura y Watts, 2000), se pueden detectar niveles sostenidos de transcripción de *c-fos* (de 3 a 6 horas). Por lo tanto, el uso de *c-fos* es apropiado para el estudio de la activación causada por estímulos estresantes agudos de corta duración (de minutos a pocas horas). No obstante, en la naturaleza los organismos pueden verse expuestos a situaciones donde el estímulo estresante perdura en el tiempo o se repite. Por lo tanto, una alternativa si se quiere valorar la respuesta de ciertas áreas a un estímulo

estresante crónico, es el uso de IEG con una vida media más larga. Este es el caso del gen *fosB*, que codifica las proteínas FosB y su variante truncada Δ Fos-B (ver revisión en Herdegen y Leah, 1998). Dicha variante se mantiene estable en el rango de días, provocando su acumulación tras la estimulación repetida. Esta cualidad podría contribuir a identificar neuronas que sufren cambios tardíos y a largo plazo, siendo de mucha utilidad en el estudio de los efectos del estrés crónico (Perrotti *et al.*, 2005).

Una tercera limitación del uso de *c-fos* como marcador de activación neuronal es que no identifica el **fenotipo** de las neuronas activadas. Esta limitación queda solventada con el uso de dobles marcajes, combinando la detección de *c-fos* con otros marcadores neuronales que revelen la identidad de las neuronas activadas (Rotllant *et al.*, 2010).

3.2. *Aplicación de los IEG en el estudio del estrés*

El análisis de los datos de expresión de *c-fos* mediante técnicas de hibridación *in situ*, inmunohistoquímicas u otras aproximaciones experimentales, ha permitido clasificar los diferentes estímulos estresantes en dos grandes categorías: sistémicos o emocionales (ver revisión en Imaki y Shibasaki, 1995; Herman y Cullinan, 1997; Sawchenko *et al.*, 2000; Pacak y Palkovits, 2001; Herman *et al.*, 2003). Centrándonos en el núcleo efector del eje HPA, el PVN, tanto la exposición a estímulos estresantes sistémicos (Interleukina 1 β , IL-1 β ; Ericsson *et al.*, 1994) como a estímulos estresantes emocionales (choques eléctricos en las patas; Imaki *et al.*, 1993; Li y Sawchenko, 1998) inducen la expresión de *c-fos* (mRNA o proteína), compartiendo ambas tipologías de estímulos la activación de dicho núcleo. Sin embargo, más allá del núcleo efector del eje HPA, los patrones de activación neuronal en el SNC inducidos por estímulos estresantes sistémicos y emocionales presentan notables diferencias (Ver Introducción, Capítulo 4 y revisiones en Sawchenko, 2000; Armario, 2006b).

Los **estímulos estresantes sistémicos** activan un número limitado de áreas que varían en función del estímulo (Pacak y Palkovits, 2001). Entre éstas, se encuentran estructuras límbicas como el BNST y la CeA; áreas del tronco del encéfalo como el núcleo lateral

parabraquial, el NTS y la médula ventrolateral; y órganos circunventriculares, siendo todas ellas críticas en la regulación autonómica central. En cambio, los **estímulos estresantes emocionales** (v.g. *restraint*, natación forzada, olor al depredador, inmovilización en plancha) tienen un patrón de activación neuronal muy parecido entre ellos, incluso cuando estos estímulos difieren enormemente tanto en intensidad como en cualidad (ver revisión en Sawchenko, 2000; Armario 2006b). En este sentido, la exposición a estímulos estresantes emocionales o predominantemente emocionales muestran una marcada expresión de *c-fos* en la mPFC, en áreas límbicas subcorticales como el LS, el BNST y la amígdala; y en núcleos del tronco encefálico como la sustancia gris periacueductal (PAG) y el *locus coeruleus* (LC) (Cullinan *et al.*, 1995; Campeau *et al.*, 1997; Stamp y Herbert, 1999; Day *et al.*, 2004; Ons *et al.*, 2004).

Para comprender los mecanismos mediante los cuales el SNC procesa los estímulos estresantes emocionales, debemos responder al menos a dos cuestiones importantes (Armario, 2006b): (1) ¿Por qué en la mayoría de áreas del SNC la inducción de *c-fos* parece ser independiente de la intensidad del estímulo, y sólo en unas pocas áreas dicha inducción es sensible a la intensidad del estímulo? (2) ¿Por qué estímulos de características diferentes inducen *c-fos* en las mismas áreas?

Son pocos los trabajos que han abordado claramente cómo afectan la intensidad o la cualidad de los estímulos estresantes emocionales en el patrón de expresión de *c-fos* en el SNC. Campeau y colaboradores estudiaron el efecto de diferentes intensidades de ruido (Campeau y Watson, 1997). Niveles de ruido (60 dB) que no incrementaron los niveles de ACTH y corticosterona sí que indujeron expresión de *c-fos* en áreas corticales, núcleos talámicos y la amígdala basolateral (BLA). Estas áreas no mostraron un incremento adicional en la expresión de *c-fos* en respuesta a los niveles de ruido más elevados (105 dB), que si causaban activación del eje HPA. Sin embargo, áreas como el LSv, el núcleo Accumbens (Acb), algunas subdivisiones del BNST y el mpdPVN mostraron una activación dependiente de la intensidad del estímulo estresante, observándose una menor inducción de *c-fos* con niveles de ruido de 90 dB en comparación con niveles de ruido

más elevados (105 dB). Estos resultados sugieren que sólo un número restringido de áreas del SNC parecen reflejar la intensidad del estímulo estresante. Apoyando estos datos, otros estudios han evaluado la expresión de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes emocionales que difieren en intensidad (Ons *et al.*, 2004; Pace *et al.*, 2005; Rotllant *et al.*, 2013; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018), sugiriendo que la expresión de *c-fos* puede seguir tres patrones de activación neuronal diferentes: (a) una marcada activación de *c-fos* independiente de la intensidad del estímulo estresante; (b) una activación proporcional a la intensidad del estímulo estresante; y (c) una activación inversamente proporcional a la intensidad del estímulo estresante. Así, la expresión de *c-fos* en respuesta a un estímulo estresante leve (campo abierto) es similar a la obtenida con un estímulo estresante de mayor intensidad (inmovilización en plancha) en áreas como la subdivisión prelímbica de la mPFC (PrL), la región *Shell* del Acb (AcbSh) y la MeA, mientras que áreas como el LS, el mpdPVN y el LC responden de manera proporcional a la intensidad del estímulo (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013). Además, Pace y colaboradores (2005) observaron, en respuesta a estímulos de intensidad diferente, un paralelismo entre los cambios hormonales y la expresión de *c-fos* en el mpdPVN, mientras que en el hipocampo y las cortezas somatosensorial y motora se encontró un patrón opuesto, siendo el estímulo estresante más intenso el que menor activación causó. Los resultados de estos últimos autores están en consonancia con datos de nuestro laboratorio (Úbeda-Contreras *et al.*, 2018).

Por qué estímulos emocionales de características diferentes inducen *c-fos* en las mismas áreas indicaría que las neuronas activadas no discriminarían entre diferentes estímulos estresantes emocionales (Armario, 2006b). Es probable que la activación esté reflejando un estado de activación general o *arousal*. Apoyando esta afirmación, algunas áreas muestran activación tras la manipulación del animal (*handling*) o la exposición a ambientes nuevos implícita en determinados estímulos estresantes (v.g. caja donde se aplica el choque eléctrico), independientemente del estímulo presentado posteriormente (ver revisión en Kovács, 1998). Serían ejemplos de este patrón de activación algunos núcleos talámicos y de la amígdala, así como áreas corticales y subcorticales. (ver revisión

en Cullinan *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Campeau y Watson, 1997; Kollack-Walker *et al.*, 1997). No obstante, pese a la existencia de una activación generalizada, podrían existir otras neuronas que responderían de manera específica en respuesta a un determinado estímulo estresante emocional.

Algunos estudios recientes han caracterizado, mediante técnicas optogenéticas, las poblaciones neuronales que responden de manera específica a estímulos con valencia negativa (estresantes) respecto a otros de valencia positiva (apetitivos), habiéndose demostrado que diferentes grupos de neuronas mediarían las respuestas de estímulos con valencia negativa respecto a positiva en áreas como la amígdala cortical (Root *et al.*, 2014) y la amígdala basolateral, BLA (Gore *et al.*, 2015; Namburi *et al.*, 2015), sugiriendo cierta especificidad neuronal en respuesta a diferentes tipos de estímulos. En nuestro laboratorio y siguiendo la línea de estos autores, Marín-Blasco y colaboradores (2017) hemos abordado la caracterización de las neuronas activadas específicamente por diferentes estímulos estresantes emocionales tratando de responder a las siguientes preguntas: (i) ¿la respuesta a un determinado estímulo estresante emocional implica la activación de poblaciones neuronales específicas?; y (ii) ¿el grado de especificidad de estas neuronas podría ser dependiente del área analizada y su jerarquía en el procesamiento de los estímulos estresantes?. Se observó que, en **áreas cerebrales jerárquicamente superiores** como la mPFC, el LS y la MeA, existen neuronas activadas de manera específica para cada estímulo estresante, aunque la mayoría son activadas por ambos. Sin embargo, en **estructuras jerárquicamente inferiores** (mpdPVN) todas las neuronas se activan de manera inespecífica. La activación de neuronas específicas para cada estímulo estresante emocional podría explicar las diferencias en las consecuencias funcionales de la exposición a diferentes estímulos estresantes emocionales.

4. Vías de procesamiento central de los estímulos estresantes

La respuesta neuroendocrina de estrés es un proceso muy regulado que incluye la integración de una gran variedad de modalidades de información sensorial con la finalidad tanto de activar rápidamente la liberación de glucocorticoides como de

detenerla. Independientemente de la naturaleza del estímulo estresante, la información procesada converge en el PVN, dando lugar a la activación de un grupo específico de neuronas del mpdPVN. Como se ha mencionado previamente, las áreas del SNC implicadas en el procesamiento del estrés dependen de la tipología del estímulo estresante (Ver Introducción, Capítulo 3.2; Pacák y Palkovits, 2001; Sawchenko *et al*, 2000; Kovács *et al*, 2005). Los **estímulos estresantes sistémicos**, representan una amenaza real y directa para la homeostasis del organismo, requiriendo una activación rápida del eje HPA. En este caso, las áreas implicadas proyectan de manera **directa** al PVN (v.g. NTS; órganos circunventriculares; núcleo arqueado del hipotálamo, ARC; hipotálamo lateral, LH; ver Figura 4). Los **estímulos estresantes emocionales** se caracterizan por generar una respuesta anticipatoria del eje HPA ante posibles situaciones amenazantes. La respuesta neuroendocrina ante estos estímulos se origina a través de proyecciones multisinápticas desde estructuras telencefálicas hasta el mpdPVN. Las regiones críticas en respuesta a estímulos estresantes emocionales son la mPFC, la FH, el LS y la amígdala (ver revisión en Herman *et al*, 2003, 2005). Estas estructuras **no proyectan de manera directa** al PVN y la información requiere de un relevo en estructuras con proyecciones directas como las comentadas anteriormente (Figura 5).

4.1. Proyecciones directas al PVN

El procesamiento de los estímulos sistémicos se orquesta, en su mayoría, a través de los sistemas catecolaminérgicos del tronco del encéfalo (Ver Figura 4; Herman *et al*, 2003; Ulrich-Lai y Herman, 2009). El NTS o **región A2/C2** y el **bulbo ventrolateral** o **región A1/C1** son lugares críticos para procesar los estímulos estresantes sistémicos (v.g. hemorragia, infección, hipovolemia). En ambos núcleos se originan aferencias excitatorias (predominantemente adrenérgicas y noradrenérgicas) que proyectan de manera directa al PVN. Por otra parte, la información relacionada con el **estado osmótico** del organismo (v.g. presión osmótica y balance de electrolitos) es recogida por los **órganos circunventriculares** (órgano subfornical, SFO; núcleo preóptico medial, MePO; órgano vasculoso de la lámina terminal, OVLT). Estas áreas están desprovistas de

barrera hematoencefálica, característica que les permite evaluar con precisión el estado osmótico del organismo y enviar proyecciones al PVN para inducir la respuesta del eje HPA ante posibles desajustes. La información relativa al **balance energético** puede transmitirse al PVN gracias al núcleo ARC y al hipotálamo lateral (LH) que contienen neuronas sensibles a los niveles circulantes de glucosa, leptina e insulina (Woods *et al*, 1998).

Diversas **regiones hipotalámicas** como el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH) o el área preóptica medial (mPOA) envían aferencias directas tanto GABAérgicas (Roland y Sawchenko, 1993) como glutamatérgicas (Ziegler *et al*, 2002) al PVN, participando tanto en la activación como en la inhibición del eje HPA. Además, existe una población de neuronas GABAérgicas situadas en las proximidades del PVN, denominada **peri-PVN**, que envía sus proyecciones de manera directa a dicho núcleo y parece tener un papel dual en la regulación de la actividad del eje HPA (Boudaba *et al*, 1996): la activación de esta estructura implicaría una inhibición del eje HPA, mientras que la inhibición de estas neuronas se traduciría en una activación del eje HPA (Cole y Sawchenko, 2002).

Finalmente, una estructura crítica en la regulación del estrés es el BNST y sus efectos sobre el eje HPA dependen de la subdivisión concreta de dicho núcleo (Choi *et al.*, 2007). Se ha sugerido que la subdivisión anterior del BNST (aBNST) tendría un efecto activador sobre el eje HPA, mientras que la subdivisión posterior del BNST (pBNST) tendría un efecto inhibitor. En este sentido, se ha demostrado que las lesiones en la aBNST disminuyen los niveles de mRNA del CRH, mientras que lesiones en la pBNST los incrementan (Herman *et al.*, 1994).

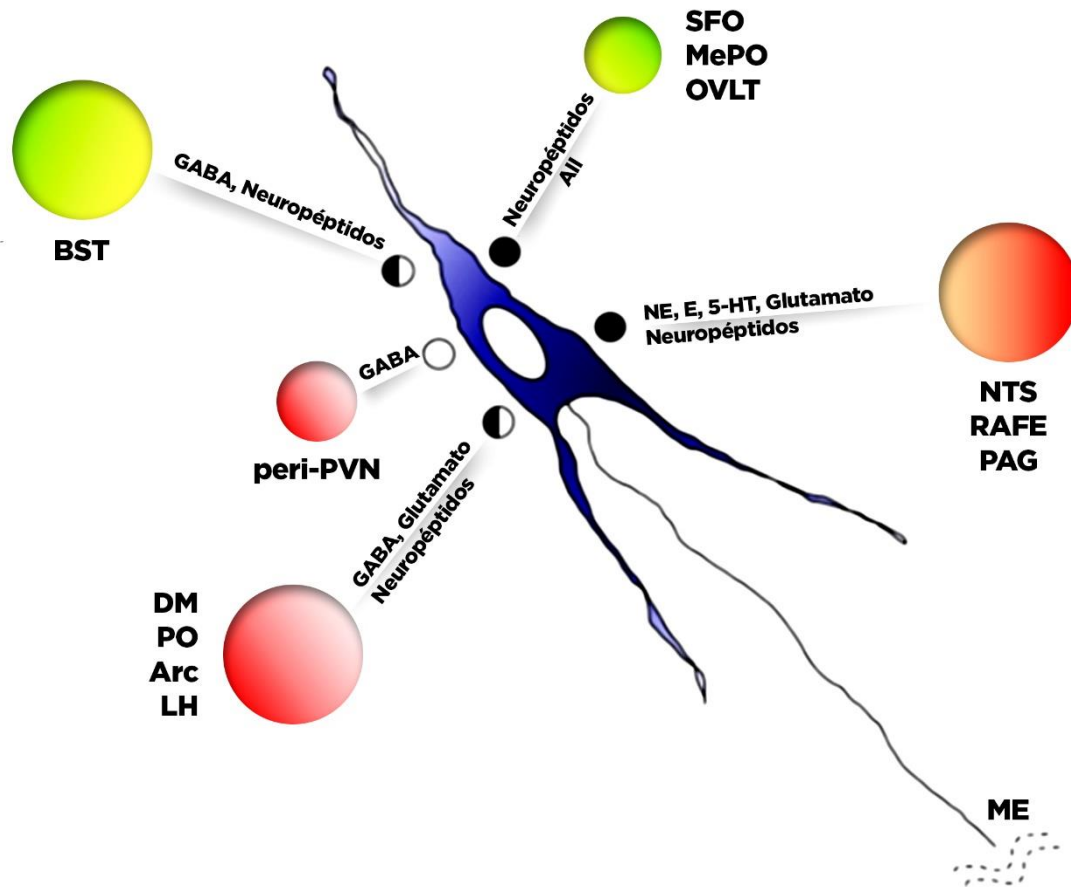


Figura 4. Principales vías de proyección directa a las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Los círculos negros indican la naturaleza activadora de las proyecciones, los círculos blancos indican la naturaleza inhibitoria de las proyecciones. **Abreviaturas:** Arc: Núcleo arqueado del hipotálamo; BST: Núcleo del lecho de la estría terminal; DMH: Núcleo dorsomedial del hipotálamo; LH: Hipotálamo lateral; ME: Eminencia media; MePO: Núcleo preóptico medial; NTS: Núcleo del tracto solitario; OVLT: Órgano vasculoso de la lámina terminal; PAG: Sustancia gris periacueductal; peri-PVN: región peri-PVN; mPOA: Área preóptica medial; SFO: Órgano subfornical (Adaptado de Herman *et al.*, 2003).

4.2. *Proyecciones indirectas al PVN*

El procesamiento de los estímulos estresantes emocionales se sitúa en áreas del SNC jerárquicamente superiores como la mPFC, la FH, el LS, la amígdala o el núcleo paraventricular del tálamo (PVTh). Éstas se caracterizan por no tener conexión directa con el PVN y requieren de un relevo en estructuras que sí tienen conexión directa (ver Figura 5; ver revisión en Herman *et al.*, 2003; 2005).

La mPFC parece tener un papel complejo en la modulación del eje HPA. Por ejemplo, la mPFC no parece tener ningún efecto sobre los niveles basales del eje HPA, pero sí lo tiene en situaciones de estrés. Algunos autores apuntan a que el papel de la mPFC podría ser dependiente de la subdivisión estudiada (Jankord y Herman, 2008; Radley, 2012), con posibles diferencias sustanciales entre la subdivisión prelímbica (PrL) y la infralímbica (IL). Concretamente, la PrL jugaría un **papel inhibitor** del eje HPA a través de señales estimuladoras a estructuras como el pBNST y el peri-PVN, cuyas proyecciones GABAérgicas terminarían por inhibir el PVN (Radley *et al.*, 2009). Las lesiones en la PrL aumentan la expresión de mRNA de CRH y los niveles hormonales del eje HPA en respuesta a estímulos estresantes emocionales (*restraint*) sin afectar la respuesta a los sistémicos (Diorio *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 2003; Radley, 2006), mientras que su estimulación inhibe la activación del eje HPA ante estímulos estresantes emocionales (Jones *et al.*, 2011). Por otra parte, la IL parece desempeñar un **papel activador** del eje HPA gracias a las señales estimuladoras que harán relevo en estructuras como el aBNST, la CeA o el NTS, que a su vez envían proyecciones activadoras al mpdPVN (ver revisión en Herman *et al.*, 2005; Jankord y Herman, 2008; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Los estudios con lesiones de la subdivisión IL sugieren un papel estimulador sobre el eje HPA ya que disminuyen la expresión de mRNA de CRH en el PVN y la actividad hormonal del eje HPA ante estímulos emocionales (Radley *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2009). De lo anteriormente expuesto se deduce que las cortezas PrL e IL tendrían un efecto opuesto sobre la integración de los estímulos estresantes emocionales y su posterior efecto sobre el eje HPA.

La FH es una estructura con un papel inhibitor de la actividad del PVN. Dicha estructura contiene una gran abundancia de MR y GR (Reul y De Kloet, 1985), característica que la relaciona con la retroinhibición mediada por los glucocorticoides (ver revisión en Jacobson y Sapolsky, 1991; Herman y Cullinan, 1997). Algunos autores constatan que las lesiones en la FH producen una prolongación de la liberación de ACTH y corticosterona en respuesta a diferentes estímulos estresantes emocionales como el *restraint*, la estimulación acústica o la exposición a un ambiente nuevo (ver revisión en Herman *et al.*, 2005). No obstante, esta secreción prolongada no se observa tras la exposición a estímulos estresantes sistémicos como la hipoxia o la exposición a éter, sugiriendo la implicación de la FH en la modulación del eje HPA sólo en respuesta a estímulos estresantes emocionales. La FH regula la respuesta del eje HPA en gran parte gracias a un número restringido de neuronas, principalmente glutamatérgicas, situadas en el **subiculum ventral (vSUB)**, que es la principal vía de salida de la información de la FH hacia el hipotálamo. Las neuronas glutamatérgicas del vSUB proyectan a estructuras GABAérgicas como el BNST, el mPOA y otras estructuras hipotalámicas como el peri-PVN, las cuales a su vez proyectan al PVN (Mueller *et al.*, 2006; Jankord y Herman, 2008). Otros autores sugieren que la FH controlaría la actividad del PVN a través de conexiones multisinápticas que podrían incluir el LS, estructura que proyecta hacia la región peri-PVN además de otras estructuras hipotalámicas con conexión directa al PVN (ver revisión en Herman, 2003). En conjunto, todos los datos parecen indicar un papel inhibitor del vSUB sobre el eje HPA en respuesta a estímulos estresantes emocionales.

Otra estructura implicada en la regulación del eje HPA es el LS. Las neuronas del LS resultan claramente activadas por estímulos estresantes emocionales como el ambiente nuevo, la exposición a un depredador o la interacción social, mostrando una menor activación con la exposición a estímulos estresantes sistémicos (ver revisión en Herman *et al.*, 2003). La mayoría de neuronas de esta estructura son principalmente GABAérgicas (Risold y Swanson, 1997) y proyectan a regiones con conexión directa al PVN como la región peri-PVN, el hipotálamo anterior, el mPOA y el LH que son áreas con proyecciones directas al mpdPVN, quedando en una posición privilegiada para para

regular tanto la activación como la inhibición del eje HPA, dependiendo de si en las áreas mencionadas las poblaciones neuronales son GABAérgicas o glutamatérgicas (ver revisión en Herman, 2003). Clásicamente, se le ha otorgado al LS un papel inhibitorio del eje HPA (ver revisión en Herman *et al.*, 2003; Singewald *et al.*, 2011), habiéndose demostrado que lesiones tanto electrolíticas como excitotóxicas del LS provocan una potenciación de la respuesta neuroendocrina del eje HPA en respuesta a la natación forzada sin que se vean afectados los niveles basales de hormonas (ver revisión en Herman *et al.*, 2003; Singewald *et al.*, 2011). Se ha sugerido que dicha inhibición del eje HPA por parte del LS estaría mediada por las proyecciones serotoninérgicas provenientes del Rafe que actuarían en los receptores septales, 5-HT_{1A} (Singewald *et al.*, 2011). Así, la administración local de agonistas 5-HT_{1A} provoca una reducción de la respuesta del eje HPA en respuesta a la natación forzada, mientras que la administración de antagonistas tendría el efecto contrario. En base a estudios con trazadores anterógrados y retrógrados se han propuesto dos vías alternativas por las cuales el LS podría inhibir la actividad del eje HPA: i) las eferencias GABAérgicas del LS harían relevo en neuronas excitadoras del hipotálamo posterior con conexión directa al PVN, y ii) interneuronas del LS inhibirían la actividad de las neuronas de proyección GABAérgicas del LS con proyección a estructuras GABAérgicas con conexión directa con el PVN como el peri-PVN, la mPOA y el BNST (Singewald *et al.*, 2011; Myers *et al.*, 2014; 2015). No obstante, recientemente se ha demostrado un papel estimulador del LS sobre el mpdPVN y, por lo tanto, sobre el eje HPA (Anthony *et al.*, 2014). La activación de un subgrupo de neuronas del LS que expresan CRHR₂ intervendrían no sólo en la activación del eje HPA, sino también en el aumento de la ansiedad producido por el estrés. Estos datos son más concordantes con la relación positiva que se observa normalmente entre la activación del septum lateral ventral (LSv) y la activación del eje HPA (Burow *et al.*, 2005; Armario 2006b; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018).

La **amígdala** parece jugar un papel activador de la respuesta del eje HPA. Esta estructura está conformada por numerosos núcleos con funciones en parte diferenciadas. La MeA y la CeA son un ejemplo del papel diferencial de los distintos núcleos de la amígdala en

respuesta a diferentes tipos de estímulos estresantes. Así, la MeA estaría relacionada con la respuesta frente a estímulos estresantes emocionales, mientras que la CeA se ha asociado con la respuesta a estímulos estresantes sistémicos (Dayas *et al.*, 1999, 2001; Sawchenko *et al.*, 2000). La activación del eje HPA vendría dada por eferencias GABAérgicas que harían relevo en estructuras de proyección hacia el mpdPVN, también GABAérgicas. La MeA envía eferencias inhibitoras a estructuras como el pBNST, el mPOA o el peri-PVN, provocando una desinhibición trans-sináptica. De manera similar, la CeA envía proyecciones inhibitoras al aBNST y, en menor medida al DMH. Además, neuronas de proyección GABAérgicas de la CeA hacen sinapsis con interneuronas inhibitoras del NTS, provocando una desinhibición de las proyecciones estimuladoras del NTS al mpdPVN (ver revisión en Herman *et al.*, 2005; Jankord y Herman, 2008; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Finalmente, el complejo basolateral de la amígdala (BLA) está relacionado con la respuesta a estímulos estresantes emocionales, aunque lesiones en esta estructura no afectan la actividad del eje HPA en respuesta a la exposición aguda a estímulos estresantes (Feldman *et al.*, 1994). El complejo BLA consiste, mayoritariamente, en neuronas de proyección glutamatérgicas que ejercen sus efectos a través de conexiones con otros núcleos amigdalinos como la CeA y la MeA (ver revisión en Jankord y Herman, 2008; ver revisión en Janak y Tye, 2015). Además, la BLA también envía proyecciones hacia el BNST y a otros núcleos que proyectan al mpdPVN, sugiriendo una posible interacción con el mpdPVN independiente de otros núcleos de la amígdala (ver revisión en Jankord y Herman, 2008). El complejo BLA, a pesar de no estar involucrado en la regulación de la respuesta aguda al estrés, podría estar relacionado con la facilitación del eje HPA ante estímulos heterotípicos (ver más adelante) tras un historial previo de estrés crónico (Bhatnagar *et al.*, 2004; Grissom y Bhatnagar, 2011).

Diversos **núcleos del tálamo** también se han relacionado con la regulación del eje HPA, habiéndose observado en núcleos talámicos la inducción de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes de tipo emocional y sistémico (Cullinan *et al.*, 1995; Emmert y Herman, 1999). De entre estos núcleos cabe destacar el papel del **núcleo paraventricular del tálamo (PVTh)** en la integración de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes repetidos

diariamente (Bhatnagar y Dallman, 1998; Jaferi y Bhatnagar, 2006). Dicho núcleo recibe numerosas aferencias desde áreas sensibles al estrés como el vSUB, la mPFC, el BNST, el NTS, el Rafe y el núcleo parabraquial. El PVTh, a su vez, envía proyecciones a la mPFC, la CeA y la BLA, las cuales son capaces de modular la actividad del eje HPA (ver revisión en Herman *et al.*, 2003). Tras una exposición repetida a un estímulo estresante se pueden observar dos fenómenos: i) **habitación o adaptación**, que se caracteriza por una disminución de la respuesta del eje HPA ante repetidas exposiciones al mismo estímulo estresante (homotípico); y ii) **facilitación o sensibilización**, en el que la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante diferente (heterotípico) se ve potenciada. Se postula que el PVTh es un área donde la corticosterona ejerce retroinhibición negativa durante exposiciones repetidas al estímulo estresante homotípico, siendo clave para la habituación a dicho estímulo. Así, se ha demostrado que la administración diaria de corticosterona en animales expuestos a 8 días seguidos de *restraint* potencia la habituación a dicho estímulo (Jaferi y Bhatnagar, 2006). Además, la administración de antagonistas de GR y MR durante los 7 primeros días, bloquea la habituación al *restraint*. Respecto al papel del PVTh en la facilitación del eje HPA a un estímulo estresante heterotípico, se ha demostrado que en animales con lesiones en la parte posterior de dicho núcleo no se observa facilitación tras estrés crónico, sugiriendo que la parte posterior del PVTh sería la responsable del fenómeno de la facilitación (Bhatnagar y Dallman, 1998). En conjunto, el PVTh intervendría en la inhibición del eje HPA a estímulos estresantes homotípicos gracias a la acción de la corticosterona liberada durante la exposición repetida al estrés y también participaría, a través del circuito PVTh – amígdala – PVN, en la sensibilización de la respuesta del eje HPA en respuesta a la exposición a un estímulo estresante heterotípico.

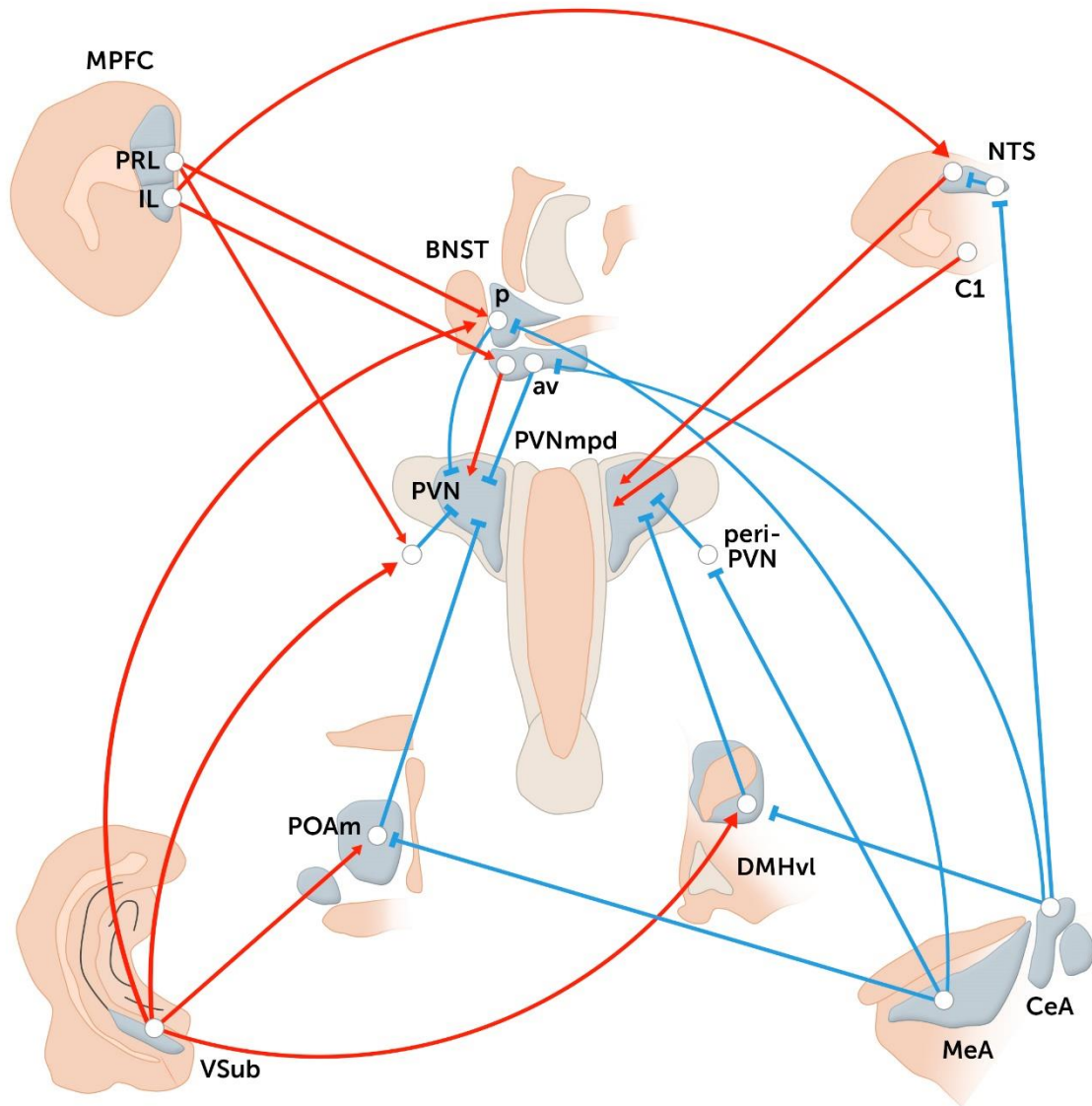


Figura 5. Principales proyecciones indirectas hacia las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Las líneas rojas representan proyecciones excitadoras y las líneas azules representan proyecciones inhibitorias. Abreviaturas: **BNST**, *bed nucleus of the stria terminalis*; **C1**: bulbo ventrolateral o región A1/C1; **CeA**: amígdala central; **vDMH**: subdivisión ventrolateral del hipotálamo dorsomedial; **IL**: subdivisión infralímbica de la mPFC; **MeA**: amígdala medial; **NTS**: núcleo del tracto solitario; **mPFC**, corteza prefrontal medial; **PrL**: subdivisión prelímbica de la mPFC; **mPOA**: área preóptica medial; **PVN**: núcleo paraventricular del hipotálamo; **mpPVN**: subdivisión medial parvocelular del PVN; **peri-PVN**: área peri-PVN; **vSUB**: *subiculum* ventral.

5. Sustancias psicoactivas

El propósito de la presente tesis no es ahondar en la adicción a las drogas por lo que no entraremos en detalles respecto a las diferentes teorías de la adicción y los cambios neurofisiológicos y conductuales que se producen tras el consumo crónico de drogas. No

obstante, consideramos necesaria una breve introducción de las fases del consumo de drogas para una mejor comprensión del papel de los psicoestimulantes.

Actualmente, el consumo de drogas es uno de los mayores problemas de salud pública de nuestra sociedad. Según el informe mundial sobre Drogas de la Organización de las Naciones Unidas (“*United Nations Office on Drugs and Crime*”, UNODC) de 2016, 247 millones de personas de entre 15 y 65 años hicieron uso de alguna sustancia ilícita el año anterior. De éstas, 29 millones sufren algún tipo de patología relacionada con la adicción y sólo 1 de cada 6 está en tratamiento. Entre las sustancias ilícitas más consumidas destaca el cannabis, seguida de las anfetaminas y sus derivados, la cocaína y los opioides.

Una gran variedad de estímulos naturales críticos para la supervivencia del individuo o la especie como la obtención de comida o la reproducción son recompensantes (reforzantes) tanto en humanos como en animales. Los estímulos reforzantes se perciben como algo positivo y, como tal, gustan, se desean y se persiguen (ver revisión en Berridge y Robinson, 2003). El consumo de sustancias que inducen refuerzo inicia procesos de aprendizaje que consolidan: **i)** el placer asociado al refuerzo; **ii)** el aprendizaje de las señales que predicen su disponibilidad y las acciones que permiten su consumo y; **iii)** la asignación de valor y de estado motivacional al estímulo reforzante con el objetivo de determinar el nivel de recursos necesarios para obtener un determinado objetivo. Las drogas presentan muchas semejanzas con los reforzadores naturales en las respuestas hedónicas (placer), el deseo, el rápido aprendizaje de las señales que predicen el refuerzo y la eficiencia en las secuencias conductuales orientadas a la obtención del refuerzo. No obstante, existen claras diferencias entre el refuerzo natural y el refuerzo causado por las drogas. Una primera diferencia es que las drogas no benefician la supervivencia del individuo y pueden llegar a tener efectos nocivos para la salud del mismo. Otra diferencia es que el refuerzo causado por las drogas tiende a sobrevalorarse a expensas del refuerzo natural, imponiéndose la obtención y el consumo de drogas por encima de cualquier otra meta (ver revisión en Hyman *et al.*, 2006). En el proceso de adicción se distinguen tres fases (ver revisión en LeMoal y Koob; 2007): **(i) el uso**, que implica un consumo puntual sin

suponer un riesgo para la salud del individuo, estando muy influenciado por las circunstancias socio-culturales; (ii) el **abuso**, etapa en la que el consumo de drogas empieza a interferir con la vida cotidiana del individuo afectando a la salud y a las relaciones sociales; y (iii) la **adicción**, fase en la que el individuo adopta una conducta compulsiva respecto al consumo de drogas a sabiendas de sus numerosos efectos negativos. En esta fase, la ausencia de la droga provocaría abstinencia, y como consecuencia de ésta, se generarían conductas de búsqueda impulsiva de droga (*craving*) con la consiguiente recaída y reentrada en el proceso adictivo.

5.1. Vías del refuerzo: Papel del sistema dopaminérgico

El **sistema dopaminérgico mesencefálico** es clave para los mecanismos del refuerzo y se compone de dos grandes subsistemas: (a) la **vía nigroestriatal**, que incluye la sustancia negra (SN) *pars compacta* y sus proyecciones al estriado dorsal, regulando la conducta motora; y (b) la **vía mesocorticolímbica** que se compone de proyecciones desde el área tegmental ventral (VTA) a la mPFC, y áreas límbicas como el Acb, la FH, el LS y la amígdala extendida.

Las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al Acb son críticas en el procesamiento de estímulos relacionados con el refuerzo, incluidos aquellos asociados a las drogas (Wise *et al.*, 2008). Las drogas, a través de sus diferentes efectos farmacológicos, tienen como factor común el incremento de los niveles sinápticos de dopamina (DA) en el Acb (Di Chiara, 1988; ver revisión en Berridge, 2007). El Acb puede subdividirse en dos partes desde un punto de vista histológico y funcional: (a) el **Core** (AcbC), que estaría implicado en la respuesta a los estímulos condicionados a la droga (Ito *et al.*, 2000, 2004; Di Ciano *et al.*, 2008) y en la interacción con otras estructuras como la amígdala (ver revisión en Cardinal *et al.*, 2002); y (b) el **AcbSh**, que se ha relacionado con el control de la conducta asociada a claves interoceptivas (Di Ciano *et al.*, 2008) y el procesamiento del refuerzo inducido tanto por estímulos naturales como por las drogas (Carlezon y Wise, 1996; Bassareo y Di Chiara, 1999; Ito *et al.*, 2004).

Mientras que el Acb juega un papel crítico en el establecimiento de la conducta de búsqueda de la droga, el **estriado dorsal** va ganando importancia a medida que esta conducta se establece (ver revisión en Everitt y Robbins, 2005). A medida que se desarrolla el proceso de adicción (primero el uso y después el abuso), se produce un cambio progresivo desde la motivación por conseguir una meta (aprendizaje de acción y consecuencia) hacia el establecimiento de un hábito (estímulo-respuesta) que caracteriza la compulsividad del consumo de drogas (revisión en Hyman *et al.*, 2006).

Las proyecciones dopaminérgicas del VTA a la **mPFC** son importantes para comprender las interacciones entre los efectos del estrés y las drogas ya que están implicadas tanto en la respuesta del estrés como en el desarrollo de la conducta adictiva (ver revisión en Montague *et al.*, 2004; Kalivas *et al.*, 2005). La mPFC es clave para la memoria de trabajo, la representación de metas, la asignación de un valor a éstas y la capacidad de elegir una acción en función de la evaluación previa (Miller y Cohen, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003). El consumo de drogas acabará incrementando las señales dopaminérgicas en la mPFC, provocando la potenciación de las señales asociadas a la droga y su valor respecto a otras metas (ver revisión en Montague *et al.*, 2004). Si este consumo se prolonga en el tiempo, la mPFC podría sufrir adaptaciones patológicas que acabarían provocando distorsiones en la valoración de las metas y una pérdida en el control de la conducta, con un aumento de la impulsividad (ver revisión en Kalivas *et al.*, 2005).

Otra estructura implicada tanto en la respuesta al estrés como en la adicción es la **amígdala extendida**, habiéndosela relacionado con los efectos reforzantes agudos de las drogas, así como con los efectos adversos de la abstinencia y la recaída (ver revisión en Koob y LeMoal, 2005). La amígdala extendida es una macroestructura que comparte características morfológicas, neuroquímicas y de conectividad e incluye estructuras como el BNST, la CeA, la MeA y la parte posterior del Acb (ver revisión en Koob, 2003). Se consideran dos subdivisiones: **i)** la **central**, que se compone de la CeA, el BNST lateral y la parte posterior del AcbSh; y **ii)** la **medial**, conformada por el BNST medial y la MeA. Los sistemas de neurotransmisores/neuromoduladores implicados en los efectos

reforzantes agudos de las drogas en estas 2 estructuras neuroanatómicas incluyen DA, péptidos opioides, GABA, glutamato, neuropéptido Y (NPY) y glucocorticoides (ver revisión en Koob y LeMoal, 2005). Durante episodios agudos de abstinencia, se ha demostrado una actividad reducida del sistema mesocorticolímbico, además de una disminución de la actividad GABAérgica y glutamatérgica en la amígdala extendida. Además, a medida que la dependencia y la abstinencia se van desarrollando, el sistema CRHérgico va ganando importancia. De esta manera, durante episodios agudos de abstinencia se han observado incrementos en los niveles extracelulares de CRH en la amígdala extendida (ver revisión en Koob y LeMoal, 2005).

En resumen, el sistema dopaminérgico mesencefálico, a través de sus dos grandes subsistemas, se encuentra en una posición privilegiada para reforzar aquellas respuestas o conductas a estímulos (aversivos o placenteros) que aumenten la probabilidad de supervivencia (ver revisión el Schultz, 2002).

5.2. D-Anfetamina

Como ocurre con la mayoría de drogas, la anfetamina se obtiene a partir de un precursor (efedrina) que se encuentra de manera natural en la naturaleza, siendo los miembros del género *Ephedra* y el árbol *Catha edulis* las principales fuentes. En el siglo I se menciona en China el uso de *Ephedra sinica* para tratar el asma y las infecciones de las vías respiratorias altas y en el siglo XIX se identificó el mayor principio activo de esta planta, la **efedrina**, precursora de lo que hoy en día conocemos como la anfetamina. En 1887, Lazar Edeleanu sintetizó por primera vez la **anfetamina**, pero no fue hasta principios del siglo XX cuando se conocieron sus efectos estimulantes (Allen, 1993, citado en Sulzer *et al.*, 2005). Durante años, la industria farmacéutica comercializó la anfetamina para tratar una gran variedad de enfermedades como la narcolepsia, la esquizofrenia o la adicción a opiáceos, entre otras (Sulzer *et al.*, 2005). Además, gracias a sus efectos estimulantes y potenciadores del estado de alerta, pronto empezó a ser una droga común en los conflictos bélicos, siendo todavía hoy común su uso en pilotos de combate (Caldwell *et al.*, 2003). Aunque el potencial adictivo de la anfetamina había sido objeto de debate desde los años

30, no fue hasta mediados de los 60 cuando se reconoció plenamente su potencial adictivo. Según el informe más reciente del UNODC (2016), el uso de las anfetaminas se sitúa actualmente por debajo de otras drogas como el cannabis, aunque por encima de la heroína o la cocaína.

5.2.1. *Mecanismo de acción.*

La anfetamina es una droga que penetra fácilmente la barrera hematoencefálica y su acción tiene como principal diana la DA y, en menor medida, la NA y la 5-HT (Figura 7A, ver revisión en Sulzer *et al.*, 2005). En condiciones normales, tras la liberación de monoaminas a la hendidura sináptica éstas son recaptadas por la neurona presináptica gracias a las **proteínas recaptadoras** de DA (DAT), NA (NET) y 5-HT (SERT). En el citoplasma de las neuronas, las monoaminas son transportadas contra gradiente hacia las vesículas sinápticas gracias a la acción de las **proteínas transportadoras vesiculares** (VMAT1, periférica y VMAT2, central). En presencia de anfetamina las proteínas recaptadoras de la membrana presináptica invierten su funcionamiento. Además, la anfetamina también afecta a las proteínas transportadoras vesiculares, alcalinizando las vesículas e impidiendo la entrada de monoaminas a las vesículas. Debido al vaciado de monoaminas de las vesículas y a la acción sobre las proteínas transportadoras presinápticas, la anfetamina provoca una liberación masiva de monoaminas a la hendidura sináptica, independientemente de la actividad funcional de las terminales sinápticas.

5.2.2. *Efectos de la anfetamina*

La anfetamina tiene efecto tanto a nivel **periférico** como a nivel **central**. Entre los primeros destacan el aumento de la presión arterial, de la frecuencia cardíaca y de la temperatura corporal, la vasoconstricción periférica y la sudoración, efectos que estarían relacionados con la liberación masiva de NA periférica y con la activación adrenérgica. Respecto a sus efectos a nivel central, la anfetamina aumenta la sensación de alerta, disminuye la sensación de fatiga y hambre y mejora el rendimiento intelectual (ver revisión en Steinkellner *et al.*, 2011). El aumento de los niveles de DA en las vías del

refuerzo es responsable de las propiedades psicoestimulantes y reforzantes de la droga. El aumento de DA en el LH y la liberación de 5-HT en el hipotálamo ventromedial se han relacionado con el control de la saciedad y la disminución del apetito. Por último, la liberación masiva de NA a nivel central se ha relacionado con el aumento de la sensación de alerta.

La respuesta conductual a la anfetamina depende de la dosis administrada. La administración de dosis bajas es capaz de estimular conductas apetitivas, mientras que dosis altas estimulan conductas repetitivas y estereotipias (Swerdlow *et al.*, 1993). Además, la anfetamina estimula cambios autonómicos y endocrinos típicos de la respuesta de estrés como el aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y un incremento en los niveles de corticosterona (Antelman *et al.*, 1992). La anfetamina, como muchas otras drogas, es capaz de activar de manera dosis dependiente el eje HPA y, como tal, se puede considerar como un estímulo estresante farmacológico (Swerdlow *et al.*, 1993; Gagliano *et al.*, 2009; ver revisión en Armario 2010). Aunque los mecanismos precisos de la activación del eje HPA por parte de la anfetamina siguen estando poco claros, se propone un papel importante del CRH. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación de la respuesta endocrina del eje HPA causada por la anfetamina es inhibida tras la inmunoneutralización del CRH (Swerdlow *et al.*, 1993). Aunque la administración de anfetamina aumenta los niveles de *c-fos* en el PVN, las neuronas que colocalizan con CRH (*c-fos*+/*CRH*+) son menos que las activadas por la inmovilización en plancha (Rotllant *et al.*, 2007). Por lo tanto, la activación del eje HPA causada por la anfetamina podría implicar a otros factores hipotalámicos distintos del CRH. Respecto a las posibles señales activadoras hacia el PVN, algunos autores proponen un mecanismo parecido al de la cocaína, que parece ejercer su efecto activador sobre el eje HPA a través de la activación de las vías dopaminérgicas (Borowsky y Kuhn, 1991). No obstante, la activación del eje HPA por otros derivados de la anfetamina (metanfetamina y MDMA) parece implicar también a otras monoaminas como la 5-HT (Nash *et al.*, 1988; Doyle y Yamamoto, 2010).

5.3. Metilfenidato

Como muchos de los derivados de la anfetamina, el metilfenidato es un psicoestimulante sintetizado y comercializado por primera vez en 1944 con el nombre de **Ritalin®**. En sus inicios fue indicado para un gran número de condiciones tales como los estados depresivos, la fatiga crónica o la narcolepsia. Hoy en día, su uso se ha visto restringido y sólo se utiliza en el tratamiento del déficit de atención e hiperactividad (ADHD de sus siglas en inglés, *Attention déficit and hiperactivity disorder*) y de la narcolepsia. En adultos, se utiliza para el tratamiento del ADHD y de la obesidad, aunque este último uso genera dudas sobre sus beneficios a largo plazo para mantener el peso, preocupando el posible abuso y la dependencia. El metilfenidato es un fármaco que se engloba dentro de los considerados **potenciadores cognitivos**, que son sustancias que se administran con el objetivo de potenciar funciones mentales tales como atención, concentración, alerta, memoria, motivación, planificación y toma de decisiones (Svetlov *et al.*, 2007). Por este motivo y, dada su mayor accesibilidad, no es de extrañar el incremento del uso ilícito de este psicoestimulante, ya sea como potenciador cognitivo (Svetlov *et al.*, 2007) o para su uso recreativo (ver revisión en Kollins *et al.*, 2001, 2009).

5.3.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del metilfenidato (Figura 7B) guarda similitud, pero no es igual al ejercido por la anfetamina. El metilfenidato bloquea DAT y NET, pero a diferencia de otros psicoestimulantes como la cocaína, no tiene efecto sobre SERT (Han y Gu, 2006). Por lo tanto, el metilfenidato conducirá a un incremento de los niveles de DA y NA en la hendidura sináptica, pero no de los niveles de 5-HT incluso con la administración de dosis muy altas de metilfenidato (Kuczenski y Segal, 1997, 2002; Segal y Kuczenski, 1999; Brandon y Steiner, 2003). Estudios *in vitro* señalan que la potencia del metilfenidato para bloquear DAT es incluso mayor que la de la cocaína y que el bloqueo de NET es similar al producido por la anfetamina (Han y Gu, 2006). Por lo tanto, se considera que los efectos

terapéuticos del metilfenidato podrían deberse tanto al incremento del tono dopaminérgico como del noradrenérgico.

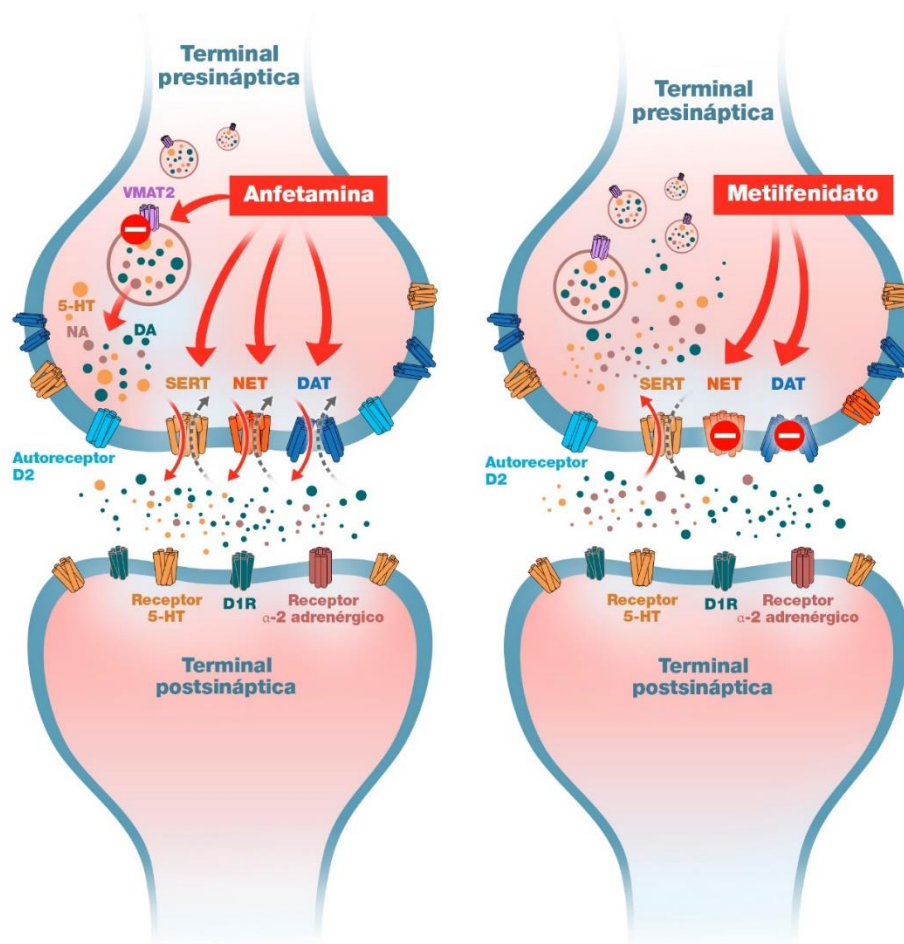


Figura 7. Mecanismo de acción de la anfetamina y el metilfenidato. Tras la administración de anfetamina (figura de la izquierda) se observa una inversión de los recaptadores de monoaminas (DAT, NET y SERT), un bloqueo del transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) y una acidificación vesicular que da lugar a una liberación masiva de monoaminas a la hendidura sináptica. Tras la administración de metilfenidato (figura de la derecha), se observa un bloqueo de DAT y NET, provocando un incremento de DA y NA en la hendidura sináptica, amplificando la actividad de éstas (Adaptado de Wilens *et al.*, 2008).

5.3.2. Efectos del metilfenidato.

En la literatura existe un gran número de trabajos que analizan los efectos de la administración crónica de metilfenidato. No obstante, dados los objetivos del presente trabajo, nos centraremos en los efectos causados por una administración aguda. Los efectos estimulantes motores del metilfenidato muestran una respuesta dosis-dependiente. Por ejemplo, en ratas Sprague-Dawley la dosis más baja (0,6 mg/kg) no muestra un efecto estimulante, la dosis media (2,5 mg/kg) muestra un leve efecto

estimulante y la dosis alta (10 mg/kg) presenta un efecto estimulante robusto (Claussen y Dafny, 2014).

También se han estudiado los **efectos** sobre las **funciones ejecutivas**, que son dependientes, en parte, de la mPFC e incluyen procesos atencionales, memoria de trabajo y control de la impulsividad (ver revisiones en Winstanley *et al.*, 2010; Levin *et al.*, 2011; Luciana, 2013). La **atención sostenida** es una construcción hipotética que se concibe como la base del procesamiento de la información referente al ambiente y su relación con el individuo (ver revisión en Levin *et al.*, 2011). En modelos animales se ha estudiado mediante la prueba de detección de señales. Este paradigma consta de dos tipos de ensayos: el señalizado y el no señalizado. En cada ensayo, el animal debe escoger la palanca correcta para recibir una recompensa: en presencia de una señal visual debe apretar la palanca asociada a la señal y en ausencia de señal debe hacer lo propio en la palanca no asociada a la señal. Dosis de 0,5 y 1 mg/kg (vía intraperitoneal, ip) de metilfenidato mejoran la atención sostenida en esta prueba (Berridge *et al.*, 2006; Andrzejewski *et al.*, 2014). No obstante, en otros estudios, el efecto de la administración de 0,3 mg/kg de metilfenidato (vía subcutánea, sc) parece darse únicamente en animales con niveles basales de ejecución bajos (Rezvani *et al.*, 2009).

La **memoria de trabajo** es el sistema de procesamiento activo que permite a los individuos retener una cantidad limitada de información y manipularla en respuesta a objetivos específicos (ver revisión en Luciana, 2013). Se puede medir mediante la prueba de alternancia demorada, en la que el animal recibe un refuerzo si escoge el brazo de un laberinto que ha sido previamente no reforzado. El efecto del metilfenidato parece ser dependiente de la dosis ya que se ha demostrado que la administración de 2 mg/kg (vía oral) mejora esta función mientras que dosis altas tienen efectos negativos sobre la memoria de trabajo (Arnsten y Dudley, 2005). Esta mejora en la memoria de trabajo con la administración de dosis bajas de metilfenidato se ha relacionado con el aumento de los niveles de DA y NA en la mPFC y con el aumento de la respuesta electrofisiológica de las neuronas del mPFC (Devlbiss y Berridge, 2008).

La **impulsividad** es la predisposición por las reacciones rápidas y no planeadas a estímulos internos o externos y la escasa valoración de las consecuencias negativas de estas acciones, tanto para el propio individuo como para otros individuos (ver revisión en Winstanley *et al.*, 2010). Se subdivide en tres dimensiones. Una de ellas es la **impulsividad motora** que refleja espontaneidad en las acciones y, en modelos animales se evalúa mediante el paradigma *five choice serial reaction time task* (5CSRTT, ver revisión en Robbins *et al.*, 2002). En este paradigma, el animal ha de estar atento a la aparición transitoria de una señal lumínica breve en cualquiera de cinco compartimentos. El animal debe introducir el hocico en el compartimento donde había aparecido previamente la señal lumínica para obtener una recompensa. No obstante, el animal puede ejecutar dicha acción antes de que se presente la señal lumínica (impulsividad), introducir el hocico en un compartimento que no ha sido previamente iluminado (déficit de atención) o ejecutar respuestas reiteradas en el compartimento reforzado (compulsividad). Por lo tanto, el efecto esperado del metilfenidato sería un aumento de las respuestas correctas y una disminución de las respuestas prematuras. La administración de una dosis de 2 mg/kg de metilfenidato en ratas de la cepa Lister hooded reduce las respuestas prematuras, mientras que la administración de dosis más altas parece tener el efecto contrario (Milstein *et al.*, 2010). Igualmente, se ha demostrado este efecto bifásico en el control inhibitorio de la respuesta tras la administración de 1mg/kg (vía oral) en ratas de la cepa Wistar (Pattij *et al.*, 2012). No obstante, en ratas de la cepa Long Evans las respuestas prematuras no se ven afectadas ni tras la administración de dosis bajas (0,1 – 1 mg/kg, ip) ni de dosis altas (2 – 4 mg/kg) de metilfenidato (Paterson *et al.*, 2012).

En conclusión, no está claro en la literatura si existe un efecto importante del metilfenidato sobre la atención o la impulsividad, y la dosis no parece ser el único factor, siendo probablemente un aspecto relacionado con las características individuales de los sujetos.

5.4. Genes de expresión temprana y psicoestimulantes

Desde el inicio de los años 90 se han utilizado los IEG como herramienta para el estudio de las bases anatómico-funcionales de la adicción (ver revisión en Sumner *et al.*, 2004). A grandes rasgos, la expresión de IEG y su patrón de activación dependen del tipo de droga administrada (Erdtmann-Vourliotis *et al.*, 1999; Valjent *et al.*, 2004), de la dosis administrada (Rotllant *et al.*, 2010) y de la duración de la administración, aguda o crónica (Torres y Horowitz, 1999).

5.4.1. *c-fos* y anfetamina.

La administración aguda de anfetamina en ratas provoca un rápido y transitorio incremento de los niveles de *c-fos* especialmente en CPu y Acb (Graybiel *et al.*, 1990; Snyder-Keller, 1991a, 1991b; Johansson *et al.*, 1994; Badiani *et al.*, 1998; Uslaner *et al.*, 2001a y 2001b). La activación de *c-fos* en el CPu parece estar mediada por la liberación de DA ya que dicha activación se inhibe con la administración de antagonistas de los receptores dopaminérgicos D₁ (Snyder-Keller, 1991; LaHoste *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2003). Además, la anfetamina administrada de manera aguda, pero no crónica, provoca la activación de otros IEG como fosB, junB, zif268 y fra-1 (Persico *et al.*, 1993).

Además de inducir activación de *c-fos* en el CPu y el Acb, la administración de anfetamina hace lo propio en otras áreas relacionadas con el procesamiento de la respuesta de estrés. Se ha demostrado activación de *c-fos* en áreas como la mPFC, la FH y la CeA (Day *et al.*, 2001), así como en tálamo, hipotálamo y tronco encefálico, incluyendo VTA y núcleos del Rafe (Nikulina *et al.*, 2004; Colussi-Mas *et al.*, 2007; Rotllant *et al.*, 2010). Sin embargo, existen pocos estudios que hayan aportado información sobre el patrón general de activación del SNC tras la administración aguda de anfetamina (Ostrander *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio, hemos estudiado de manera exhaustiva dicha activación en respuesta a dos dosis diferentes de anfetamina (Rotllant *et al.*, 2010). Tras la administración de 1,5 y 5 mg/kg de anfetamina pudo observarse activación de *c-fos* en multitud de áreas. En algunas de estas áreas la activación fue dependiente de la dosis (AcbSh, las diferentes subdivisiones del PVN, CeA y MeA),

mientras que en otras áreas no lo fue (subdivisión cingulada1 e IL de la mPFC, CPuDL, BLA y VTA). Esta activación independiente de la dosis podría deberse a una elevada sensibilidad de estas áreas a la anfetamina, mostrando una respuesta máxima con las dosis más bajas. De manera sorprendente, también pudo observarse que algunas áreas respondían con mayor intensidad a las dosis más bajas de anfetamina (PrL, AcbC y las regiones dorsomedial y ventromedial del estriado), sugiriendo una activación preferente de circuitos inhibidores con proyección a las áreas mencionadas, lo que enmascararía los efectos estimuladores (directos o indirectos) de la droga.

Se usó el análisis factorial de los datos como herramienta para conocer las posibles relaciones funcionales entre las distintas áreas activadas, agrupándose las áreas en: **(a)** áreas ricas en neuronas dopaminérgicas como mPFC, Acb, CPu y VTA, **(b)** áreas con proyecciones serotoninérgicas como los núcleos del Rafe, **(c)** la subdivisión dorso-lateral del CPu y, **(d)** el PVTh y el PVN. Aunque se desconocen las vías y mecanismos precisos implicados, los resultados sugieren la existencia de cuatro circuitos nerviosos diferenciados que se activan en respuesta a la anfetamina y que podrían ser diferencialmente dependientes de la liberación de las diferentes monoaminas (DA, NA, 5-HT).

5.3.2 *c-fos* y metilfenidato

Debido a la importancia del metilfenidato en el tratamiento del ADHD y que éste afecta en gran medida a niños y adolescentes, gran parte de la literatura se ha centrado en los efectos del metilfenidato en la expresión de *c-fos* en animales jóvenes. Lin y colaboradores (1996) fueron los primeros en observar un incremento en los niveles de la proteína *c-Fos* en el CPu de gatos tras la administración aguda de 2,5 mg/kg de metilfenidato. Centrándonos en roedores, tanto en jóvenes como adultos, la expresión de *c-fos* emerge con dosis de metilfenidato de 2 mg/kg o más, aunque los efectos parecen ser más robustos en los animales más jóvenes (ver revisión en Yano y Steiner, 2007). Varios estudios han demostrado en roedores adultos la expresión de *c-fos* en el CPu inducida por la administración de 5 o 40 mg/kg de metilfenidato en ratones CD1 (Hawken *et al.*, 2004) o

de 5 o 10 mg/kg en ratas SD (Yano y Steiner, 2005). No obstante, cuando se administran dosis más bajas (2 mg/kg) el aumento es muy débil y con dosis de 0,5 mg/kg no se produce activación sugiriendo que, en adultos, la expresión de *c-fos* es proporcional a la dosis de metilfenidato administrada (Yano y Steiner, 2005). En el CPU de animales jóvenes también se ha confirmado la inducción de *c-fos* dependiente de la dosis de metilfenidato administrada (2, 5 y 10 mg/kg, Brandon y Steiner, 2003; 2 y 10 mg/kg, Chase *et al.*, 2005a). Además, el metilfenidato parece producir diferentes patrones de activación en el estriado en función de la edad de los animales, sugiriendo que los efectos del metilfenidato serían más importantes en etapas tempranas del desarrollo. La administración de 20 mg/kg de metilfenidato en ratones CD-1 de 3 a 7 días de edad provoca una inducción de *c-fos* en forma de parches, mientras que en animales de 24 a 45 días de edad provoca una inducción más homogénea en el estriado (Penner *et al.*, 2002).

El estriado no es la única estructura activada tras la administración de metilfenidato. En ratas jóvenes se ha descrito un aumento de la expresión de *c-fos* en el Acb tras la administración de 10 mg/kg de metilfenidato (Chase *et al.*, 2005b). También se ha observado dicho aumento en la mPFC de ratones y ratas jóvenes tras la inyección de 3 y 7,5 mg/kg de metilfenidato (Allen *et al.*, 2010; Koda *et al.*, 2010).

Los estudios de activación neuronal (*c-fos*) anteriormente comentados se ven corroborados por estudios conductuales y de activación electrofisiológica en áreas dopaminoceptivas. Por ejemplo, Claussen y Dafny (2014) demostraron en ratas SD adultas que, tras la administración de 0,6, 2,5 y 10 mg/kg de metilfenidato existe un aumento de la actividad locomotora dependiente de la dosis de metilfenidato administrada. Este efecto sobre la actividad locomotora venía acompañado de cambios en la actividad electrofisiológica de la mPFC. La administración de dosis bajas de metilfenidato (0,6 mg/kg) provocaba una disminución de la actividad de la mPFC, mientras que la administración de dosis más altas de metilfenidato (2,5 y 10 mg/kg) incrementaban la actividad de la mPFC de manera dependiente de la dosis. La activación de la mPFC tras el tratamiento agudo de metilfenidato no sólo es sensible a la dosis, sino

a la edad de los animales. En este sentido, Gronier y colaboradores (2010) demostraron que la administración de 3 mg/kg en ratas juveniles y adultas incrementaba la actividad electrofisiológica de la mPFC, siendo este efecto más potente en ratas adultas. Un patrón similar se observó con la expresión del IEG *Arc*, asociado a plasticidad sináptica. La razón de las discrepancias entre la actividad electrofisiológica y la inducción de *Arc* respecto a la de *c-fos* no está del todo clara.

6. Interacción entre estímulos estresantes

La exposición aguda a estímulos estresantes provoca una gran variedad de respuestas tanto fisiológicas como conductuales que dependen en gran medida de sus características, especialmente su naturaleza, intensidad y duración. Si consideramos como estímulos estresantes todos aquellos que causan una activación del eje HPA, ésta es una característica de la mayoría de las drogas (Armario et al., 2010), que por ello se incluyen dentro del concepto de estímulos estresantes farmacológicos.

La interacción entre estrés y drogas ha sido objeto de estudio durante décadas (ver revisión en Kalivas y Stewart, 1991; Piazza y LeMoal, 1998; Steketee y Kalivas, 2011). La exposición repetida a psicoestimulantes como la cocaína o la anfetamina produce sensibilización conductual, caracterizada por una mayor respuesta locomotora a una posterior inyección de psicoestimulante (ver revisión en Kalivas y Stewart, 1991). De igual manera se ha demostrado una sensibilización cruzada entre psicoestimulantes y estrés crónico evaluada mediante la actividad locomotora (ver revisión en Kalivas y Stewart, 1991), una facilitación de la adquisición de la autoadministración de droga provocada por una exposición previa a estrés crónico (ver revisión en Piazza y LeMoal, 1998), y la reinstauración de la conducta de búsqueda de droga tras la exposición a un estímulo estresante (ver revisión en Steketee y Kalivas, 2011). Sin embargo, se conoce mucho menos respecto a la interacción aguda entre estrés y drogas. En nuestra sociedad, algunas personas recurren al uso de drogas bien de carácter recreativo, bien para paliar los efectos del estrés de la vida diaria. Una de las características de la mayoría de drogas, es su

capacidad para inducir la activación del eje HPA (ver revisión en Armario, 2010). Esta característica puede explicar al menos en parte las interacciones entre estrés y drogas.

Considerando que tanto la anfetamina como los estímulos estresantes activan áreas comunes del SNC (Cullinan *et al.*, 1995; Rotllant *et al.*, 2010), existe la posibilidad de que se establezcan interacciones entre ambos estímulos en dichas áreas. De hecho, existen antecedentes respecto a dicha interacción. La administración de anfetamina en un ambiente nuevo (estímulo estresante de baja intensidad) provoca una mayor actividad locomotora que cuando la droga es administrada en su caja de estabulación (Badiani *et al.*, 1998). Además, esta mayor actividad locomotora, también observada con la administración de cocaína, viene acompañada de un incremento en la expresión de *c-fos* en la mPFC, el estriado y el Acb, sugiriendo la existencia de una **sinergia positiva** entre psicoestimulantes y estímulos estresantes (Badiani *et al.*, 1998; Uslaner *et al.*, 2001a, 2001b). No obstante, esta sinergia positiva no se observa en otras áreas como el AcbSh y las regiones medial y lateral del septum (Badiani *et al.*, 1998). De manera sorprendente, en la CeA y en la región oval del BST se observaron unos niveles más bajos de *c-fos* (**sinergia negativa**) cuando los dos estímulos se presentaban simultáneamente (Day *et al.*, 2001; 2005; 2008). De hecho, estímulos estresantes emocionales como el ruido o el *restraint* también tienen la capacidad de suprimir la activación de la CeA inducida tanto por la administración de anfetamina como por la exposición a un estímulo estresante sistémico como es la interleukina 1 β , IL-1 β (Day *et al.*, 2005). Similar sinergia negativa se ha observado con la administración de cocaína inmediatamente después de una exposición a un estímulo estresante emocional como la derrota social en áreas del tronco del encéfalo como la PAG, DR y LC (Nikulina *et al.*, 1998).

Recientemente, hemos demostrado en nuestro laboratorio la existencia de interacción entre psicoestimulantes y la natación forzada a nivel del eje HPA y la hiperglucemia inducida por el estrés, ligada a la activación del eje SMA. La anfetamina es capaz de activar de manera dependiente de la dosis el eje HPA por sí sola. Cuando la anfetamina se administra de manera simultánea con la natación forzada se reduce la activación

periférica del eje HPA (niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona) y la hiperglucemia inducida por la exposición a este último (Gómez-Román *et al.*, 2016; Gagliano *et al.*, 2017). Esta reducción de la respuesta del eje HPA tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada también se ha observado con la administración de dosis bajas de anfetamina (1 mg/kg) y cuando la droga se administra 30 minutos antes de la exposición a la natación forzada (Gagliano *et al.*, 2017). La reducción de la respuesta del eje HPA a la natación forzada no se restringe sólo a la anfetamina y se observa tras la administración simultánea de otro psicoestimulante como la cocaína (Gagliano *et al.*, 2017). Por otro lado, esta interacción entre anfetamina y natación forzada respecto al eje HPA no se restringe a los estímulos estresantes de tipo emocional, sino que también interactúa con estímulos estresantes sistémicos como la IL-1 β (Gómez-Román *et al.*, 2016).

Posteriormente, estudiamos si dicha interacción se hacía evidente con el metilfenidato, un derivado de la anfetamina ampliamente utilizado como tratamiento para el trastorno del déficit de atención e hiperactividad. La administración de dosis en el rango terapéutico de metilfenidato (0,5 y 2 mg/kg) no fue capaz de activar el eje HPA. Sin embargo, la inyección de metilfenidato justo antes de la exposición a la natación forzada consigue reducir la respuesta de la ACTH a la natación forzada, aunque la inhibición no fue tan potente como para reducir la respuesta de la corticosterona (Gagliano, 2015).

Esta interacción entre psicoestimulantes y estímulos estresantes a nivel del eje HPA se ve reflejada también a nivel central. De esta manera, la sinergia negativa observada en el eje HPA cuando los animales son expuestos de manera simultánea a la anfetamina y la natación forzada, está asociada a un bloqueo de la expresión del gen de CRH medido por sus niveles de RNA heteronuclear, además de observarse una menor inducción de *c-fos* en el PVN (Gómez-Román *et al.*, 2016). Por su parte, la exposición a la natación forzada en presencia de metilfenidato bloquea completamente el incremento en la expresión del CRH en el PVN causada por la natación forzada, no observándose reducción de la activación neuronal mediante *c-fos* (Gagliano, 2015). Esta disociación entre la activación

de *c-fos* y la transcripción del gen de CRH en el mpdPVN ha sido ya descrita en otras situaciones (Ginsberg *et al.*, 2003; Vallés *et al.*, 2003) y podría reflejar el hecho de que ambos procesos están relacionados, pero son en parte diferentes desde el punto de vista de los mecanismos intracelulares implicados. Por lo tanto, parece que la interacción del metilfenidato con la respuesta fisiológica al estrés parece residir en el PVN, siendo fundamental el estudio de aquellas áreas que proyectan tanto de manera directa como indirecta al PVN.

Estas aproximaciones nos aportan una idea global de los patrones de activación neuronal en respuesta a la exposición simultánea a dos estímulos estresantes y algunas de sus consecuencias conductuales o fisiológicas. Sin embargo, no proporcionan información respecto a qué poblaciones neuronales están implicadas en tal interacción. Los pocos estudios que han evaluado esta cuestión se han centrado en el CPu y la CeA. El CPu se compone, en un 95%, de neuronas de proyección GABAérgicas (MSN, *medium spiny neurons*) las cuales se subdividen en dos poblaciones: **neuronas** que expresan D1R, dinorfina (DYN) y sustancia P (SP), que forman parte de la **vía directa**; y **neuronas** que expresan D2R y encefalina (ENK), que participan en la **vía indirecta**. La combinación de la administración de amfetamina en un ambiente conocido activa únicamente las neuronas D1R positivas en el estriado, mientras que el ambiente nuevo por sí solo activa, en menor medida, tanto las neuronas D1R como las D2R positivas (Badiani *et al.*, 1999; Uslaner *et al.*, 2001b, Ferguson *et al.*, 2003). La combinación de la inyección de amfetamina con un ambiente nuevo tiene un efecto **cuantitativo**, activando un mayor número de neuronas D1R positivas respecto al grupo administrado con amfetamina en el ambiente conocido; pero también un efecto **cuantitativo**, incrementando la activación de las neuronas D2R positivas respecto al grupo expuesto únicamente a la amfetamina, que es incapaz de activar por sí sola las neuronas D2R positivas (Badiani *et al.*, 1999). De esta manera, parece que la aparente sensibilidad en la inducción de *c-fos* en el estriado variaría en función del contexto ambiental en el cual la amfetamina es administrada.

En la naturaleza los organismos pueden enfrentarse a diferentes tipos de estímulos aversivos de manera simultánea o casi simultánea (v.g. encontrarse en un ambiente desconocido en presencia de un depredador). Sorprendentemente, apenas existen estudios sobre las consecuencias de la exposición simultánea a dos estímulos estresantes. La interacción entre estímulos estresantes tiene una importancia teórica muy relevante, ya que no está claro si la exposición simultánea a dos de ellos da lugar a un procesamiento predominante del estímulo más aversivo, enmascarando el impacto global del estímulo menos aversivo, o bien, si el impacto de los dos estímulos estresantes resulta en un efecto aditivo o incluso una potenciación entre ellos, dando lugar a sinergias positivas.

En nuestro laboratorio hemos estudiado la interacción entre dos estímulos estresantes como la inmovilización en plancha y el olor al depredador con la hipótesis de que la exposición simultánea a ambos estímulos potenciaría la activación aguda del eje HPA y las consecuencias negativas a largo plazo (incremento en la ansiedad, valorado por un laberinto en cruz elevado y/o desarrollo de miedo condicionado). Para ello, los animales fueron expuestos a cada estímulo estresante por separado (inmovilización en plancha u olor al depredador) y a los dos estímulos de manera simultánea (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que la exposición a la inmovilización en plancha no parece interferir con la eficacia del olor del depredador para inducir miedo condicionado, sugiriendo que los animales son capaces de procesar el olor del depredador incluso bajo la influencia de un estímulo estresante mucho más intenso como la inmovilización. En cuanto a la activación del eje HPA, se observó una tendencia a una menor respuesta del eje HPA en los animales expuestos a ambos estímulos de manera simultánea en comparación con los animales expuestos a la inmovilización en plancha (estímulo más intenso). De acuerdo con esta posibilidad, otros autores tampoco han observado efecto aditivo tras la exposición simultánea a ruido y *restraint*, aunque ambos estímulos causan una respuesta claramente sub-máxima de ACTH (Masini *et al.*, 2012). La interferencia entre estímulos estresantes podría afectar a las áreas del SNC que controlan la activación del eje HPA y otras respuestas fisiológicas y conductuales, aunque probablemente afectará solo a algunas de ellas.

Los trabajos anteriormente mencionados de nuestro grupo marcan el punto de partida y las pautas a seguir en el presente trabajo, cuyo principal objetivo ha sido contribuir a conocer cómo el SNC procesa dos estímulos estresantes simultáneos, de distinta o similar naturaleza, y qué poblaciones neuronales específicas se ven afectadas por este desafío.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

En los últimos años se ha demostrado que los estímulos estresantes emocionales y los psicoestimulantes activan un gran número de áreas comunes del SNC, lo que apoya la estrecha relación entre estrés y adicción. Existen aún más áreas comunes entre estímulos estresantes de tipo emocional, lo que sugiere que el procesamiento de uno puede interferir con el de otros si su exposición se solapa en el tiempo. En nuestro laboratorio, hemos demostrado previamente que la administración de psicoestimulantes como anfetamina o metilfenidato inmediatamente antes de la exposición a un estímulo estresante predominantemente emocional (natación forzada) reduce la respuesta fisiológica al estrés (hormonas del eje HPA e hiperglucemia). Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado los patrones de activación del SNC cuando los psicoestimulantes se administran de forma simultánea a un estrés de tipo emocional o bien cuando dos estímulos estresantes emocionales se presentan al mismo tiempo.

Nuestra hipótesis es que la interacción entre psicoestimulantes y estímulos estresantes emocionales, o bien entre estos últimos, tendría lugar en muchas de las áreas del SNC que muestran activación compartida, especialmente aquellas que son críticas en su procesamiento como mPFC, estriado, PVN y áreas de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas (VTA y LC, respectivamente). La interacción podría afectar a poblaciones neuronales específicas de estas áreas más que al patrón general de activación. Más en concreto, sugerimos que:

- 1) La interacción entre psicoestimulantes y estímulos emocionales sería mucho mayor con una dosis intermedia de anfetamina que por sí misma activa un gran número de áreas de SNC y el propio eje HPA, que con una dosis baja de metilfenidato, que apenas causa por sí misma activación del SNC y no afecta al eje HPA.
- 2) La exposición simultánea a psicoestimulantes y estímulos emocionales podría traducirse, respecto a la exposición individual a cada estímulo, en varias posibilidades: una relativa independencia en la activación causada por cada estímulo (efecto aditivo), activación de poblaciones neuronales similares (ausencia de efecto aditivo), sinergia

negativa (un estímulo interferiría con el otro) o sinergia positiva (un estímulo potenciaría el efecto del otro).

3) Los estímulos estresantes emocionales parecen mostrar un gran nivel de solapamiento en las poblaciones neuronales activadas, de tal manera que solo una pequeña parte de las mismas y solo en niveles jerárquicamente superiores del SNC existirían poblaciones específicas de cada estímulo. Es de esperar poco efecto aditivo si las poblaciones activadas son comunes y quizás sinergias negativas en aquellas poblaciones más específicas de cada estímulo. Detectar esta interacción entre estímulos estresantes emocionales puede ser de gran relevancia para entender cómo el SNC responde a situaciones emocionales, especialmente si son traumáticas.

4) La interacción entre estímulos podría ser más evidente si se estudian poblaciones neuronales del SNC de un fenotipo específico dentro de cada área: glutamatergicas vs GABAérgicas en mPFC, D1R⁺ vs D2R⁺ en estriado, CRH⁺ en PVN o TH⁺ vs TH⁻ en VTA y LC.

Los **objetivos** subyacentes a estas hipótesis son:

1) Demostrar en ratas adultas la existencia de interacción entre una dosis intermedia de AMPH (4 mg/kg) y un estímulo estresante emocional como la natación forzada. El patrón de activación de poblaciones neuronales específicas se estudiará mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) doble (c-fos y el marcador apropiado del fenotipo neuronal). Se asume un importante nivel de activación de cada estímulo por separado y un predominio de la sinergia negativa.

2) Demostrar que también puede darse interacción entre natación forzada y metilfenidato, a dosis terapéuticamente relevantes para el tratamiento del ADHD (0,5 mg/kg), aunque el fármaco tenga por sí mismo poco efecto sobre la activación del SNC.

3) Demostrar que durante la exposición simultánea a dos estímulos estresantes de tipo emocional como el olor a gato (depredador potencial de la rata) y la inmovilización en plancha también pueden ponerse de manifiesto sinergias negativas, especialmente en los

niveles jerárquicamente superiores del SNC como mPFC donde se activan más neuronas específicas de cada estímulo.

Material y Métodos

Material y métodos

1. Animales de experimentación y procedimientos generales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley facilitadas por el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona cuyas edades, al inicio de los procesos experimentales, oscilaban entre los 50 y 60 días. A su llegada a nuestro animalario las ratas se estabularon por parejas en cajas opacas de polipropileno con capacidad de 1000 cm³ (57 x 27 x 14,5 cm; Panlab SLU) provistas con viruta absorbente (Ultrasorb, Panlab SLU). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de luz (foto-periodo de 12 h), temperatura (22 ± 1 °C) y humedad (40-60 %). Durante toda la fase experimental los animales dispusieron de alimento y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos experimentales descritos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética para la experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y de la Generalitat de Catalunya en acuerdo con las Directivas de la Comunidad Económica Europea (2010/63/EU) y de España (RD53/2013). Todos los procedimientos experimentales se realizaron por la mañana. Tras la llegada de los animales a nuestras instalaciones, se dejó una semana de aclimatación donde no se realizó manipulación alguna. Posteriormente, se les realizó un procedimiento de habituación a la manipulación por los investigadores, a la toma de muestra de sangre por incisión en la cola y a la inyección subcutánea (sc) con el fin de minimizar el impacto del estrés a tales procedimientos. Los animales fueron pesados un día antes de cada experimento para determinar los volúmenes de inyección de las distintas dosis y fármacos empleados.

2. Administración de fármacos

La administración de anfetamina (d-anfetamina sulfato; C₁₈H₂₆N₂SO₄; Sigma-Aldrich a-5880) fue por vía subcutánea (sc) y diluida en solución salina fisiológica estéril (0,9 % NaCl; volumen de inyección, 0,5 ml/Kg). La dosis administrada fue de 4 mg/Kg (calculada a partir de la base), la cual se eligió en base a estudios previos de nuestro laboratorio (Rotllant *et al.*, 2007; 2010).

Por otro lado, se utilizó el clorhidrato de Metilfenidato ($C_{14}H_{19}NO_2HCl$; 0,5 mg/kg; Sigma-Aldrich M289) administrado por vía sc y diluido en solución salina fisiológica estéril (0,9 % NaCl; volumen de inyección, 0,5 ml/Kg).

3. Procedimientos de estrés.

3.1. Natación forzada

En este tipo de prueba, se obliga al animal al nado, impidiendo el apoyo de las patas traseras en la superficie del suelo del tanque. La natación forzada es considerada un estímulo estresante de carácter mixto (con gran componente emocional) y de moderada intensidad (Dal-Zotto *et al.*, 2000; ver revisión en Armario *et al.*, 2012). Se utilizó un cilindro de plástico (plexiglás) transparente de 40 cm de altura y 20 cm de diámetro apoyado sobre una base de 25 x 25 cm, con agua a 36 °C hasta los 24 cm de altura. Cada cilindro queda individualizado entre paredes negras para evitar el contacto visual entre animales. La duración de la prueba fue de 30 minutos y, una vez finalizada ésta, los animales se secaron con una toalla y se renovó el agua de los tanques para el siguiente test.

3.2. Olor al depredador

Se utilizaron fragmentos de toalla de algodón impregnados con olor a gatos no castrados de 5 años de edad. Cada fragmento de toalla fue conservado a -20 °C hasta el día de la prueba. Se utilizaron cajas rectangulares de plástico duro con unas dimensiones de 56 x 36,5 x 31 cm. Ésta fue dividida en tres regiones de igual área donde la zona 1 (Z1) contenía el fragmento de toalla impregnado con el olor, la zona 2 (Z2) era la región intermedia y, la zona 3 (Z3) ocupaba la región más alejada al fragmento de toalla (Muñoz-Abellan *et al.*, 2012)

3.3. Inmovilización en plancha

La inmovilización en plancha es uno de los estímulos estresantes de categoría predominantemente emocional más severos, de acuerdo con la intensidad de la respuesta fisiológica a la misma (Martí *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2002; Armario *et al.*, 2004). Consiste en la restricción total de movimiento del animal sujetando sus 4 extremidades

con cinta adhesiva a unas guías metálicas ancladas una tabla de madera. La cabeza queda fija por dos paredes verticales (7 x 6 cm) y el lomo del animal por una malla ancha (10 cm) de piel acabada en un velcro. De esta manera se evita que el animal pueda sufrir algún daño físico derivado de las fuertes sacudidas que realizan al intentar escapar (Belda *et al.*, 2008; Gagliano *et al.*, 2008).

4. Procedimientos histológicos

4.1. Extracción y procesamiento del encéfalo

Una vez realizados los diferentes procedimientos experimentales los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria en una cámara saturada con Isoflurano (Laboratorios Esteve), suministrado por un equipo de anestesia de gases (Cibertec) conectado a una bombona de oxígeno medicinal (Air Liquide Medicinal). Una vez los animales se encontraban bajo anestesia profunda, se los mantuvo anestesiados durante la fase inicial de la perfusión introduciendo la cabeza del animal en un recipiente que contenía un algodón impregnado en Isoflurano. La perfusión se realizó por vía transcardíaca, primero con solución salina estéril (0,9% NaCl) a 4 °C durante 2 minutos y, posteriormente, con paraformaldehído (4% PFA; Sigma) en tampón borato (3,8% Tetraborato Sódico; Sigma) a 4°C durante 10 minutos.

Una vez finalizada la perfusión, se extrajeron los encéfalos y se sumergieron en solución fijadora (4% PFA en 3,8% Tetraborato Sódico) durante 24 horas a una temperatura de 4°C para completar el proceso de fijación. Transcurrido este periodo de fijación, los encéfalos se cambiaron a una solución crioprotectora (0,2 M NaCl; 43 nM fosfato potásico, KPBS; y sacarosa al 30%) y se mantuvieron a una temperatura de 4 °C hasta que éstos se sumergieron completamente (entre 2 y 3 días). Seguidamente, los encéfalos fueron congelados con isopentano enfriado en CO₂ sólido (\approx -45 °C) y se conservaron a una temperatura de -80 °C hasta ser cortados coronalmente, de manera seriada y con un grosor de 14 μ m con un criostato (Leica CM3050 S). Las secciones se conservaron en solución anticongelante (fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,3, 30% etilenglicol, 20% glicerol) a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

4.2. Obtención de las ribosondas

Las diferentes ribosondas antisentido para los mRNA de los marcadores, GAD67, VGlut1, D2R, CRH, TH y c-fos, además de la sonda intrónica de CRH (hnCRH) fueron generadas mediante transcripción *in vitro* a partir de fragmentos de cDNA de rata (SP6/T7/T3 Transcription Kit, Roche; ver Tabla 1) subclonados en sus respectivos plásmidos (ver Tabla 1). En cada transcripción se utilizó 1 µg de plásmido digerido como DNA molde y fluoresceína como nucleótido marcado a excepción de c-fos y hnCRH, que fueron marcados con digoxigenina (DIG/Fluorescein RNA Labeling Mix 10X conc, Roche; ver Tabla 1) y α-³⁵S-UTP, respectivamente. Una vez finalizada la transcripción, se procedió a digerir con DNAsa (SP6/T7/T3 Transcription Kit, Roche) los restos de cDNA molde. Posteriormente, se añadieron 40 µl de tampón STE (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl; 1mM EDTA, ph 8,0) y se realizó una incubación de 5 minutos a 65 °C para la inactivación de las enzimas. Se extrajeron las diferentes sondas mediante columnas de filtración en gel (mini Quick Spin RNA Columns, Roche) y se guardaron a -20 °C hasta su uso en los respectivos ensayos de doble hibridación *in situ* fluorescente (dFISH) o radioactiva (ISH).

Tabla 1. Ribosondas marcadas.

Ribosonda	Plásmido	Origen	Polimerasa	Nucleótido marcado	Tiempo revelado
GAD67	pBluescript SK-I	Brain Research Institute, UCLA, Los Angeles, CA, USA.	T3	Fl	8'
VGlut1	pGEM - T easy		SP6	Fl	6'
D2R	pGEM Blue	Dr. Rosario Moratalla, CSIC, Madrid, España.	T7	Fl	6'
CRF	PGEM-4Z	Dr. Serge Rivest, CHUL Research Center, Quèbec, Canada.	SP6	Fl	5'
TH	pBluescript SK-I	Dr. Esther Sabban, New York Medical College, NY, USA.	T7	Fl	6'
c-fos	pBluescript SK-I	Dr. I. Verma, The Salk Institute, CA, USA	T7	DIG	8'
hn CRH	pGEM3	DR. S. Watson, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA.	T7	[α- ³⁵ S]-UTP	24 horas *
* Tiempo de exposición a la película					

4.3. Hibridación *in situ*

Previamente a la realización de la dFISH, las secciones se lavaron con KPBS para retirar la solución anticongelante y se montaron sobre portaobjetos (Superfrost Plus Slides, Thermo Scientific). Posteriormente, las secciones se dejaron secar durante toda la noche (O/N, del inglés: *overnight*) y se conservaron a -20 °C en cajas selladas conteniendo un agente desecante (Silica Gel PS, Fluka) hasta el inicio de la prueba.

El protocolo seguido para la realización de la ISH de la sonda intrónica de CRH está previamente descrito en Vallès y colaboradores (2003). Para la dFISH se usó un protocolo adaptado de Swanson y Simmons (1988). Todas las soluciones empleadas tanto en la pre-hibridación como en la hibridación, fueron tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) y esterilizadas mediante autoclavado para evitar contaminación por RNAsas.

El día del inicio de la prueba, las secciones se retiraron del congelador, se dejaron atemperar durante 30 minutos y se fijaron durante otros 30 minutos en PFA. Posteriormente, se realizaron 4 baños de 5 minutos en KPBS para eliminar los restos de fijador y se realizó una digestión proteica durante 15 min a 37 °C con Proteinasa K (Roche) a una concentración de 0,01 mg/ml en un buffer adecuado (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0). Se detuvo la digestión proteica con H₂O DEPC y se procedió a la acetilación de las muestras con anhídrido acético (0,25 %) en 250 ml de Trietanolamina (TEA 0,1 M, pH 8,0). Posteriormente, se realizó un lavado de 5 min en una solución salina conteniendo citrato de sodio (2X SSC: 0,3 M NaCl; 0,03 M citrato sódico tribásico). Para finalizar, las muestras se deshidrataron por concentraciones crecientes de Etanol (50%, 70%, 95% y 2x 100%) dejándose secar durante un tiempo mínimo de 1 hora. Una vez secas las muestras, se añadieron 150 µl de solución de hibridación (50% formamida; 0,3 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1x Solución Denhardt's; 10% dextran sulfato; 500 g/L tRNA de extracto de levadura y; dithiothreitol, DTT 10 mM) conteniendo las diferentes sondas y se dejaron hibridar durante 16-18 horas a 60 °C.

Al día siguiente tras retirar los cubreobjetos se realizaron 4 baños en SSC 4X a 37 °C y una digestión con RNAsa A (Roche) 0,02 mg/ml en su buffer correspondiente (NaCl 0,5 M; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y EDTA 1 mM, pH 8,0) durante 30 minutos a 37 °C. Seguidamente, se realizaron baños en concentraciones decrecientes de SSC (2X, 1X, 0,5X) acabando en un último baño de alta astringencia (SSC 0,1X) durante 30 minutos a 65 °C. Tras el último lavado en SSC 0,1X, las secciones se traspasaron a un tampón tris salino-Tween 20 (T-TBS: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20). Posteriormente, se bloquearon los posibles restos de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%

en un tampón tris salino (TBS: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl) durante 30 minutos a RT en agitación suave. Una vez finalizado el bloqueo de la peroxidasa, se procedió a bloquear la unión inespecífica durante 1 hora a RT en solución de bloqueo (2% seroalbúmina bovina, BSA; 3% suero fetal de ternero, FCS en T-TBS). Tras este tiempo, se retiró el exceso de solución de bloqueo y se añadieron 150 µl del anticuerpo contra Digoxigenina conjugado con peroxidasa (Anti-DIG-POD, Roche) a una concentración de 1:750 en tampón de anticuerpo (2% FCS; 0,1% BSAc; 0,1% Tween 20 en TBS) O/N a 4 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las secciones 4 veces durante 5 minutos en T-TBS para retirar el exceso de solución de anticuerpo y se procedió a amplificar la señal mediante el sistema tiramida-cianina 5 (TSA-Plus Cyanin 5, Perkin Elmer) que da como resultado un precipitado fluorescente rojo lejano (pico de emisión a 660 nm). Se añadieron 80 µl a cada portaobjetos con TSA-Cy5 a una concentración de 1:50 en solución de amplificación y se dejó actuar durante 8 min. Una vez amplificada la señal, se lavaron las secciones 2 veces en T-TBS durante 5 minutos y se procedió a bloquear la POD (anteriormente descrito) para evitar el cruzamiento de señal de la primera amplificación a la segunda (ya que ambos anticuerpos están conjugados a POD). Posteriormente, se procedió a bloquear de nuevo la unión inespecífica durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras retirar el exceso de solución de bloqueo, se añadieron 150 µl del anticuerpo contra Fluoresceína conjugado con POD (Anti-Fl-POD, Perkin Elmer) a una concentración de 1:250 en solución de anticuerpo (descrita anteriormente) y se dejó incubar O/N a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las secciones 4 veces durante 5 minutos en T-TBS para retirar el exceso de solución de anticuerpo y se procedió a amplificar la señal mediante el sistema tiramida-fluoresceína (TSA-Plus Fl, Perkin Elmer) que da como resultado un precipitado fluorescente verde (pico de emisión a 519 nm). Se añadieron 80 µl a cada portaobjetos con TSA-Fl a una concentración de 1:50 en solución de amplificación y se dejó actuar entre 5 y 10 min en función de la sonda utilizada (ver tabla X).

Tras la última amplificación, se realizó un lavado durante 5 minutos en T-TBS y se hizo la tinción nuclear con Hoechst 33258 pentahydrate (Invitrogen) a 1:10000 en TBS durante 5 minutos. Una vez finalizada, se lavaron las secciones en TBS durante 5 minutos para retirar el exceso de Hoescht y se transfirieron a H₂O MiliQ para eliminar el exceso de sales. Por último, las secciones se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron cubiertas con medio de montaje de base acuosa (Fluoromount, Sigma-Aldrich) y sellados con esmalte (entellan, Merck) bajo campana. Una vez secado el esmalte, los portaobjetos se conservaron a 4 °C hasta la captura de imagen mediante microscopio confocal.

5. Captura y análisis de imágenes

Se captaron entre 2 y 6 imágenes por animal y área con un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las condiciones de la captura para el mRNA de c-fos (potencia de láser, gain, digital offset y zoom) fueron siempre las mismas; en cuanto a las condiciones para el mRNA del fenotipo, algunos de los parámetros se fueron ajustando para su mejor visualización. Para el procesamiento y el análisis de las imágenes se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (FIJI, versión 1.51). Las imágenes originales no fueron modificadas para su posterior análisis. Para el análisis de las imágenes se procedió de la siguiente manera: **i)** Se procedió a separar cada imagen en sus tres canales (tinción nuclear, fenotipo y c-fos) y, de manera manual, y mediante el uso de la herramienta “círculo”, se contaron primero las neuronas correspondientes al mRNA del fenotipo (**fenotipo+**); **ii)** Una vez determinadas todas las neuronas positivas para el fenotipo se trasladó dicha selección al canal de mRNA de c-fos, determinando así el número de neuronas activas (c-fos+) para dicho fenotipo (**c-fos+/fenotipo+**); **iii)** en el canal de c-fos, se seleccionaron las neuronas c-fos+ que no se correspondían al fenotipo (**c-fos+/fenotipo-**) y; **iv)** en última instancia, una vez obtenidos estos dos parámetros se calculó el **número total de c-fos+**: suma de “c-fos+/fenotipo+” + “c-fos+/fenotipo-“. Se consideraron neuronas positivas a partir de 3 desviaciones estándar por encima del fondo.

6. Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, 2015. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Los factores entre-sujeto fueron ANF (con 2 niveles: con y sin administración de anfetamina), MFD (con 2 niveles: con y sin administración de metilfenidato) y NADO (con 2 niveles: con y sin exposición a la natación forzada), en el caso de los Capítulos 1 y 2; y OLOR (con 2 niveles: presencia o no presencia de olor del depredador) e IMO (con 2 niveles: exposición o no a la inmovilización en plancha), en el caso del Capítulo 3. Para el análisis de la distribución de intensidades se introdujo un factor intra-sujeto RANGO (con 6 niveles de rango de intensidades).

La mayor parte de los datos fueron analizados mediante el modelo lineal generalizado de dos factores (GzLM, McCulloch y Searle, 2001). Sin embargo, cuando se incorporaban medidas repetidas se utilizó el modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE) (Hardin y Hilbe, 2003). Las pruebas generalizadas (GzLM y GEE) pueden realizarse cuando no se obtiene homogeneidad de varianzas y también cuando se han perdido algunos datos (*missings*). La significación de los efectos estadísticos encontrados se determinó por la prueba de chi-cuadrado de Wald usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida. En el caso de encontrar interacciones estadísticamente significativas, se realizó la descomposición de Bonferroni secuencial. El criterio de significación en todos los casos se estableció en $p < 0.05$.

Los gráficos se realizaron mediante el programa Graph-Pad Prism (versión 5 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA).

Resultados

Resultados

Capítulo 1. *Interacción entre anfetamina y estrés: efectos a nivel del SNC*

Introducción

Los estímulos estresantes emocionales y la anfetamina presentan un patrón de activación del SNC similar, compartiendo áreas concretas como la mPFC, la amígdala o el PVN (Rotllant *et al.*, 2010, 2013). Por lo tanto, parece probable que el sustrato neurobiológico de dicha interacción se encuentre en varias de las áreas activadas en común por el estrés y la anfetamina. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan abordado esta cuestión, siendo pioneros los llevados a cabo por el laboratorio de Badiani y colaboradores (Badiani *et al.*, 1998; Uslaner *et al.*, 2001a, 2001b; Day *et al.*, 2001). Estos estudios han demostrado que la activación de *c-fos* causada por la inyección aguda de anfetamina o cocaína es diferente en función de si dicha administración se da en un lugar familiar para la rata o en un ambiente nuevo, que representa una situación estresante de baja intensidad. Concretamente, la inducción de *c-fos* en mPFC (Uslaner *et al.*, 2001a), AcbC y CPU (Badiani *et al.*, 1998) y BLA (Day *et al.*, 2001) es mayor cuando la anfetamina es administrada en un ambiente nuevo. Sin embargo, en la CeA, la administración de anfetamina en un ambiente nuevo reduce la expresión de *c-fos* causada por el estímulo más potente, que en el caso de esta estructura es la anfetamina (Day *et al.*, 2001; 2005). Estos resultados indican que la exposición simultánea a la anfetamina y al estrés interaccionan entre sí, dando lugar a diferentes patrones de activación: efecto sumatorio y sinergia negativa. En nuestro laboratorio hemos confirmado la existencia de esta sinergia negativa entre estímulos estresantes y anfetamina (Gómez-Román *et al.*, 2016). En este estudio, la anfetamina incrementaba por sí misma los niveles de las hormonas del eje HPA, pero reducía la respuesta de ACTH y glucosa a estímulos estresantes tanto sistémicos (IL-1 β) como emocionales (natación forzada e inmovilización). Esta sinergia negativa a nivel periférico se confirmaba también a nivel del SNC, basándonos en la expresión de *c-fos* en una estructura crítica para la respuesta del estrés como el PVN.

Sin embargo, estos estudios no permitían evaluar el fenotipo de las poblaciones neuronales activadas con cada estímulo y cómo éstas se ven afectadas cuando ambos estímulos se presentan de manera simultánea. Por esta razón, nos propusimos valorar, utilizando la doble hibridación *in situ* fluorescente (dFISH), la activación de las diferentes poblaciones neuronales en algunas áreas críticas que se activan tanto con la amfetamina (a una dosis similar a la utilizada anteriormente en nuestros estudios) como por la exposición a un estímulo estresante de carácter predominantemente emocional como es la natación forzada.

Diseño experimental

40 ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley fueron distribuidas de manera aleatoria en los siguientes grupos: **i) BASAL** (n = 4), no se manipuló y se sacrificó en condiciones basales; **ii) V-H** (n = 6), fueron inyectadas con vehículo e inmediatamente devueltas a sus cajas de estabulación (*homecage*); **iii) A-H** (n = 10), fueron inyectadas con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devueltas a sus cajas de estabulación (*homecage*); **iv) V-S** (n = 10), fueron inyectadas con vehículo e inmediatamente expuestas a 30 minutos de natación forzada y; **v) A-S** (n = 10), fueron inyectadas con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuestas a 30 minutos de natación forzada. Transcurridos 30 minutos, todos los animales se perfundieron para la obtención de los encéfalos (ver **Tabla 2**). Posteriormente, mediante dFISH se valoró la activación de las principales poblaciones neuronales en aquellas áreas relacionadas con la respuesta del estrés que se muestran en la **Figura 8**. El grupo BASAL sirvió como control negativo del experimento y no fue incluido en el análisis estadístico.

Tabla 2. Protocolo experimental Capítulo 1.

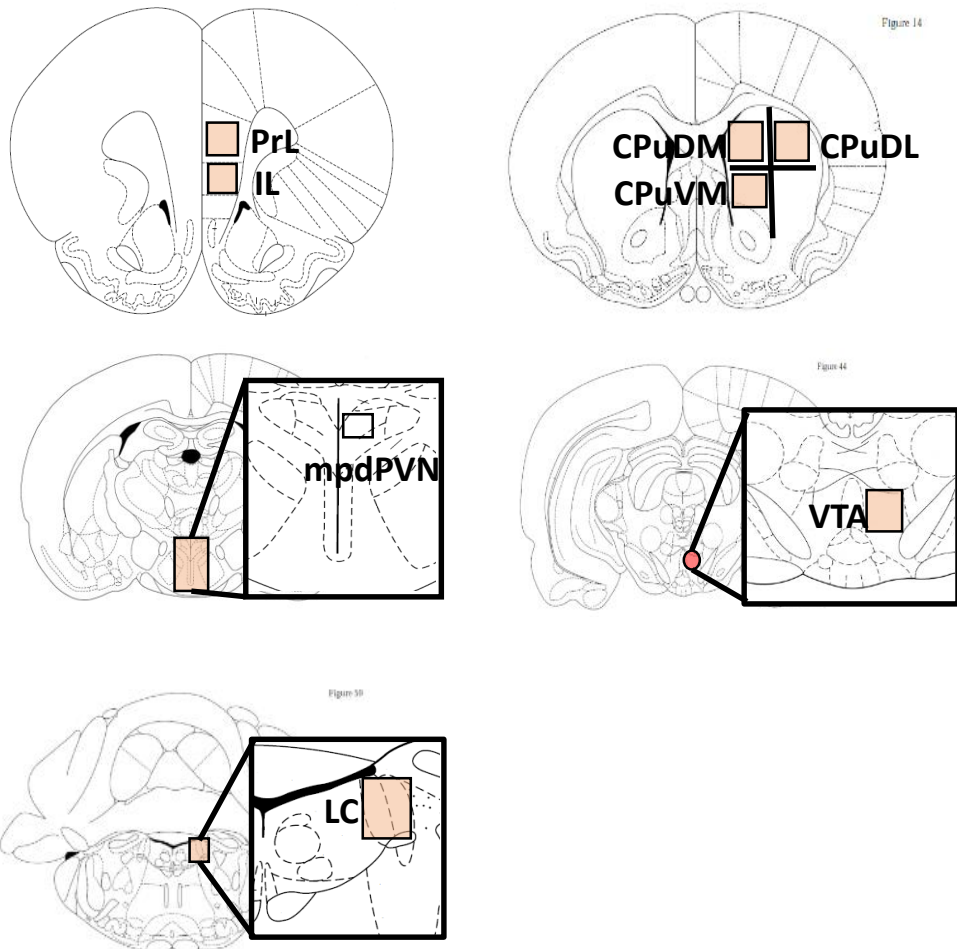
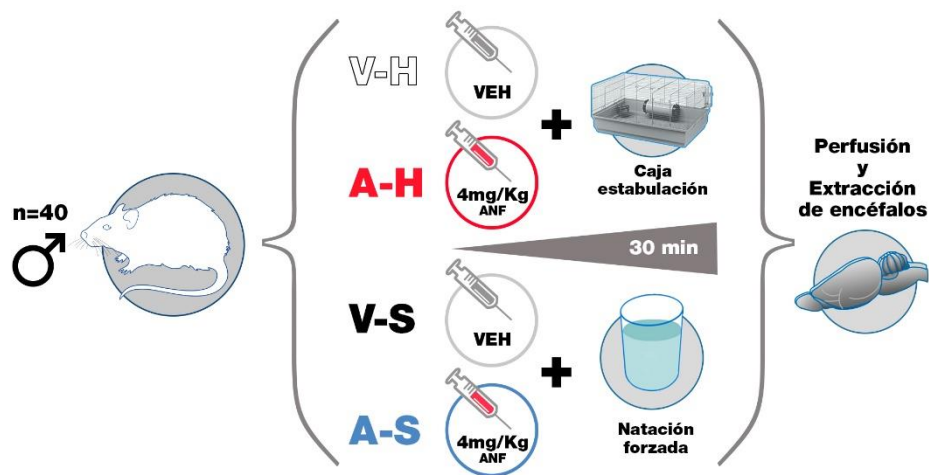


Figura 8. Esquemas representativos de las áreas analizadas. CPuDL: subdivisión dorsolateral del estriado; CPuDM: subdivisión dorsomedial del estriado; CPuVM: subdivisión ventromedial del estriado; IL: subdivisión infralímbica de la corteza prefrontal medial; LC: *locus coeruleus*; PrL: subdivisión prelímbica de la corteza prefrontal medial; modPVN: región parvocelular dorsal del núcleo paraventricular del hipotálamo; VTA: área tegmental ventral.

Resultados

Los resultados de las diferentes dFISH se analizaron mediante el modelo lineal generalizado (*Generalized Linear Models, GzLM*) y el modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE) cuando se incorporaron medidas repetidas. Los dos factores entre-sujeto fueron ANF (con 2 niveles: con y sin administración de anfetamina) y NADO (con 2 niveles: con y sin exposición a la natación forzada). Para el análisis de la distribución de intensidades se introdujo un factor intra-sujeto RANGO (con 6 niveles de rango de intensidades). En la **Tabla 3** se muestran las significaciones estadísticas generales para cada parámetro analizado. Así mismo, los detalles de las comparaciones entre grupos se comentarán a medida que se vayan desgranando los resultados.

En la **Figura 9** se muestran imágenes de la **activación de la población glutamatérgica** en la PrL. La **Figura 10** muestra los resultados de la descomposición de la interacción ANF*NADO, observándose que la exposición a los estímulos por separado fue capaz de incrementar, respecto al grupo V-H, el número de neuronas c-fos⁺ ($p < 0,001$ en ambos casos), c-fos⁺/VGlut1⁺ ($p < 0,001$ en ambos casos), c-fos⁺/VGlut1⁻ ($p < 0,05$ para A-H; $p < 0,001$ para V-S) y el % colocalización ($p < 0,001$ en ambos casos). La exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada provocó una disminución en el número total de c-fos⁺ ($p < 0,01$), c-fos⁺/VGlut1⁺ ($p < 0,05$), c-fos⁺/VGlut1⁻ ($p < 0,01$) y el % colocalización ($p < 0,01$), respecto al grupo V-S. Por último, observamos un efecto del factor NADO en el número total de neuronas VGlut1+ ($p < 0,001$).

Tabla 3. Efectos globales del análisis estadístico de las diferentes dFISH realizadas.

			ANF		NADO		ANF*NADO	
# Neuronas c-fos activas (c-fos+)	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL		1,9	NS	93,2	p < 0,001	27,6
IL			6,1	p < 0,05	8,1	p < 0,01	10,3	p = 0,001
GAD67	PrL		0,5	NS	40,7	p < 0,001	26,1	p < 0,001
	IL		15,1	NS	16,4	p < 0,001	6,3	p < 0,05
D2R	CPuDM		65,2	p < 0,001	30,8	p < 0,001	0,002	NS
	CPUDL		108,7	p < 0,001	44,1	p < 0,001	0,1	NS
	CPuVM		379,8	p < 0,001	6,9	p < 0,01	26,1	p < 0,001
CRH	PVN		9,3	p < 0,01	51,5	p < 0,001	20,2	p < 0,001
TH	VTA		6,5	p < 0,05	0,7	NS	4,7	p < 0,05
	LC		73,4	p < 0,001	181,6	p < 0,001	57,8	p < 0,001
			ANF		NADO		ANF*NADO	
# Neuronas fenotipo+/c-fos+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL		2,8	NS	77,1	p < 0,001	20,7
IL			4,4	p < 0,05	5,9	p < 0,05	9,1	p < 0,01
GAD67	PrL		2,9	NS	54,6	p < 0,001	22,5	p < 0,001
	IL		12,3	p < 0,001	25,7	p < 0,001	2,1	NS
D2R	CPuDM		7,9	p < 0,01	103,1	p < 0,001	15,2	p < 0,001
	CPUDL		1,6	NS	54,6	p < 0,001	7,8	p < 0,01
	CPuVM		0,03	NS	8,4	p < 0,01	18,5	p < 0,001
CRH	PVN		16,6	p < 0,001	70,03	p < 0,001	25,03	p < 0,001
TH	VTA		0,3	NS	0,6	NS	2,1	NS
	LC		91,3	p < 0,001	153,2	p < 0,001	57,5	p < 0,001
			ANF		NADO		ANF*NADO	
# Neuronas fenotipo-/c-fos+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL		0,2	NS	30,6	p < 0,001	13,6
IL			11,3	p = 0,001	14,8	p < 0,001	7,7	p < 0,01
GAD67	PrL		1,3	NS	32,6	p < 0,001	23,0	p < 0,001
	IL		11,2	p = 0,001	9,1	p < 0,01	5,8	p < 0,05
D2R	CPuDM		111,2	p < 0,001	22,8	p < 0,001	7,7	p < 0,01
	CPUDL		173,9	p < 0,001	14,4	p < 0,001	3,9	p = 0,05
	CPuVM		450,9	p < 0,001	14,6	p < 0,001	17,1	p < 0,001
CRH	PVN		0,02	NS	0,1	NS	1,1	NS
TH	VTA		31,6	p < 0,001	0,7	NS	8,7	p < 0,01
	LC		0,02	NS	17,1	p < 0,001	1,8	NS

		ANF		NADO		ANF*NADO		
vs % Neuronas fenotipo+/c-fos+ Total fenotipo+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	2,1	NS	60,1	p < 0,001	26,4	p < 0,001
		IL	4,9	p < 0,05	4,6	p < 0,05	10,7	p = 0,001
	GAD67	PrL	1,1	NS	40	p < 0,001	22,1	p < 0,001
		IL	10,9	p = 0,001	23,4	p < 0,001	3,7	NS
	D2R	CPuDM	85,6	p < 0,001	48,1	p < 0,001	8,9	p < 0,01
		CPUDL	1,4	NS	48,6	p < 0,001	5,7	p < 0,05
		CPuVM	214,8	p < 0,001	5,6	p < 0,05	15,4	p < 0,001
	CRH	PVN	26,1	p < 0,001	99,7	p < 0,001	44,4	p < 0,001
	TH	VTA	0,3	NS	0,4	NS	2,6	NS
LC		117,1	p < 0,001	199,2	p < 0,001	74,8	p < 0,001	
		ANF		NADO		ANF*NADO		
# Neuronas fenotipo +	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	1,9	NS	20,3	p < 0,001	0,7	NS
		IL	0,0	NS	8,8	p < 0,01	0,1	NS
	GAD67	PrL	1,5	NS	0,1	NS	1,6	NS
		IL	0,9	NS	1,0	NS	1,5	NS
	D2R	CPuDM	1,4	NS	0,3	NS	0,7	NS
		CPUDL	0,1	NS	1,0	NS	1,4	NS
		CPuVM	0,8	NS	0,6	NS	0,0	NS
	CRH	PVN	1,5	NS	7,1	p < 0,008	1,8	NS
	TH	VTA	0,0	NS	3,9	p < 0,05	4,5	p < 0,05
LC		0,0	NS	0,2	NS	0,1	NS	

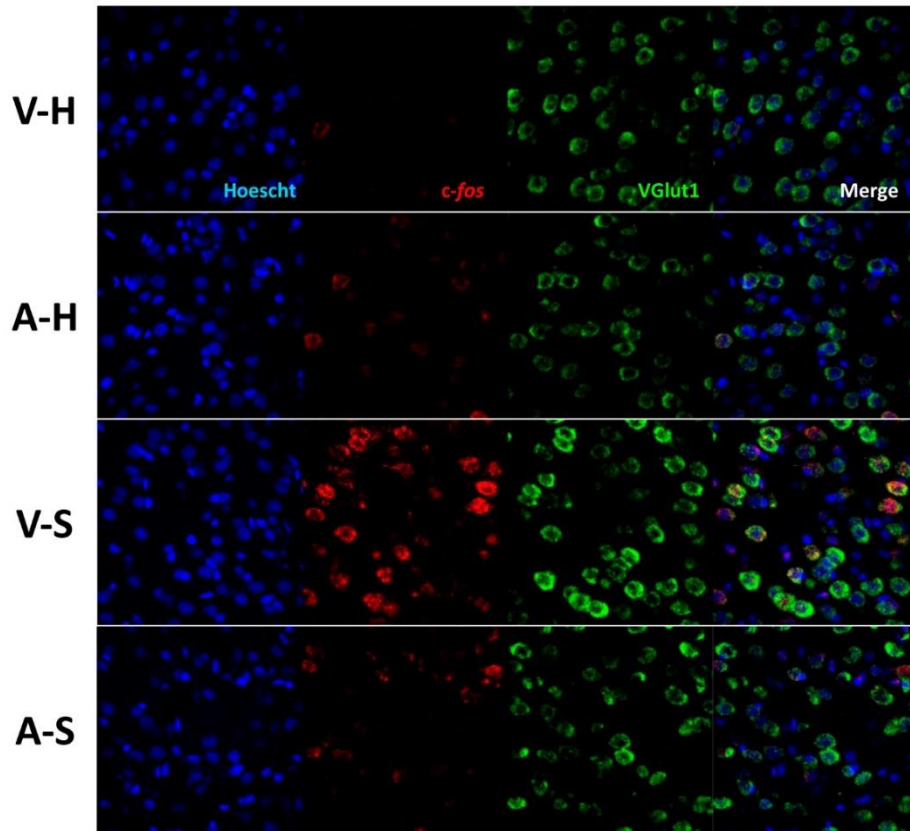


Figura 9. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH VGlut1/*c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada.

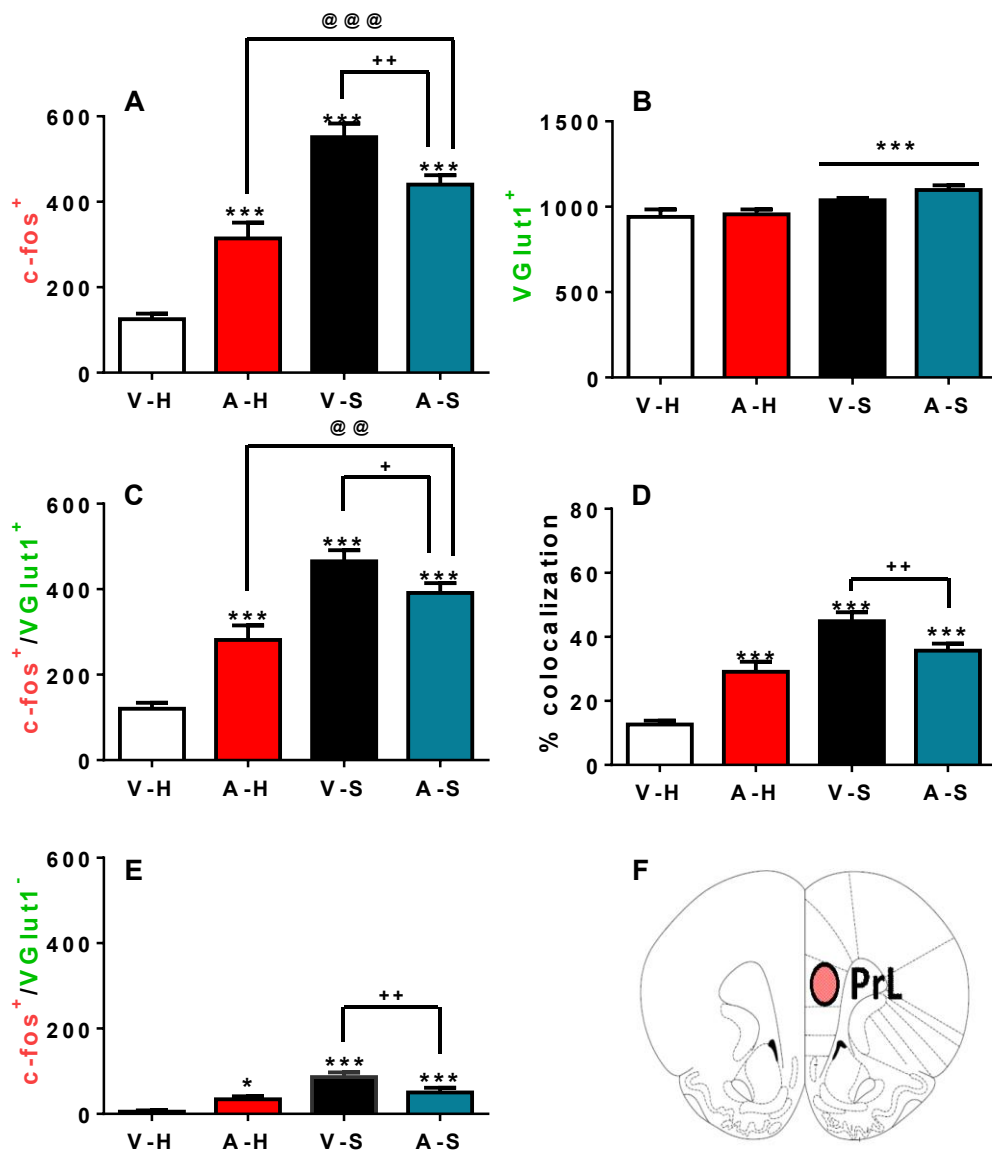


Figura 10. Activación de la población glutamatérgica en la PrL tras la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas VGluT1⁺; **Panel C:** Número de neuronas VGluT1⁺ activadas (c-fos⁺/VGluT1⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas VGluT1⁺ activadas respecto al total de la población VGluT1⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para VGluT1 (c-fos⁺/VGluT1⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. * p < 0,05; *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; + p < 0,05, ++ p < 0,01; @@@ p < 0,001 entre los grupos señalados.

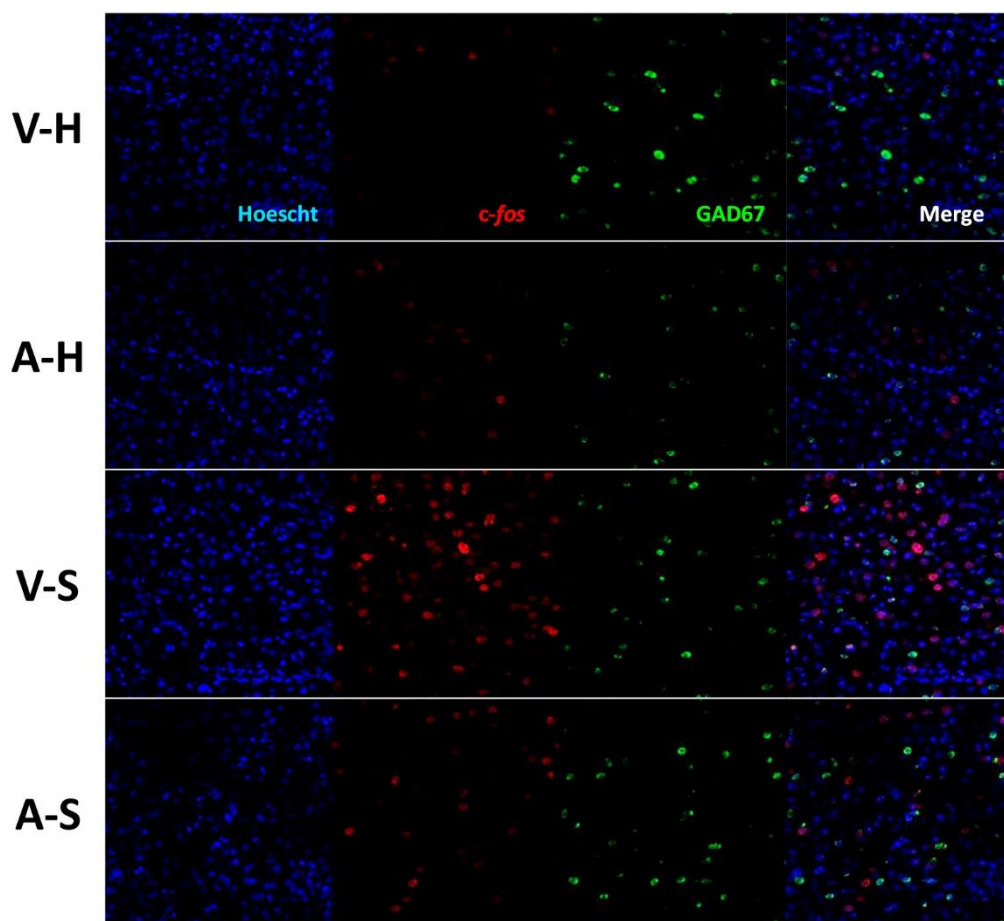


Figura 11. Imágenes representativas captadas a 20X de la dFISH GAD67/*c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada.

En la **Figura 11** se muestran imágenes representativas de la **activación** de la **población GABAérgica** en la PrL. La descomposición de la interacción ANF*NADO (ver **Figura 12**) mostró que tanto la anfetamina como la natación forzada, fueron capaces de incrementar, respecto al grupo V-H, el número de neuronas c-fos⁺ ($p < 0,001$ en ambos casos), c-fos⁺/GAD67⁻ ($p < 0,001$ en ambos casos) y el % de colocalización ($p < 0,05$ respecto a A-H; y $p < 0,001$ respecto a V-S). Sin embargo, únicamente la natación forzada fue capaz de incrementar el número de neuronas c-fos⁺/GAD67⁺ respecto al grupo V-H ($p < 0,001$). La exposición simultánea a ambos estímulos resultó en una disminución del número de neuronas c-fos⁺ ($p < 0,01$), c-fos⁺/GAD67⁺ ($p < 0,001$), c-fos⁺/GAD67⁻ ($p < 0,05$) y el % colocalización ($p < 0,001$), respecto al grupo V-S. Por último, la población total de neuronas GAD67⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

En la **Figura 13** se representa la **activación** de la **población glutamatérgica** en la IL. La descomposición de la interacción ANF*NADO reveló que, tras la exposición a la anfetamina y a la natación forzada por separado, se observa un incremento del número de neuronas c-fos⁺, c-fos⁺/VGlut1⁺, c-fos⁺/VGlut1⁻, y del % colocalización respecto al grupo V-H ($p < 0,001$ en todos los casos). La combinación de los dos estímulos no causó mayor activación que cada estímulo por separado. El número total de neuronas VGlut1⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

En la **Figura 14** se representa la **activación** de la **población GABAérgica** en la IL. La descomposición de la interacción ANF*NADO mostró, tras la exposición a la anfetamina y la natación forzada por separado, un incremento en el número de neuronas c-fos⁺ ($p < 0,001$ en ambos los casos), c-fos⁺/GAD67⁺ ($p < 0,01$ para A-H; y $p < 0,001$ para V-S) y c-fos⁺/GAD67⁻ ($p < 0,01$ en ambos casos), respecto al grupo V-H. Además, se observó un efecto del factor ANF ($p = 0,001$) y del NADO ($p < 0,001$) en el % de colocalización. La exposición simultánea a ambos estímulos resultó en un incremento del número de c-fos⁺/GAD67⁺ respecto al grupo A-H ($p < 0,01$). En el resto de parámetros estudiados dicha exposición simultánea no causó mayor activación que cada estímulo por separado. Por último, el número total de neuronas GAD67⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

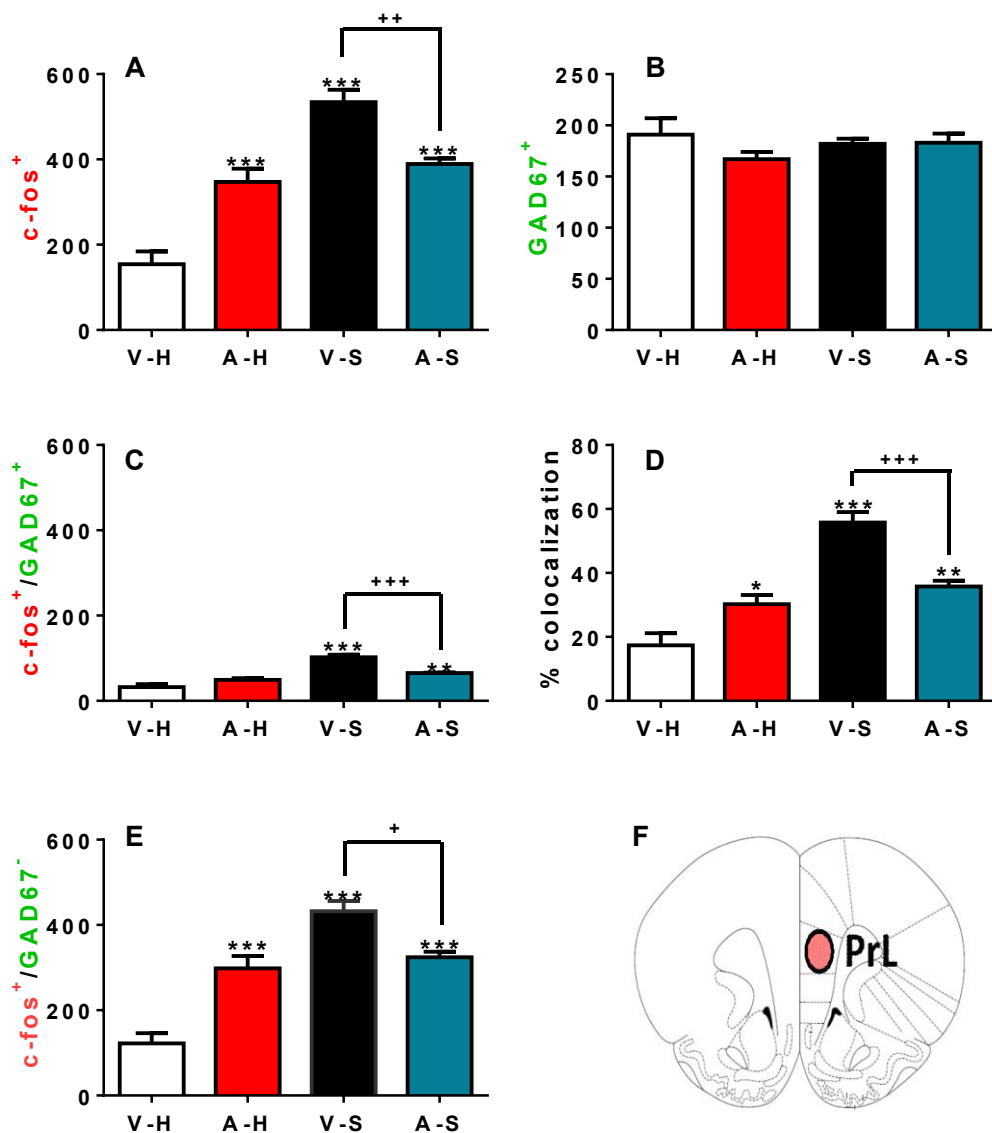


Figura 12. Activación de la población GABAérgica en la PrL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas GAD67⁺; **Panel C:** Número de neuronas GAD67⁺ activadas (c-fos⁺/VGlut1⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas GAD67⁺ activadas respecto al total de la población GAD67⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para GAD67 (c-fos⁺/GAD67⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; + p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001 entre los grupos señalados.

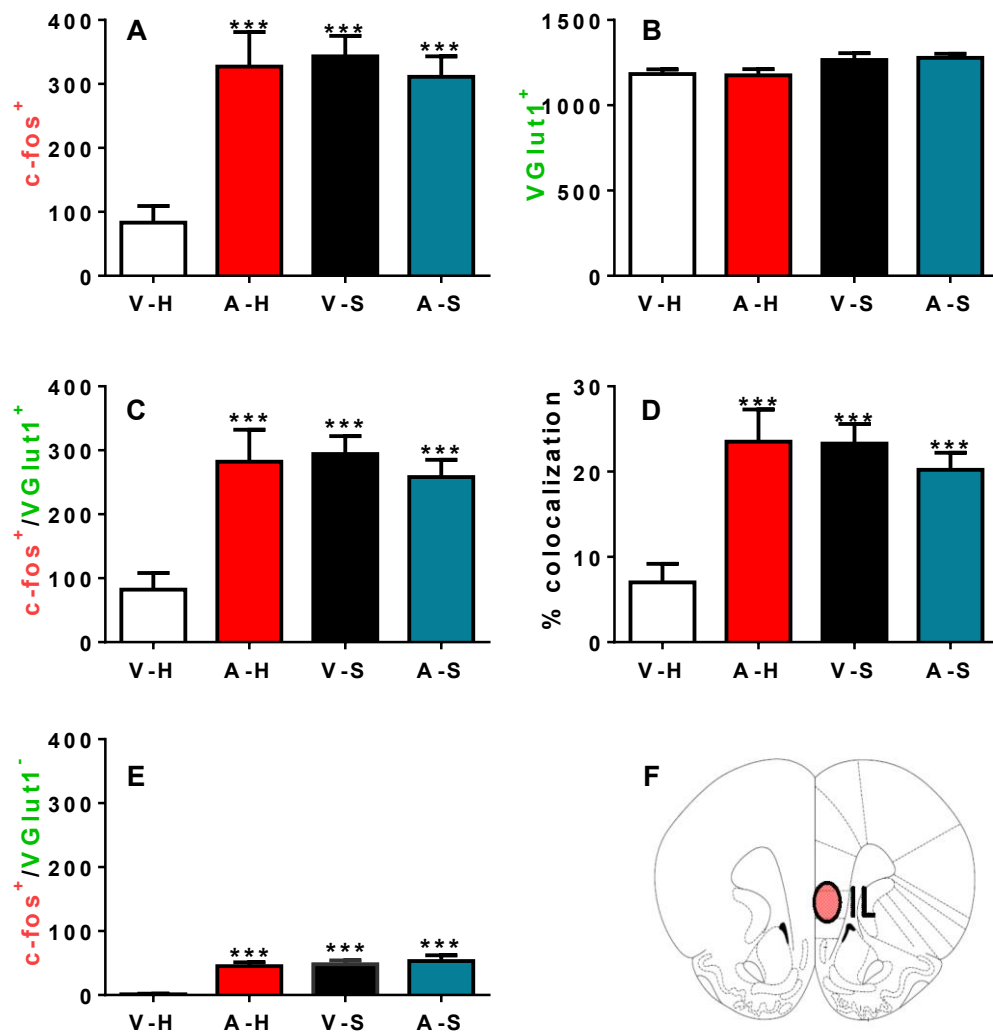


Figura 13. Activación de la población glutamatergica en la IL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas VGlut1⁺; Panel C: Número de neuronas VGlut1⁺ activadas (c-fos⁺/VGlut1⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas VGlut1⁺ activadas respecto al total de la población VGlut1⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para VGlut1 (c-fos⁺/VGlut1⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 vs grupo V-H.

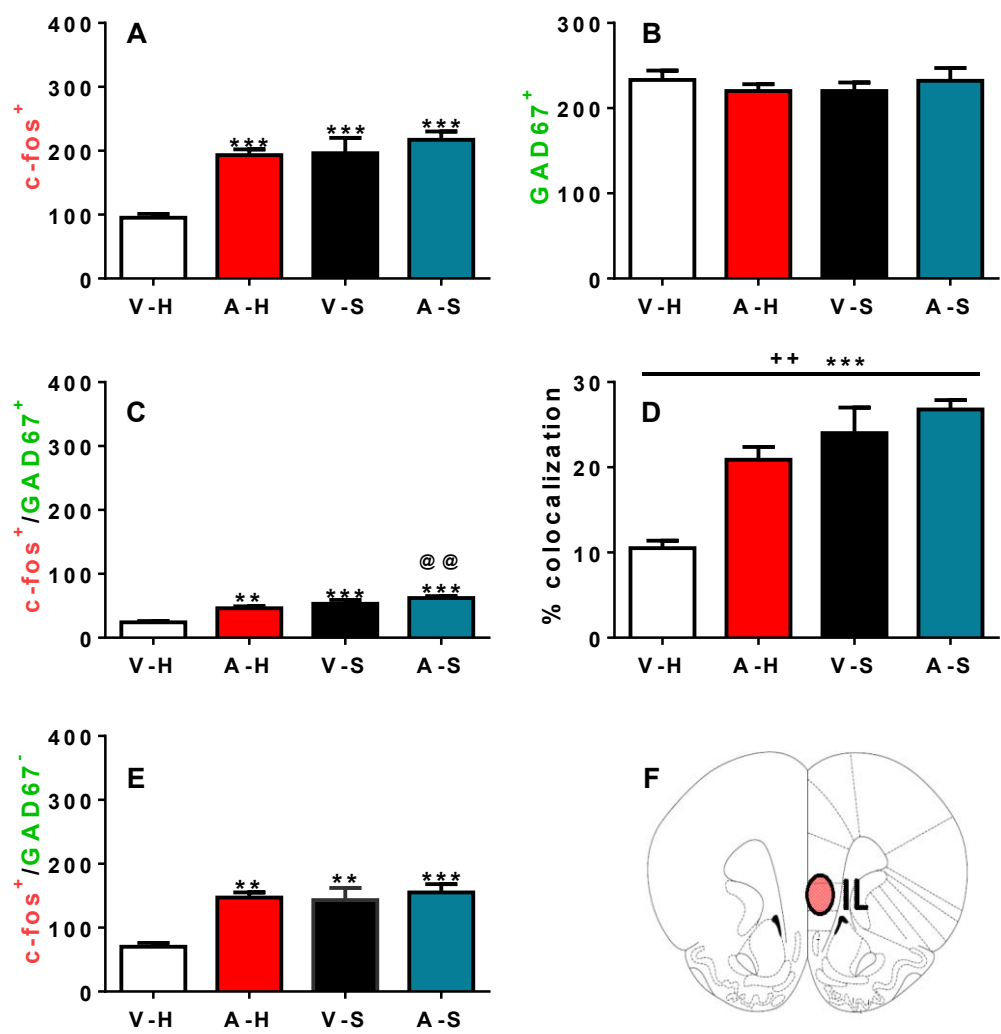


Figura 14. Activación de la población GABAérgica en la IL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas GAD67⁺; Panel C: Número de neuronas GAD67⁺ activadas (c-fos⁺/GAD67⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas GAD67⁺ activadas respecto al total de la población GAD67⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para GAD67 (c-fos⁺/GAD67⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; ++ p < 0,01 efecto del factor ANF; @@ p < 0,01 vs grupo A-H.

En la **Figura 15** se muestran imágenes representativas de la **activación** de la **población D2R** en el **CPuDM**. La **Figura 16** corresponde con los resultados, observándose un efecto del factor ANF ($p < 0,001$) y del NADO ($p < 0,001$) en el número de neuronas c-fos⁺ y en el número de neuronas c-fos⁺/D2R⁻. La descomposición de la interacción ANF*NADO mostró que, únicamente la exposición a la natación forzada fue capaz de incrementar tanto el número de neuronas c-fos⁺/D2R⁺ como el % colocalización respecto al grupo V-H ($p < 0,001$ en ambos casos). La exposición simultánea a la anfetamina y a la natación forzada provocó una disminución del número de neuronas c-fos⁺/D2R⁺ y del % colocalización respecto al grupo V-S ($p < 0,001$ en ambos casos). El número total de neuronas D2R⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

La **Figura 17** muestra los resultados de la **activación** de la **población D2R** en el **CPuDL**. Se observó un efecto del factor ANF ($p < 0,001$) y el NADO ($p < 0,001$) en el número de neuronas c-fos⁺. La descomposición de la interacción ANF*NADO mostró que, mientras la anfetamina únicamente fue capaz de activar las neuronas c-fos⁺/D2R⁻ ($p < 0,001$, respecto al grupo V-H), la natación forzada incrementó exclusivamente las neuronas c-fos⁺/D2R⁺ y el % colocalización ($p < 0,001$ en ambos casos, respecto al grupo V-H). La exposición simultánea a ambos estímulos provocó efectos opuestos: i) una reducción en las neuronas c-fos⁺/D2R⁺ y en el % colocalización respecto al grupo V-S ($p < 0,01$ en ambos casos); y ii) un incremento en las neuronas c-fos⁺/D2R⁻ respecto al grupo A-H ($p < 0,001$). El número total de neuronas D2R⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

La **Figura 18** muestra la **activación** de la **población D2R** en el **CPuVM**. La descomposición de la interacción ANF*NADO reveló un incremento producido por la administración de anfetamina en el número de c-fos⁺ ($p < 0,001$), c-fos⁺/D2R⁺ ($p < 0,01$) y c-fos⁺/D2R⁻ ($p < 0,001$), respecto al grupo V-H. Por su parte, la exposición a la natación forzada incrementó únicamente las neuronas c-fos⁺/D2R⁺ respecto al grupo V-H ($p < 0,001$). La combinación de los dos estímulos resultó en una disminución del número de c-fos⁺ y c-fos⁺/D2R⁻ respecto al grupo A-H ($p < 0,001$ en ambos casos) y del número de c-

$\text{fos}^+/\text{D2R}^+$ respecto al grupo V-S ($p < 0,001$). El número total de neuronas D2R^+ fue similar en todos los grupos experimentales.

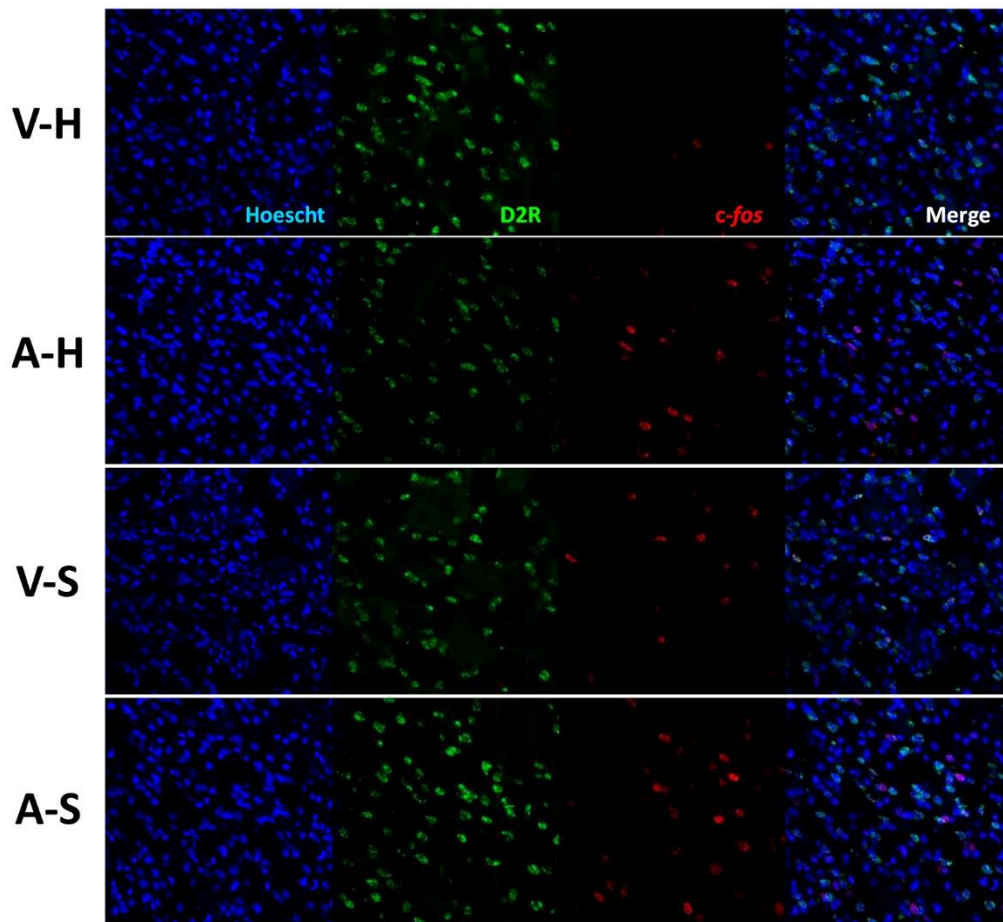


Figura 15. Imágenes representativas captadas a 20X de la dFISH D2R/*c-fos* en el CPuDM tras la exposición simultánea a la amfetamina y a la natación forzada.

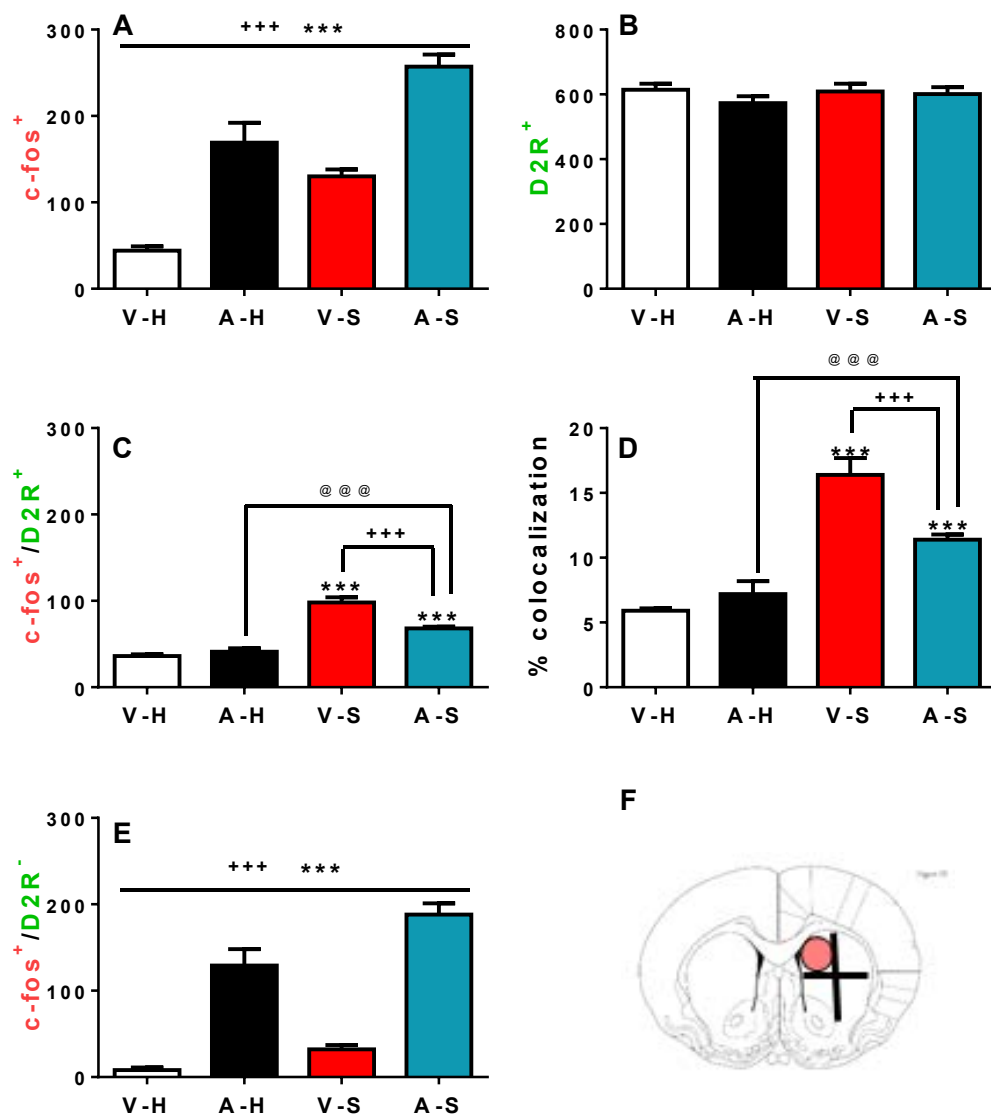


Figura 16. Activación de la población D2R en el CPuDM tras la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas D2R⁺; **Panel C:** Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; +++ p < 0,001 vs grupo V-S o efecto del factor ANF; @@@ p < 0,001 vs A-H.

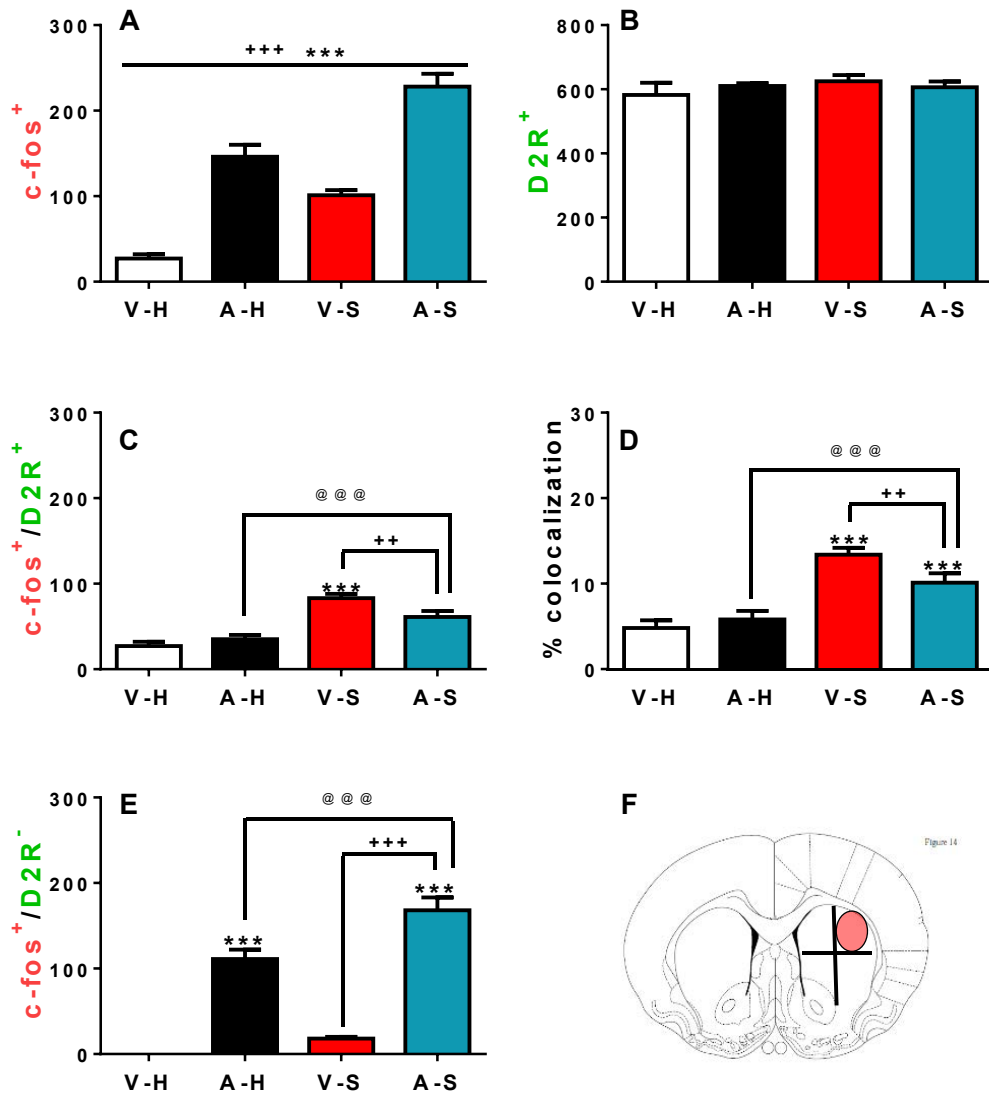


Figura 17. Activación de la población D2R en el CPuDL tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas D2R⁺; **Panel C:** Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 vs grupo V-S o efecto del factor ANF; @@@ p < 0,001 vs A-H.

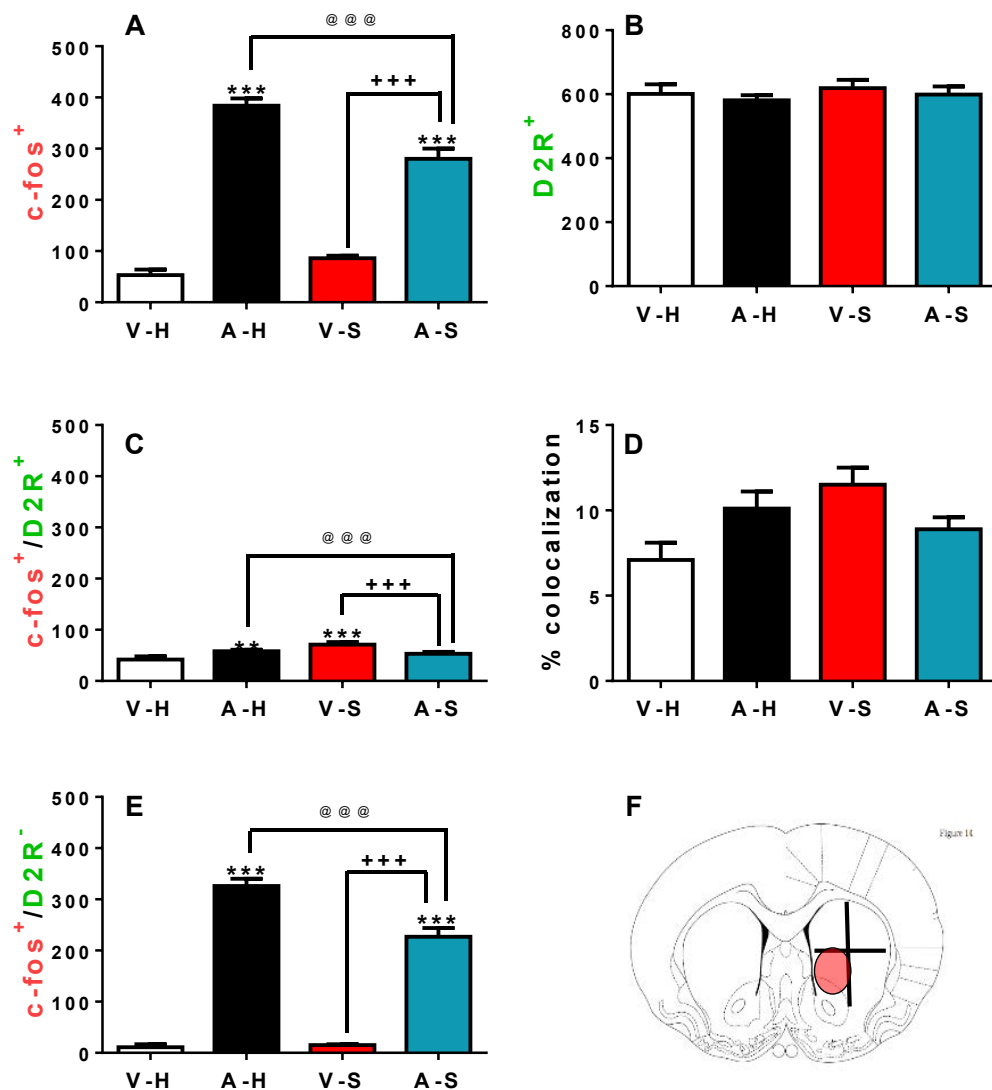


Figura 18. Activación de la población D2R en el CPuVM tras la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas D2R⁺; Panel C: Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabilización; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabilización; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs grupo V-H; +++ p < 0,001 y @@@ p < 0,001 entre los grupos señalados.

Las imágenes representativas de la **activación** de la **población CRHérgica** en el **mpdPVN** se muestran en la **Figura 19**. En la **Figura 20** se muestran los resultados de la descomposición de la interacción ANF*NADO, observándose que la exposición a la anfetamina y la natación forzada por separado dio lugar a un incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺, *c-fos*⁺/CRH⁺, y en el % colocalización respecto al grupo V-H ($p < 0,001$ en todos los casos). La exposición simultánea a ambos estímulos no causó una mayor activación que la natación forzada, pero sí un incremento, respecto al grupo A-H, del número de neuronas *c-fos*⁺ ($p < 0,05$), del número de neuronas *c-fos*⁺/CRH⁺ y del % colocalización ($p < 0,01$ en ambos casos). Además, se observó un efecto del factor NADO que afectó al número total de neuronas CRH⁺ ($p < 0,001$).

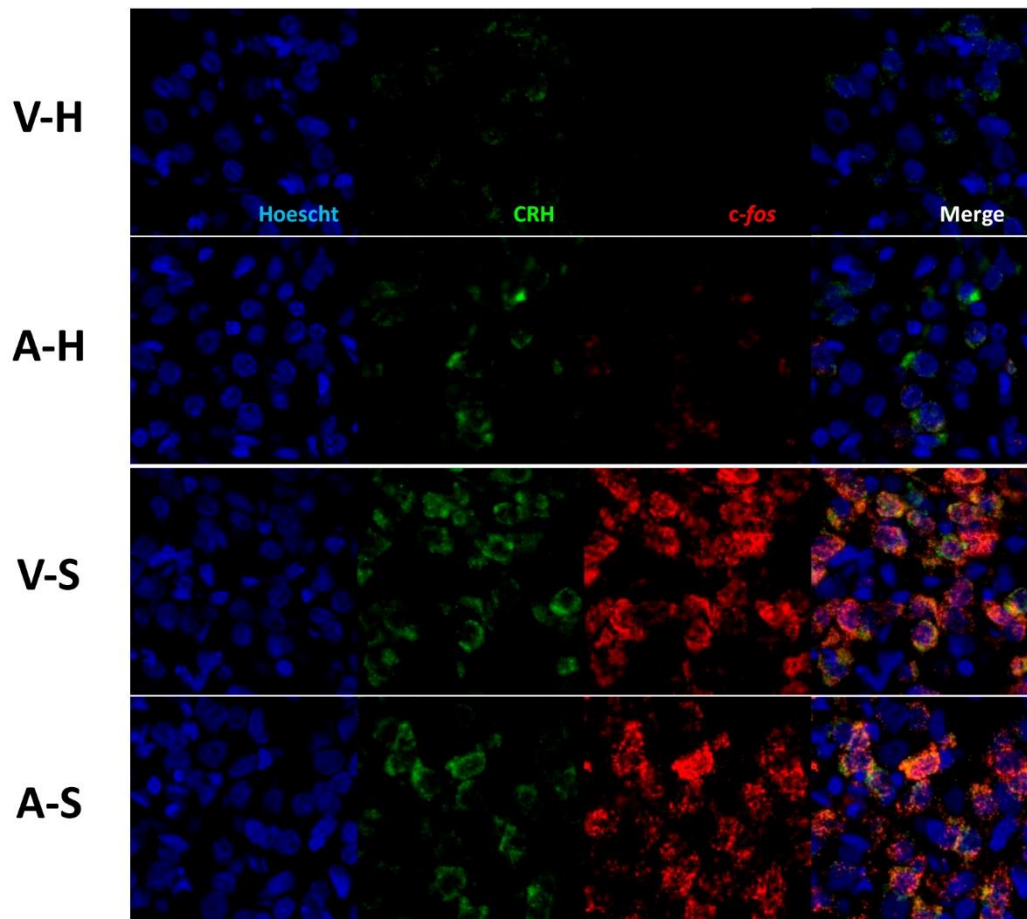


Figura 19. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH CRH/*c-fos* en el mpdPVN tras la exposición simultánea a la anfetamina y a la natación forzada.

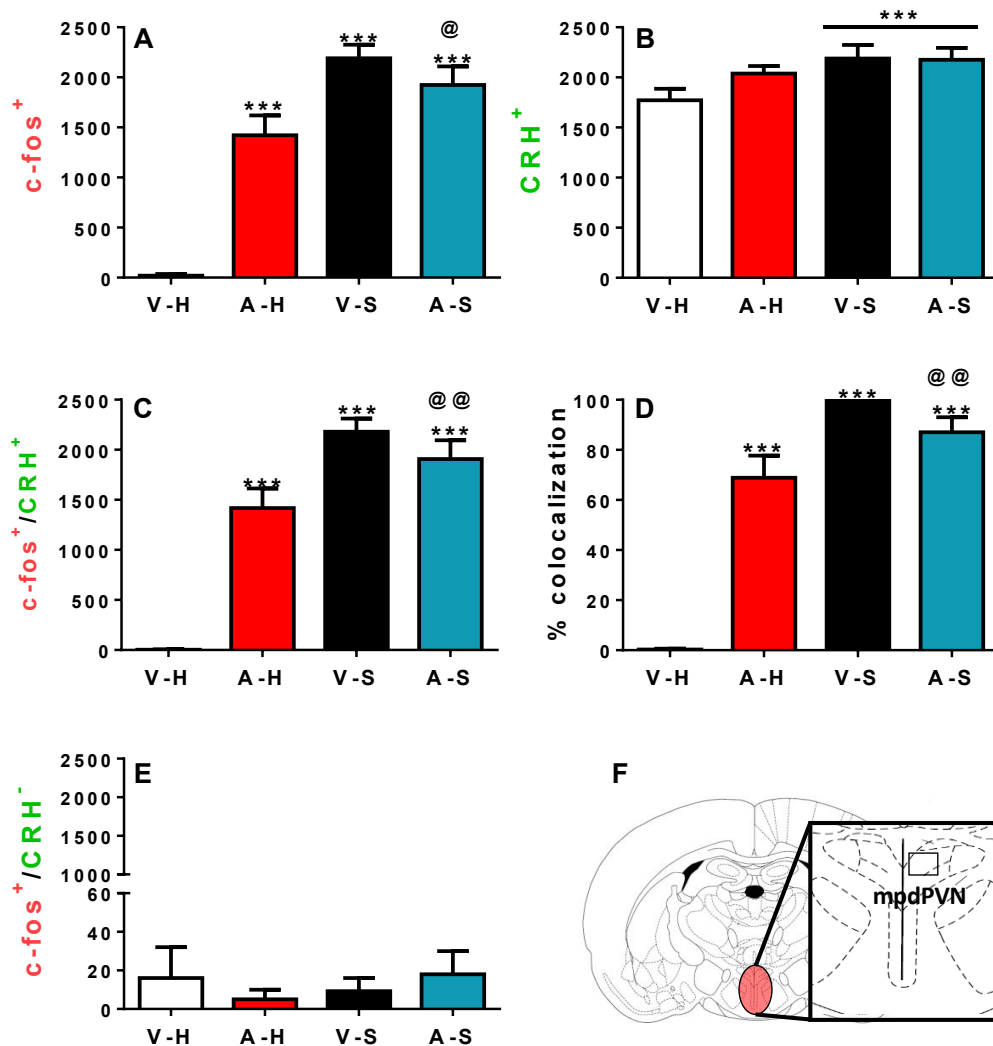


Figura 20. Activación de la población que expresa CRH en el PVN tras la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas CRH⁺; Panel C: Número de neuronas CRH⁺ activadas (c-fos⁺/CRH⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas CRH⁺ activadas respecto al total de la población CRH⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para CRH (c-fos⁺/CRH⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; @ p < 0,05, @@ p < 0,01 vs A-H.

La Figura 21 muestra los resultados del análisis de la varianza de la **distribución de la intensidad por neurona *c-fos*⁺** (RANGO). Se observó efecto de los factores ANF, NADO y RANGO y de todas sus interacciones ($p < 0,001$ en todos los casos). Si bien se pueden considerar comparaciones particulares, la conclusión general fue que la intensidad de señal por célula fue mayor tras la exposición a la natación forzada en comparación con la administración de anfetamina. Los animales expuestos de manera simultánea a la anfetamina y la natación forzada mostraron un patrón de activación similar al obtenido con la administración de anfetamina.

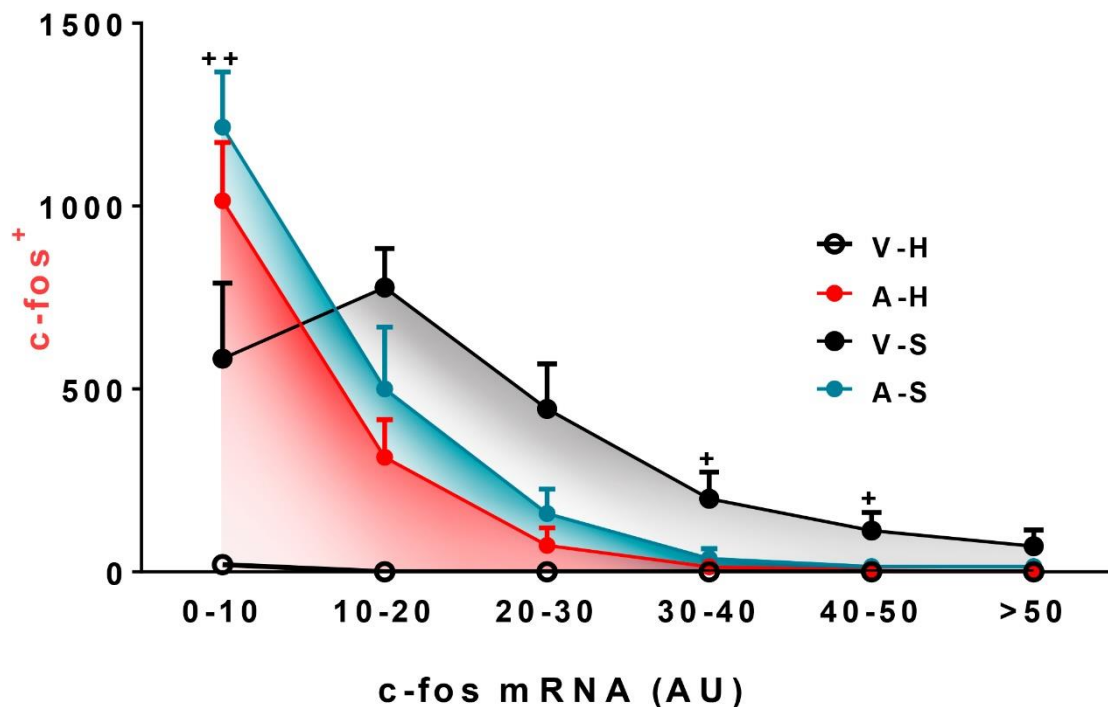


Figura 21. Distribución de la intensidad de señal por neurona de *c-fos* en el PVN tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas de *c-fos* por mm² distribuidas por rango de intensidad de señal. Para simplificar la Figura 14, únicamente se indican las diferencias significativas entre el grupo V-S y A-S. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$.

En la **Figura 22** evidencia los resultados de la **activación** de la **población TH** en el **VTA**. La descomposición de la interacción ANF*NADO mostró que únicamente la administración de anfetamina fue capaz de provocar un incremento tanto en las neuronas c-fos⁺ ($p < 0,01$) como en las c-fos⁺/TH⁺ ($p < 0,001$). La exposición simultánea a ambos estímulos provocó una disminución en el número de neuronas c-fos⁺ ($p < 0,001$) y en las c-fos⁺/TH⁺ ($p < 0,01$) respecto al grupo A-H. Además, se observó una reducción de la población TH⁺, respecto al grupo V-H, en el grupo expuesto exclusivamente a la natación forzada ($p < 0,001$).

En la **Figura 23** se observan imágenes representativas de la **activación** de la **población TH** en el **LC**. La descomposición de la interacción ANF*NADO (ver **Figura 24**) mostró un incremento causado por la natación forzada, respecto al grupo V-H, que afectó a las neuronas c-fos⁺, c-fos⁺/TH⁺ y al % colocalización ($p < 0,001$ en todos los casos). La exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada causó una importante reducción en los tres parámetros anteriormente mencionados respecto al grupo V-S ($p < 0,001$ en todos los casos). El número total de neuronas TH⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

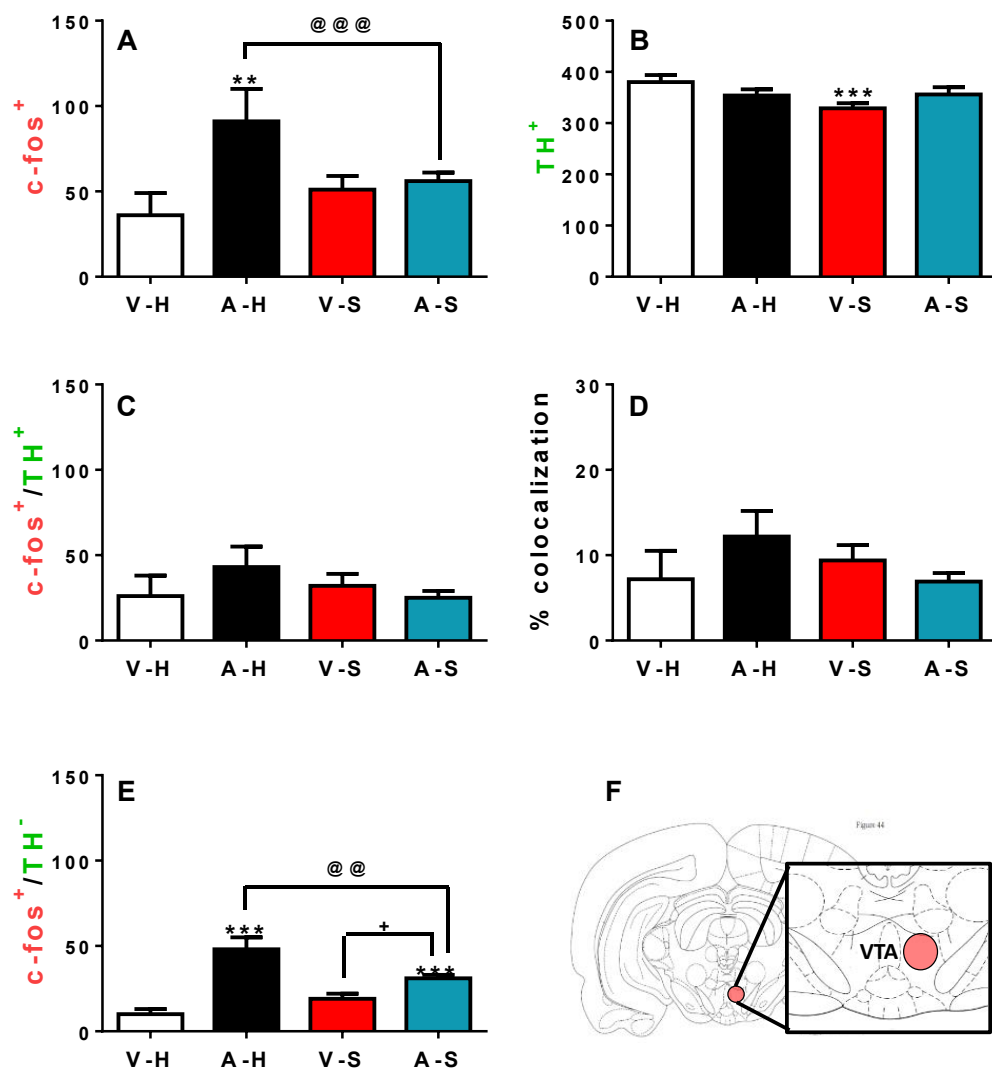


Figura 22. Activación de la población que expresa TH en el VTA tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas TH⁺; Panel C: Número de neuronas TH⁺ activadas (c-fos⁺/TH⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas TH⁺ activadas respecto al total de la población TH⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para TH (c-fos⁺/TH⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de anfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs grupo V-H; + p < 0,05 y @@ p < 0,01, @@@ p < 0,001 entre los grupos señalados.

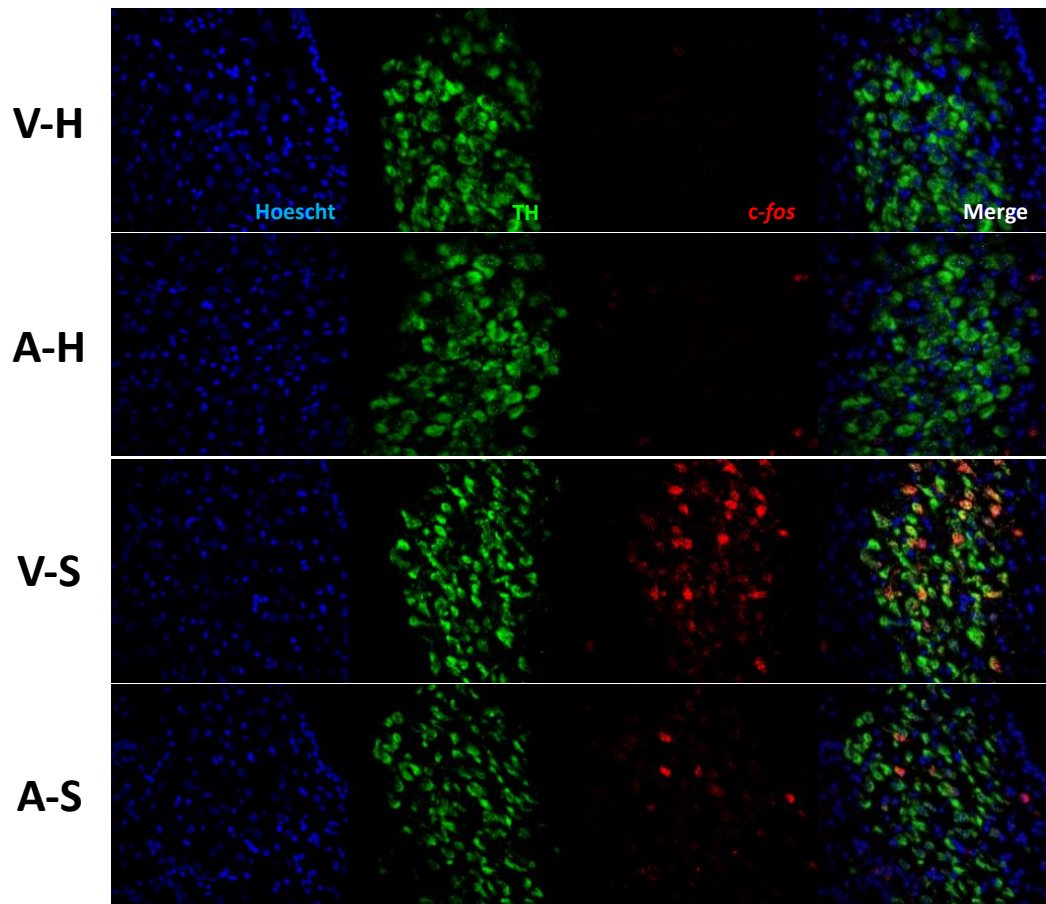


Figura 23. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH TH/*c-fos* en el LC tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada.

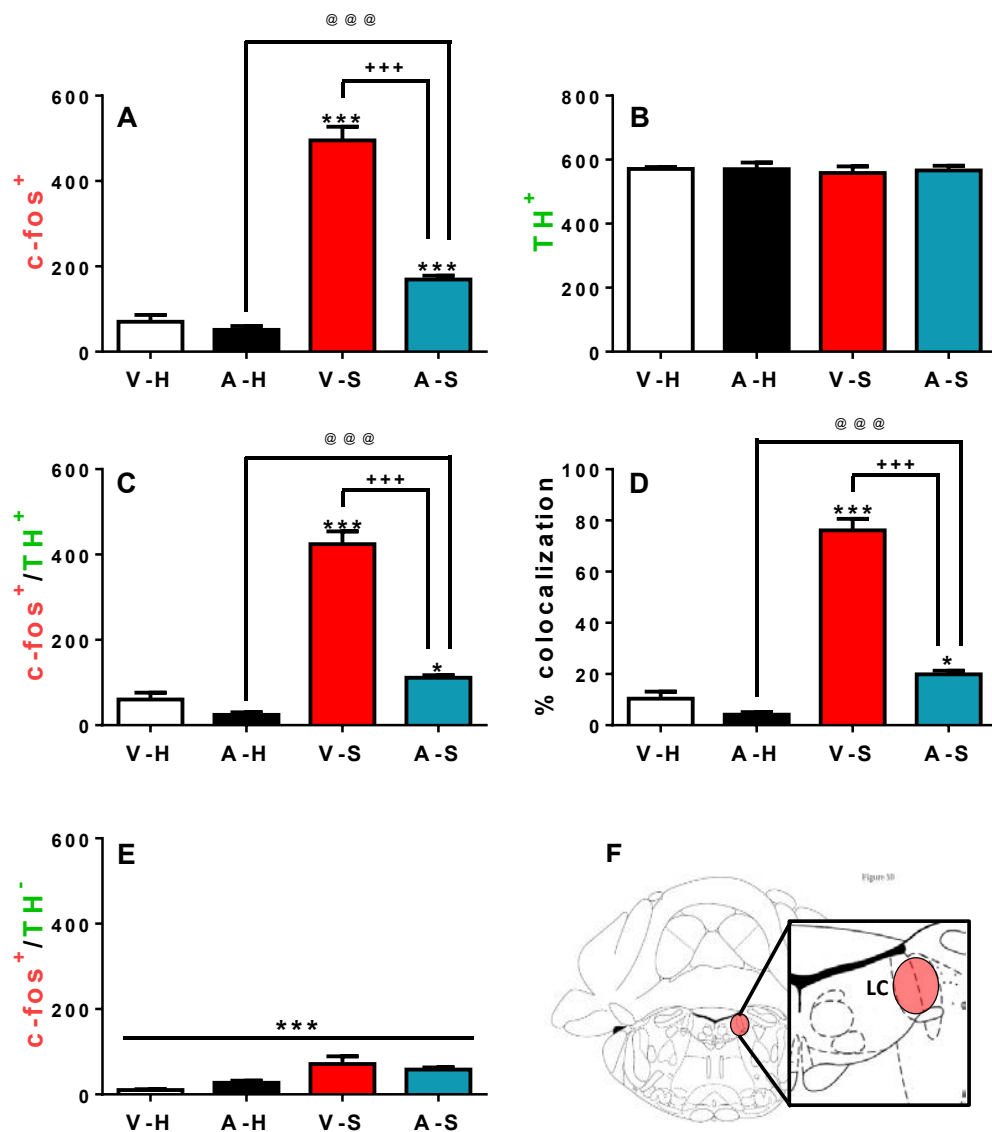


Figura 24. Activación de la población que expresa TH en el LC tras la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas TH⁺; Panel C: Número de neuronas TH⁺ activadas (c-fos⁺/TH⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas TH⁺ activadas respecto al total de la población TH⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para TH (c-fos⁺/TH⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 6) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; A-H (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 10) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y A-S (n = 10) representa el grupo administrado con 4 mg/kg de amfetamina e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. * p < 0,05, *** p < 0,001 vs grupo V-H o efecto del factor NADO; +++ p < 0,001 y @@@ p < 0,001 entre los grupos señalados.

Capítulo 2. Interacción entre metilfenidato y estrés: efectos a nivel del SNC

Introducción

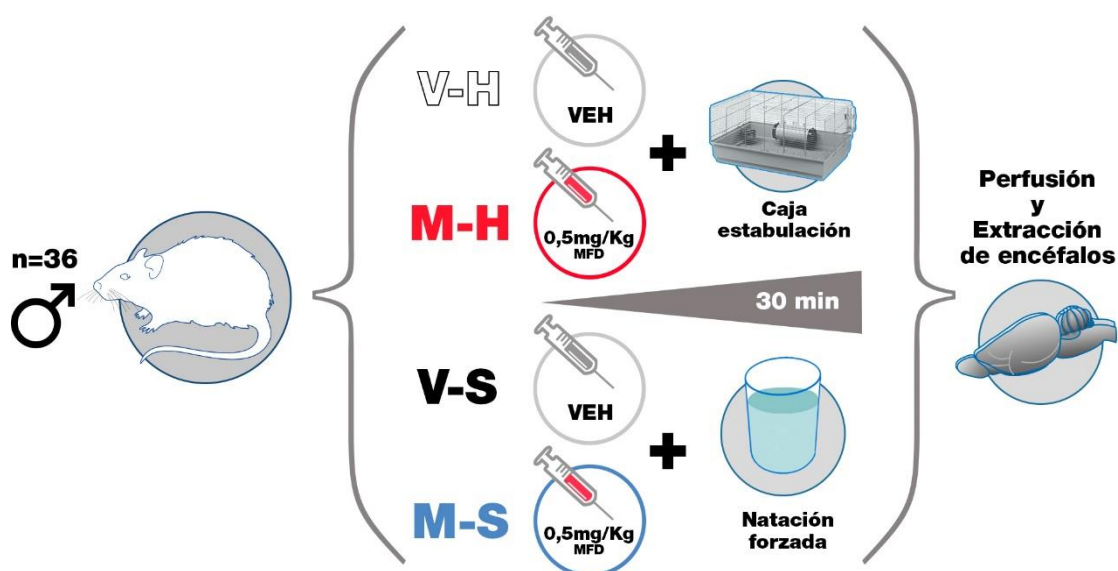
Como ya se ha comentado, se observa interacción en el procesamiento por el SNC de la respuesta a un psicoestimulante como la d-anfetamina y a estímulos estresantes emocionales (natación forzada), cuando éstos se presentan de manera simultánea. En algunas estructuras esta interacción da lugar a una reducción de la respuesta al estrés en presencia de d-anfetamina. Esta interacción no sólo ocurre con la anfetamina, sino que también se ha observado con otros psicoestimulantes como la cocaína (Gagliano *et al.*, 2017). Por lo tanto, parece probable que esta interacción pueda ocurrir con otros psicoestimulantes.

Por ello nos planteamos estudiar dicha interacción con un psicoestimulante de extenso uso terapéutico como el **metilfenidato**. Dada su naturaleza psicoestimulante, el metilfenidato a dosis elevadas (5, 10 y 40 mg/kg) es capaz de incrementar la expresión de *c-fos* en el estriado (Hawken *et al.*, 2004; Yano y Steiner, 2005) y en áreas relacionadas con la respuesta del estrés como la mPFC (Allen *et al.*, 2010; Koda *et al.*, 2010) o el Acb (Chase *et al.*, 2005). Sin embargo, las dosis administradas son muy elevadas y no se encuentran dentro del rango terapéutico. Debido al amplio uso del metilfenidato como tratamiento para el trastorno del déficit de atención e hiperactividad, nos planteamos valorar si la administración de una dosis terapéutica relevante de metilfenidato (0,5 mg/kg), que no es capaz de inducir la activación del eje HPA o la expresión de *c-fos* en el SNC (Gagliano, 2015), era capaz también de reducir la activación causada por la natación forzada en las estructuras del SNC relacionadas con la respuesta de estrés. El interés es doble. Por un lado, es importante demostrar que la interacción entre psicoestimulantes y estrés no ocurre solamente cuando las dosis de estos fármacos son capaces de causar una respuesta de “estrés” (con la consiguiente activación del eje HPA). Por otro lado, el uso de una dosis terapéutica puede contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos mediante los cuales actúa el metilfenidato.

Diseño experimental

36 ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley fueron distribuidas de manera aleatoria en los siguientes grupos: **i) BASAL** (n = 4), no se manipularon y se sacrificaron en condiciones basales; **ii) V-H** (n = 8), fueron inyectadas con vehículo e inmediatamente devueltas a sus cajas de estabulación (*homecage*); **iii) M-H** (n = 8), fueron inyectadas con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devueltas a sus cajas de estabulación (*homecage*); **iv) V-S** (n = 8), fueron inyectadas con vehículo e inmediatamente expuestas a 30 minutos de natación forzada; y **v) M-S** (n = 8), fueron inyectadas con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuestas a 30 minutos de natación forzada. Transcurridos estos 30 minutos, todos los animales se perfundieron para la obtención de los encéfalos (ver **Tabla 4**). Posteriormente, mediante dFISH se valoró la activación de las principales poblaciones neuronales en aquellas áreas relacionadas con la respuesta del estrés que se muestran en la **Figura 25**. El grupo BASAL sirvió como control negativo del experimento y no fue incluido en el análisis estadístico.

Tabla 4. Protocolo experimental Capítulo 2



Resultados

Los resultados de las diferentes dFISH se analizaron mediante el modelo lineal generalizado (*Generalized Linear Models, GzLM*). Los dos factores entre-sujeto fueron: MFD (con 2 niveles: con y sin administración de metilfenidato) y NADO (con 2 niveles: con y sin exposición a la natación forzada). En la **Tabla 5** se muestran las significaciones estadísticas generales para cada parámetro analizado. Así mismo, los detalles de las comparaciones entre grupos se comentarán cuando sea necesario.

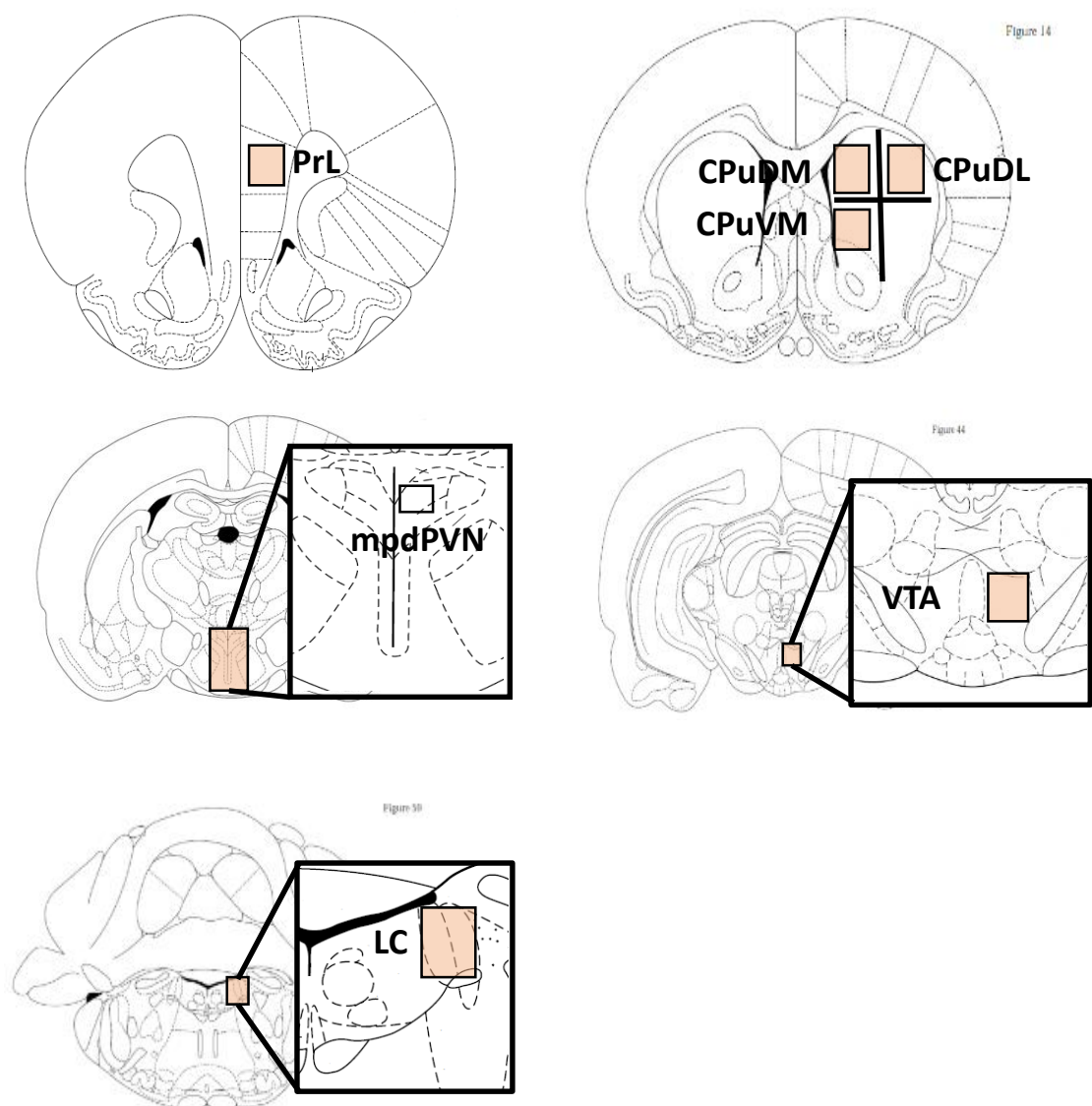


Figura 25. Esquemas representativos de las áreas analizadas. CPuDL: subdivisión dorsolateral del estriado; CPuDM: subdivisión dorsomedial del estriado; CPuVM: subdivisión ventromedial del estriado; LC: *locus coeruleus*; PrL: subdivisión prelímbica de la corteza prefrontal medial; mpdPVN: región parvocelular dorsal del núcleo paraventricular del hipotálamo; VTA: área tegmental ventral.

Tabla 5. Efectos globales del análisis estadístico de las diferentes dFISH realizadas.

			MFD		NADO		MFD*NADO	
# Neuronas c-fos activas (c-fos+)	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	0,4	NS	195,2	p < 0,001	2,5	NS
	GAD67		1	NS	89,9	p < 0,001	1,1	NS
	D2R	CPuDM	10,9	p = 0,001	64	p < 0,001	2,7	NS
		CPUDL	25,25	p < 0,001	102,3	p < 0,001	1,1	NS
		CPuVM	12	p = 0,001	9,9	p < 0,01	0,5	NS
	CRH	PVN	0,6	NS	149,3	p < 0,001	1	NS
	TH	VTA	1,8	NS	64,7	p < 0,001	0,3	NS
		LC	16,5	p < 0,001	73,9	p < 0,001	12,2	p < 0,001
			MFD		NADO		MFD*NADO	
# Neuronas fenotipo+/c-fos+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	0,6	NS	120,1	p < 0,001	2,8	NS
	GAD67		0,1	NS	77,1	p < 0,001	1,6	NS
	D2R	CPuDM	0,1	NS	27,4	p < 0,001	3,7	NS
		CPUDL	0,1	NS	62,7	p < 0,001	0,1	NS
		CPuVM	3,3	NS	25,4	p < 0,001	1,1	NS
	CRH	PVN	0,6	NS	148,5	p < 0,001	0,8	NS
	TH	VTA	0,2	NS	26,6	p < 0,001	1,7	NS
		LC	21,2	p < 0,001	73,7	p < 0,001	14,7	p < 0,001
			MFD		NADO		MFD*NADO	
# Neuronas fenotipo-/c-fos+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	0,01	NS	122,2	p < 0,001	0,1	NS
	GAD67		1,1	NS	72,9	p < 0,001	2,1	NS
	D2R	CPuDM	30,6	p < 0,001	56,6	p < 0,001	0,2	NS
		CPUDL	33	p < 0,001	39,2	p < 0,001	2	NS
		CPuVM	16,8	p < 0,001	1,2	NS	0,1	NS
	CRH	PVN	0,2	NS	44,1	p < 0,001	1	NS
	TH	VTA	4,5	p < 0,05	36	p < 0,001	0,2	NS
		LC	0	NS	26,1	p < 0,001	0,4	NS
			MFD		NADO		MFD*NADO	
% Neuronas fenotipo+/c-fos+ vs Total fenotipo+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	1,5	NS	137,7	p < 0,001	1,6	NS
	GAD67		0,1	NS	93,3	p < 0,001	0	NS
	D2R	CPuDM	0,6	NS	48,4	p < 0,001	2,4	NS
		CPUDL	0,1	NS	87,3	p < 0,001	0,4	NS
		CPuVM	2,6	NS	21,6	p < 0,001	1	NS
	CRH	PVN	1,6	NS	212,5	p < 0,001	1,9	NS
	TH	VTA	0	NS	24,6	p < 0,001	0,9	NS
		LC	18,5	p < 0,001	73	p < 0,001	14,2	p < 0,001
			MFD		NADO		MFD*NADO	
# Neuronas fenotipo+	Marcaje	Área	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig	Wald X ² (1)	Sig
	VGlut1	PrL	0,8	NS	0,4	NS	1,4	NS
	GAD67		0	NS	0,6	NS	3,4	NS
	D2R	CPuDM	0,5	NS	0,7	NS	0,9	NS
		CPUDL	0,4	NS	3,1	NS	0,7	NS
		CPuVM	0,7	NS	1,2	NS	0,2	NS
	CRH	PVN	0,1	NS	0,5	NS	0,3	NS
	TH	VTA	0,1	NS	2,5	NS	2,1	NS
		LC	7,5	p < 0,01	0	NS	2,5	NS

En la **Figura 26** se ilustran imágenes representativas de la activación de la **población glutamatérgica** tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada en el área PrL. En la **Figura 27** se puede observar un efecto del factor NADO en el incremento del número de neuronas *c-fos*⁺, *c-fos*⁺/VGlut1⁺, *c-fos*⁺/VGlut1⁻ y el % colocalización ($p < 0,001$ en todos los casos). El número total de neuronas VGlut1⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

La **Figura 28** muestra imágenes representativas de la activación de la **población GABAérgica** tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada en el área PrL. En la **Figura 29** se observa un patrón similar al obtenido con el análisis de la población glutamatérgica, observándose un efecto del factor NADO en el incremento de los parámetros anteriormente comentados ($p < 0,001$ en todos los casos). El número total de neuronas GAD67⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

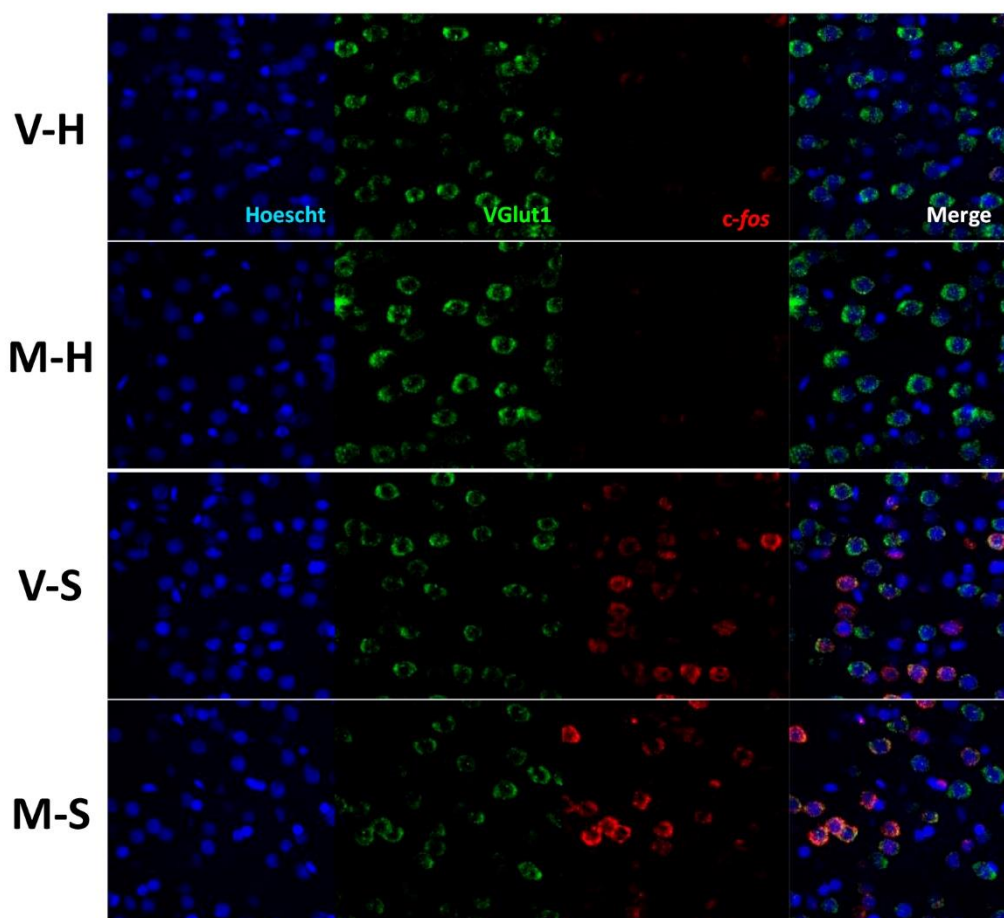


Figura 26. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH VGlut1/*c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada.

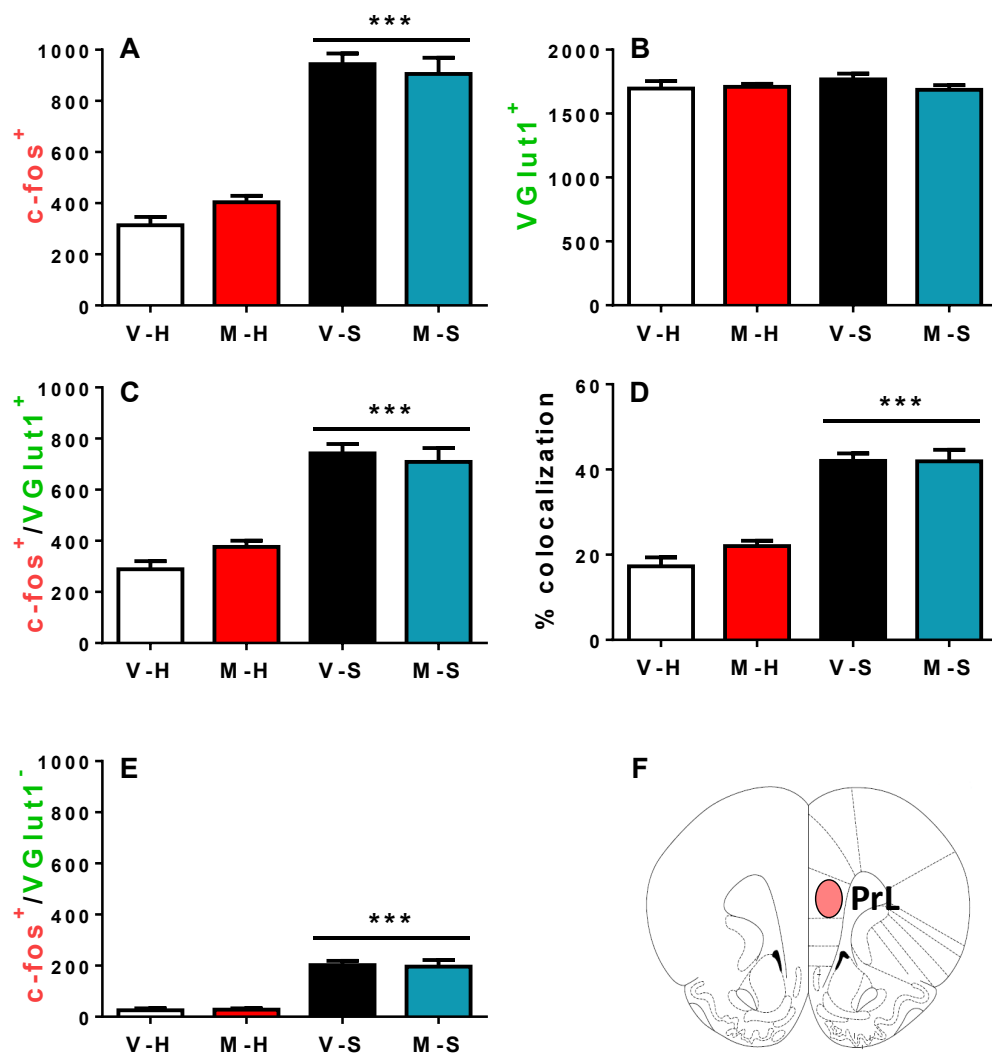


Figura 27. Activación de la población glutamatergica en la PrL tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas VGlut1⁺; Panel C: Número de neuronas VGlut1⁺ activadas (c-fos⁺/VGlut1⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas VGlut1⁺ activadas respecto al total de la población VGlut1⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para VGlut1 (c-fos⁺/VGlut1⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO.

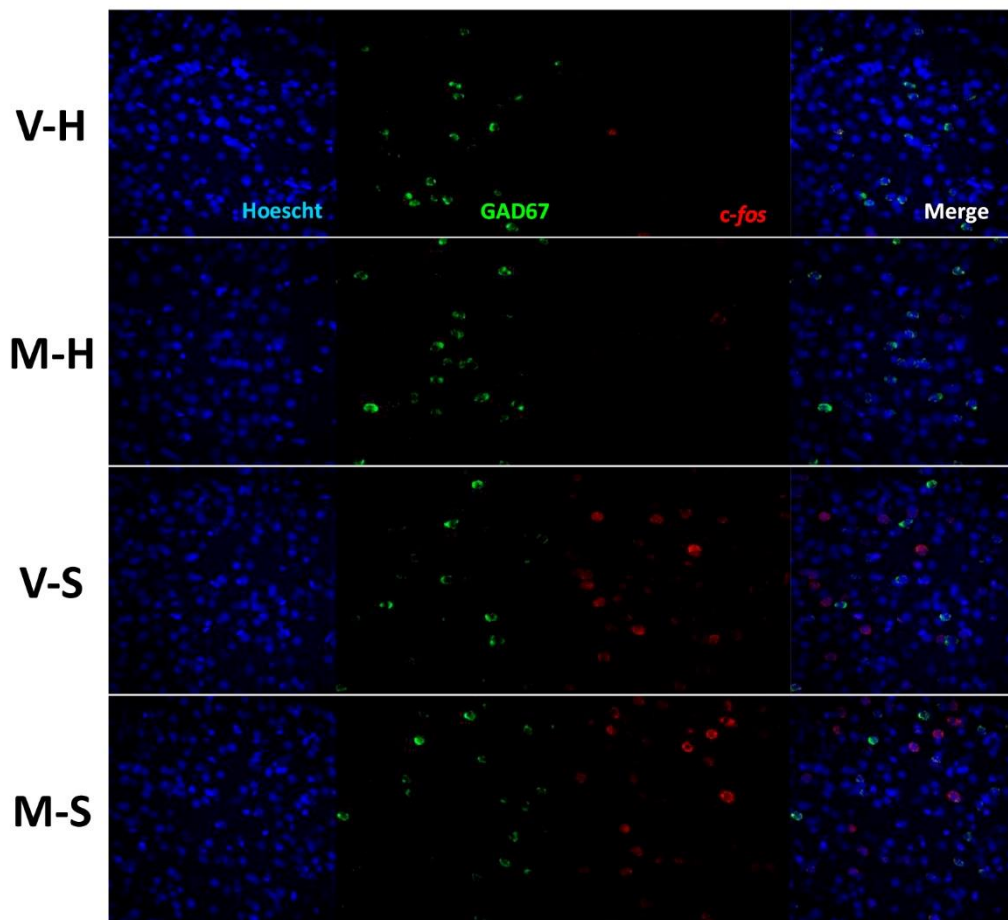


Figura 28. Imágenes representativas captadas a 20X de la dFISH GAD67/*c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada.

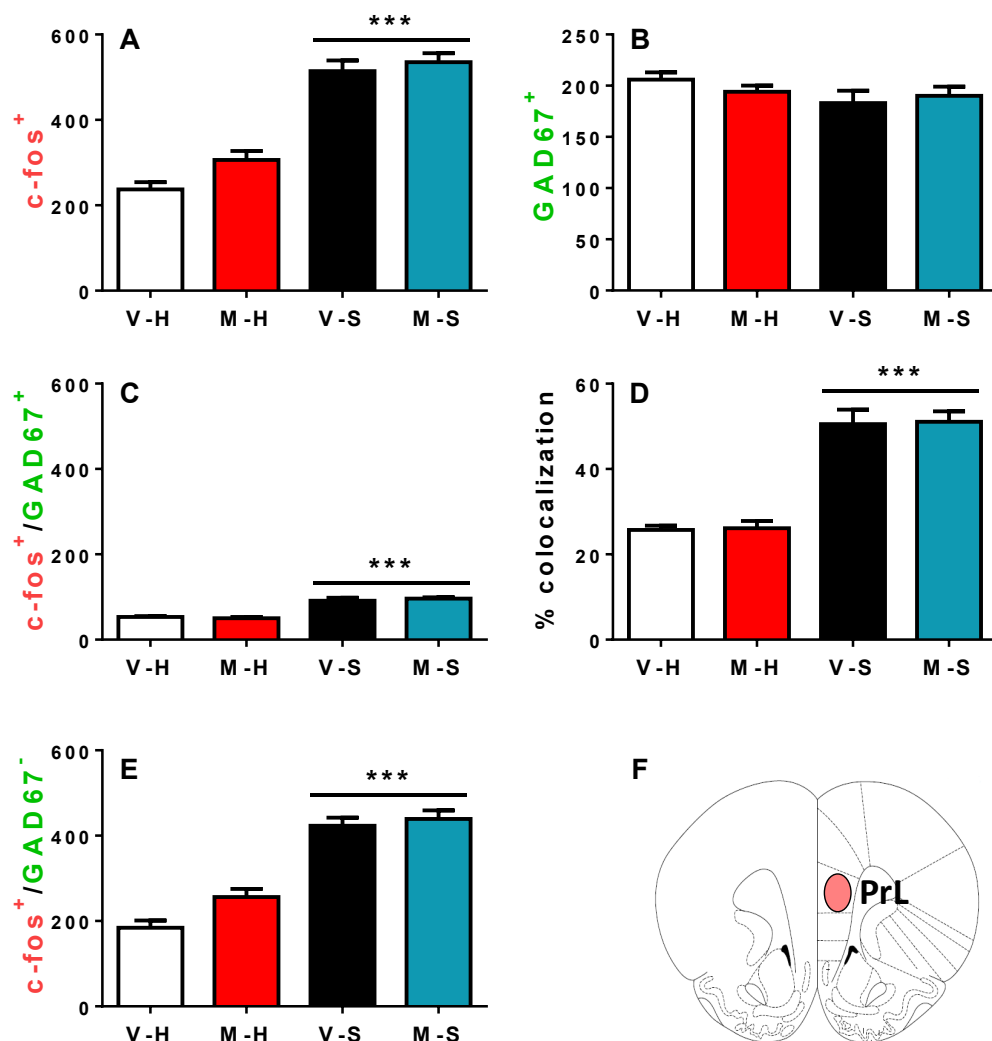


Figura 29. Activación de la población GABAérgica en la PrL tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas GAD67⁺; **Panel C:** Número de neuronas GAD67⁺ activadas (c-fos⁺/GAD67⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas GAD67⁺ activadas respecto al total de la población GAD67⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para GAD67 (c-fos⁺/GAD67⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO.

La **Figura 30** muestra los resultados de la activación de la **población D2R** en respuesta a la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada en el **CPuDM**. Se observó un efecto del factor MFD ($p < 0,01$) y el NADO ($p < 0,001$) en el incremento del número de neuronas c-fos⁺. Además, únicamente observamos un efecto del factor NADO en la activación de las neuronas c-fos⁺/D2R⁺ ($p < 0,001$) y el % colocalización ($p < 0,001$). Por último, observamos un efecto del factor MFD ($p < 0,001$) y del NADO ($p < 0,001$) en el incremento del número de neuronas c-fos⁺/D2R⁺. El número total de neuronas D2R⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

Las imágenes representativas de la activación de la **población D2R** en el **CPuDL** se muestran en la **Figura 31**. En la **Figura 32** se pudo observar un efecto del factor MFD y del NADO en el incremento del número de neuronas c-fos⁺ y c-fos⁺/D2R⁻ ($p < 0,001$ en todos los casos). Sin embargo, únicamente se observó un efecto del factor NADO sobre la activación de las neuronas c-fos⁺/D2R⁺ y un aumento en el % colocalización ($p < 0,001$ en ambos los casos). El número total de neuronas D2R⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

En la **Figura 33** están representados los resultados de la activación de la **población D2R** en el **CPuVM**. Se observó un efecto de los factores MFD ($p < 0,01$) y NADO ($p < 0,01$) en el incremento del número de neuronas c-fos⁺. Sin embargo, el efecto del factor MFD afectó únicamente a las neuronas c-fos⁺/D2R⁻ ($p < 0,01$); y el efecto del factor NADO, por su parte, afectó al número de neuronas c-fos⁺/D2R⁺ ($p < 0,01$) así como su % de colocalización ($p < 0,001$). El número total de neuronas D2R⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

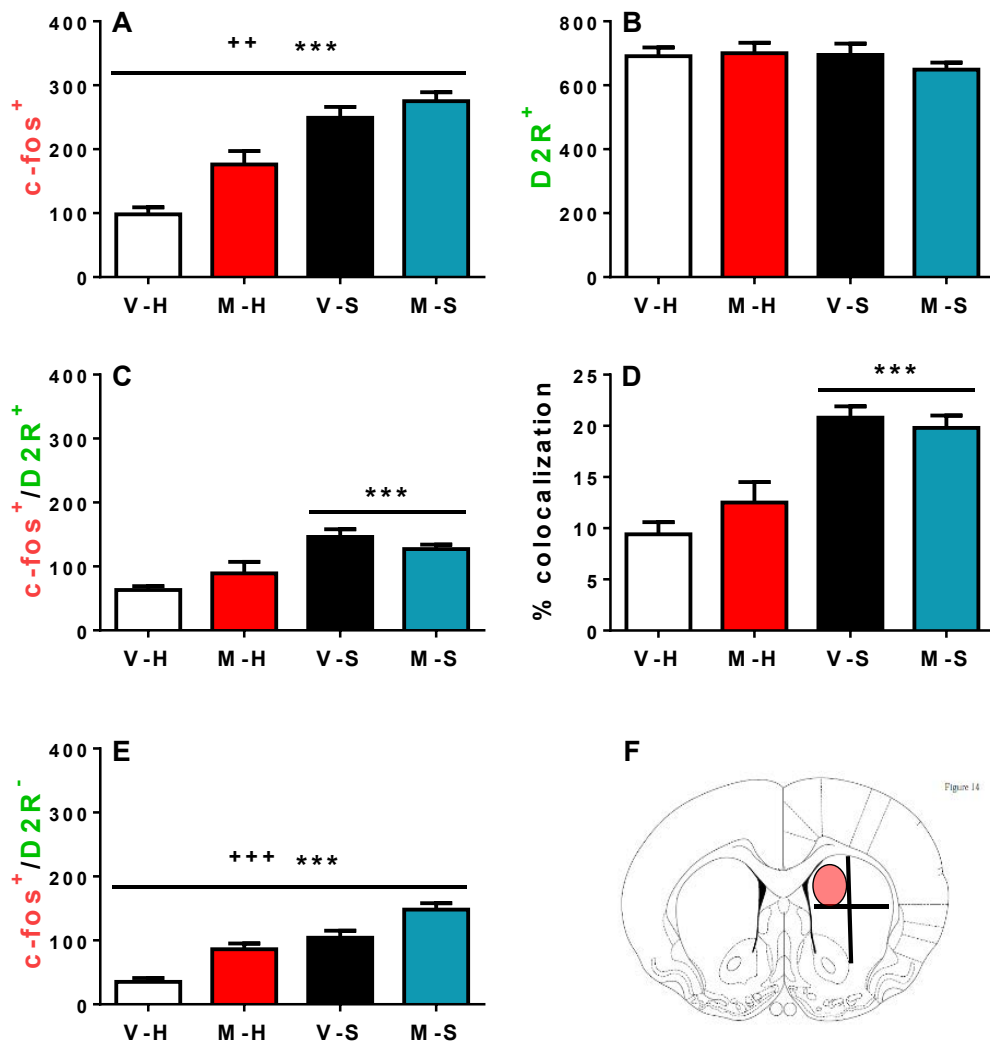


Figura 30. Activación de la población D2R en el CPuDM tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas D2R⁺; **Panel C:** Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO; ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 efecto del factor MFD.

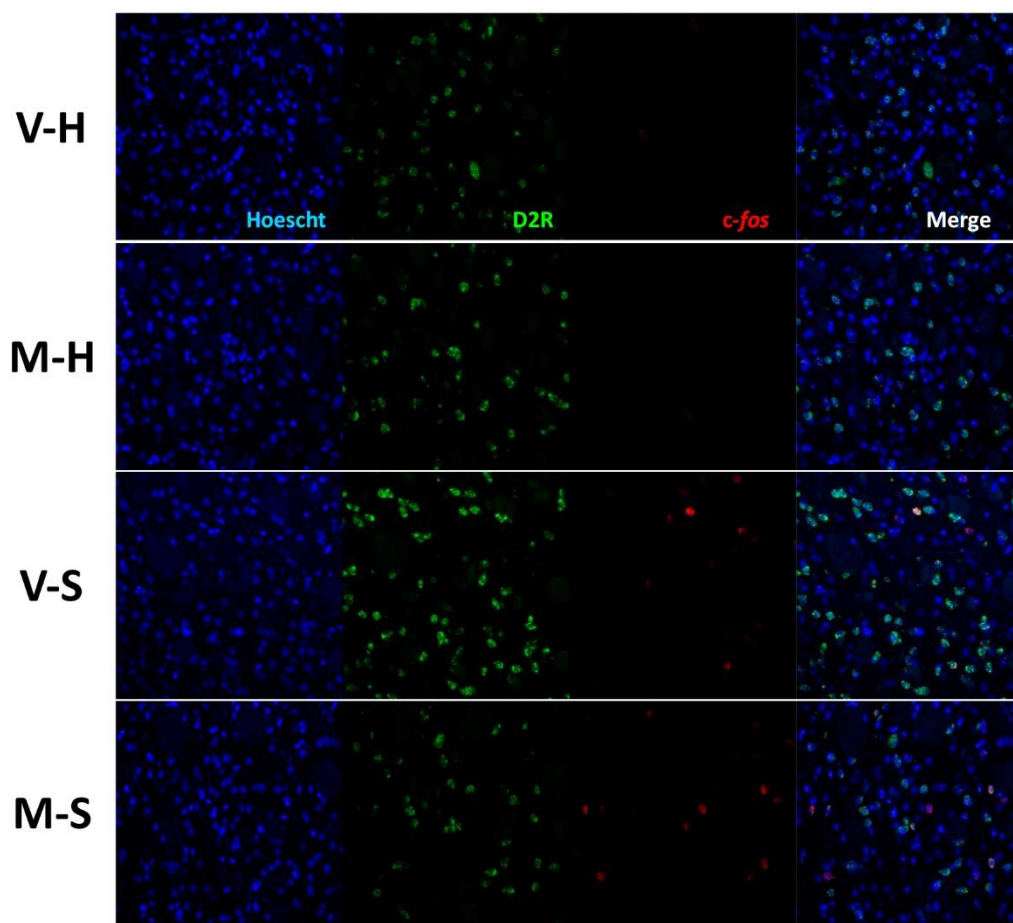


Figura 31. Imágenes representativas captadas a 20X de la dFISH D2R/*c-fos* en el CPuDL tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada.

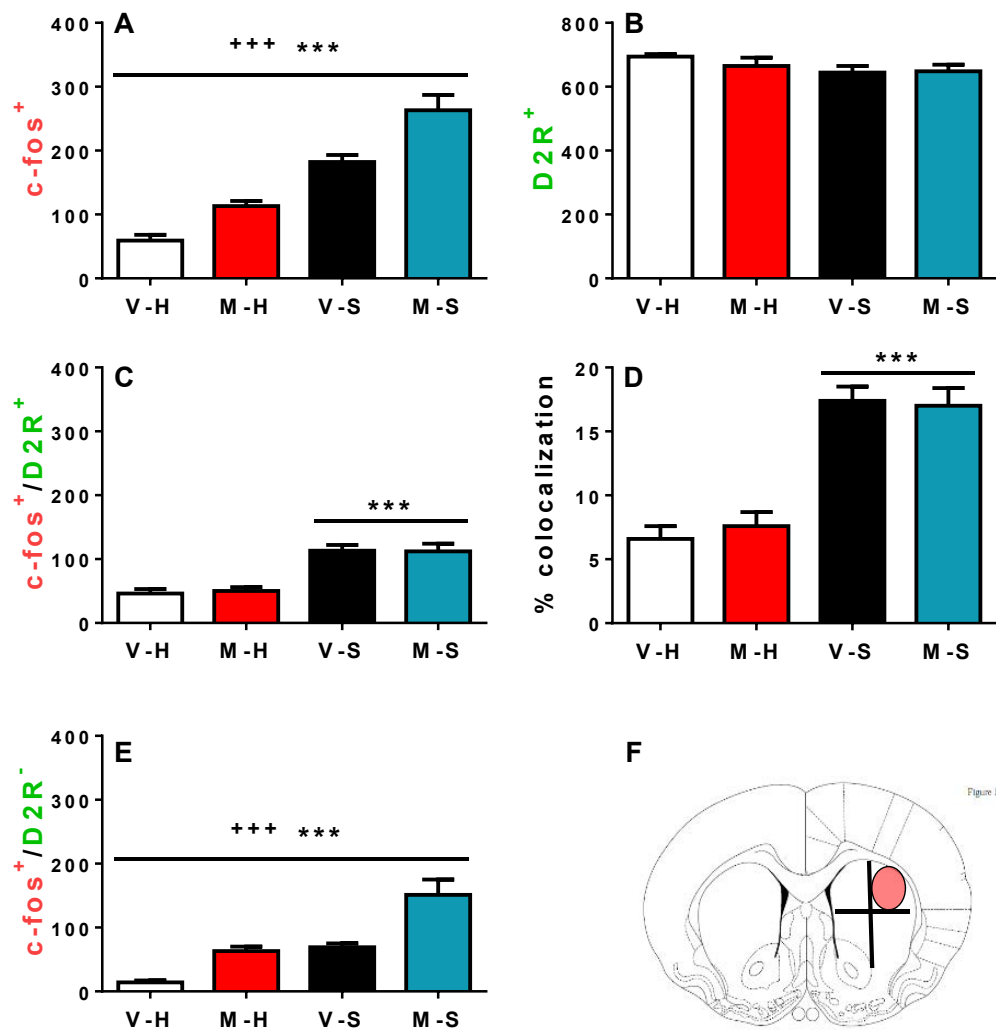


Figura 32. Activación de la población D2R en el CPuDL tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas D2R⁺; Panel C: Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO; +++ p < 0,001 efecto del factor MFD.

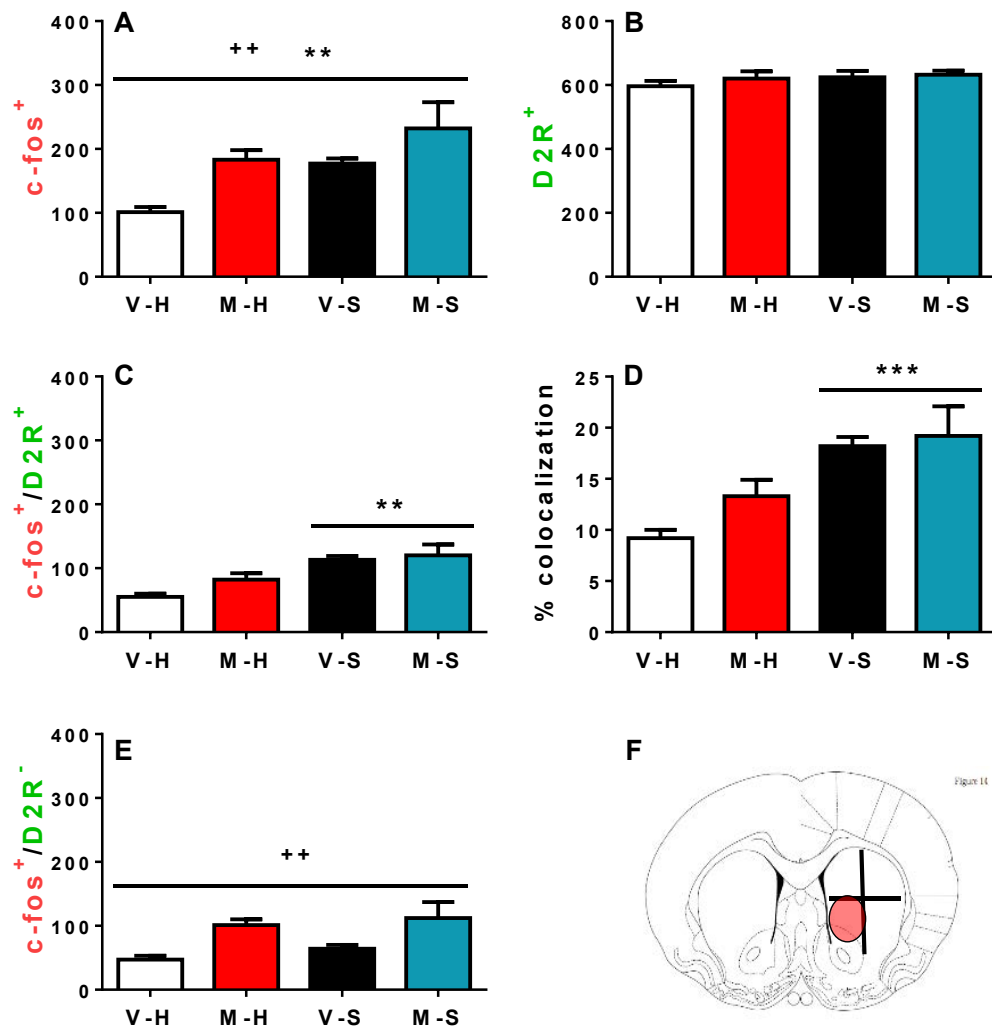


Figura 33. Activación de la población D2R en el CPuVM tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas D2R⁺; **Panel C:** Número de neuronas D2R⁺ activadas (c-fos⁺/D2R⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas D2R⁺ activadas respecto al total de la población D2R⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para D2R (c-fos⁺/D2R⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** < 0,01; *** p < 0,001 efecto del factor NADO; ++ p < 0,01 efecto del factor MFD.

La **Figura 34** muestra las imágenes representativas de la activación de la **población** que expresa CRH en el PVN. Los resultados representados en la **Figura 35** únicamente mostraron un efecto del factor NADO que incrementó el número de neuronas $c\text{-fos}^+$, $c\text{-fos}^+/\text{CRH}^+$, $c\text{-fos}^+/\text{CRH}^-$ y el % colocalización ($p < 0,001$ en todos los casos). El número total de neuronas CRH^+ fue similar en todos los grupos experimentales.

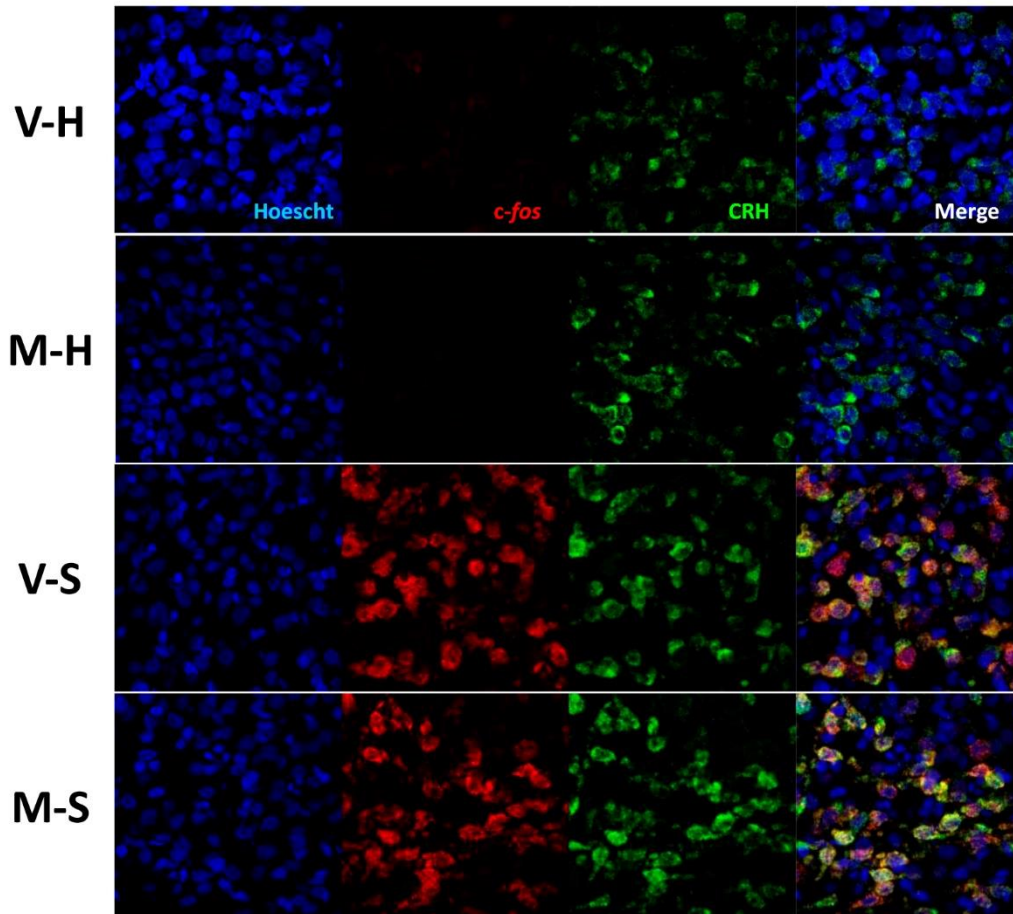


Figura 34. Imágenes representativas captadas a 40X de la **dfISH CRH/*c-fos*** en el PVN tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada.

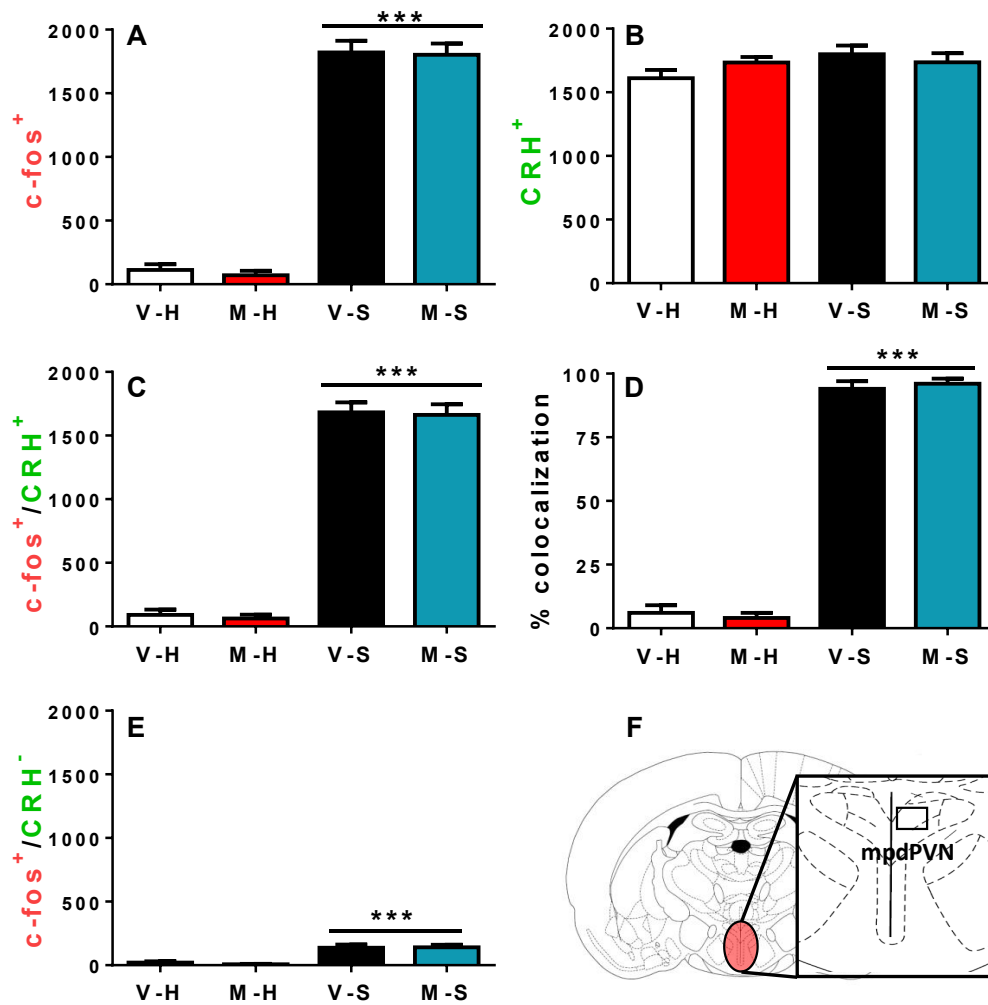


Figura 35. Activación de la población CRHérgica en el PVN en respuesta a la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas CRH⁺; **Panel C:** Número de neuronas CRH⁺ activadas (c-fos⁺/CRH⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas CRH⁺ activadas respecto al total de la población CRH⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para CRH (c-fos⁺/CRH⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO

La activación de la **población** que expresa TH en el VTA se resume en la **Figura 36**. Se observó un efecto del factor NADO incrementando el número de neuronas *c-fos*⁺, *c-fos*⁺/TH⁺, *c-fos*⁺/TH⁻ y el % de colocalización ($p < 0,001$ en todos los casos). Sin embargo, únicamente observamos efecto del factor MFD en el número de neuronas *c-fos*⁺/TH⁻ ($p < 0,05$). El número total de neuronas TH⁺ fue similar en todos los grupos experimentales.

En la **Figura 37** se muestran imágenes representativas de la activación de la **población** que expresa TH en el LC. La descomposición de la interacción MFD*NADO representada en la **Figura 38**, mostró que la exposición a la natación forzada causó un incremento en las neuronas *c-fos*⁺, *c-fos*⁺/TH⁺ y un aumento en el % colocalización respecto al grupo V-H ($p < 0,001$ en todos los casos). Además, se observó un efecto del factor NADO en el número de neuronas *c-fos*⁺/TH⁻. La exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada causó una importante reducción en los tres parámetros anteriormente mencionados respecto al grupo V-S ($p < 0,001$ en todos los casos), sin llegar a los niveles del grupo M-H ($p < 0,001$ en todos los casos). Observamos un efecto del factor MFD en el número total de neuronas TH⁺ ($p < 0,01$).

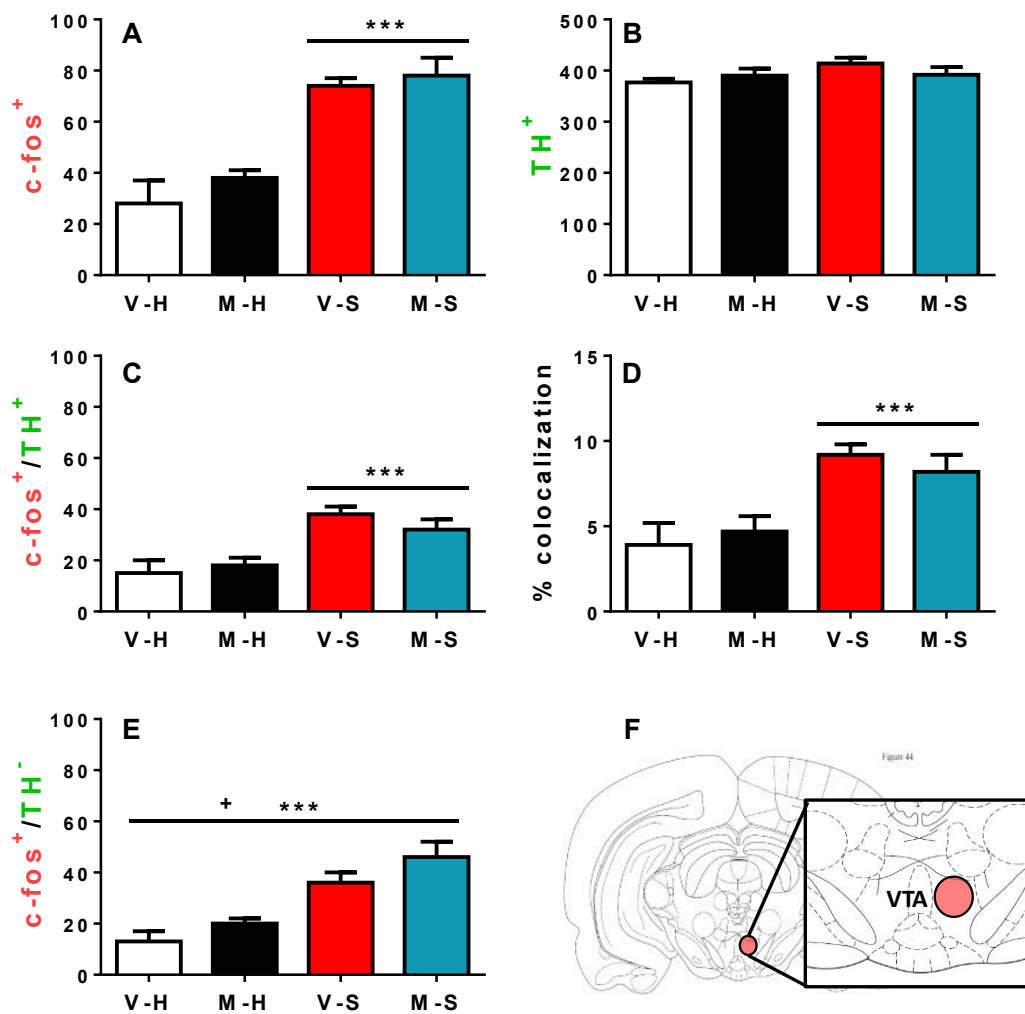


Figura 36. Activación de la población TH en el VTA en respuesta a la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas TH⁺; **Panel C:** Número de neuronas TH⁺ activadas (c-fos⁺/TH⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas TH⁺ activadas respecto al total de la población TH⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para TH (c-fos⁺/TH⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáxica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 efecto del factor NADO; + p < 0,05 efecto del factor MFD.

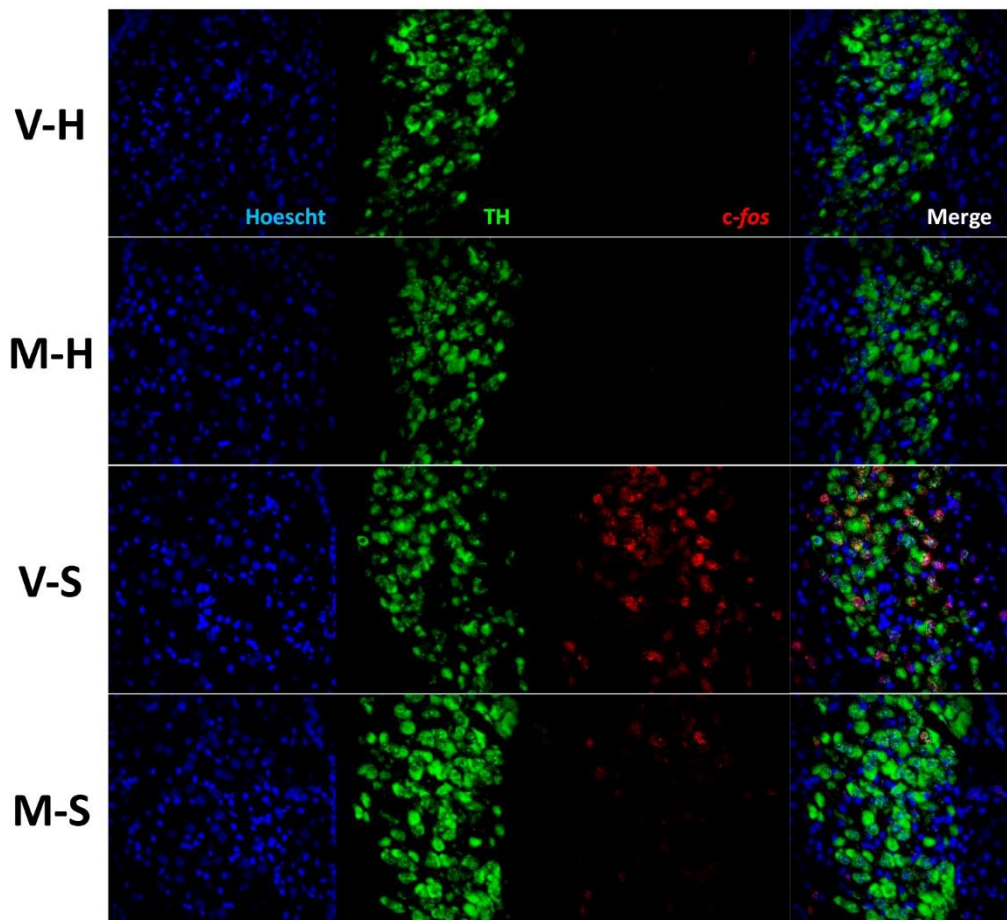


Figura 37. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH TH/*c-fos* en el LC tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada.

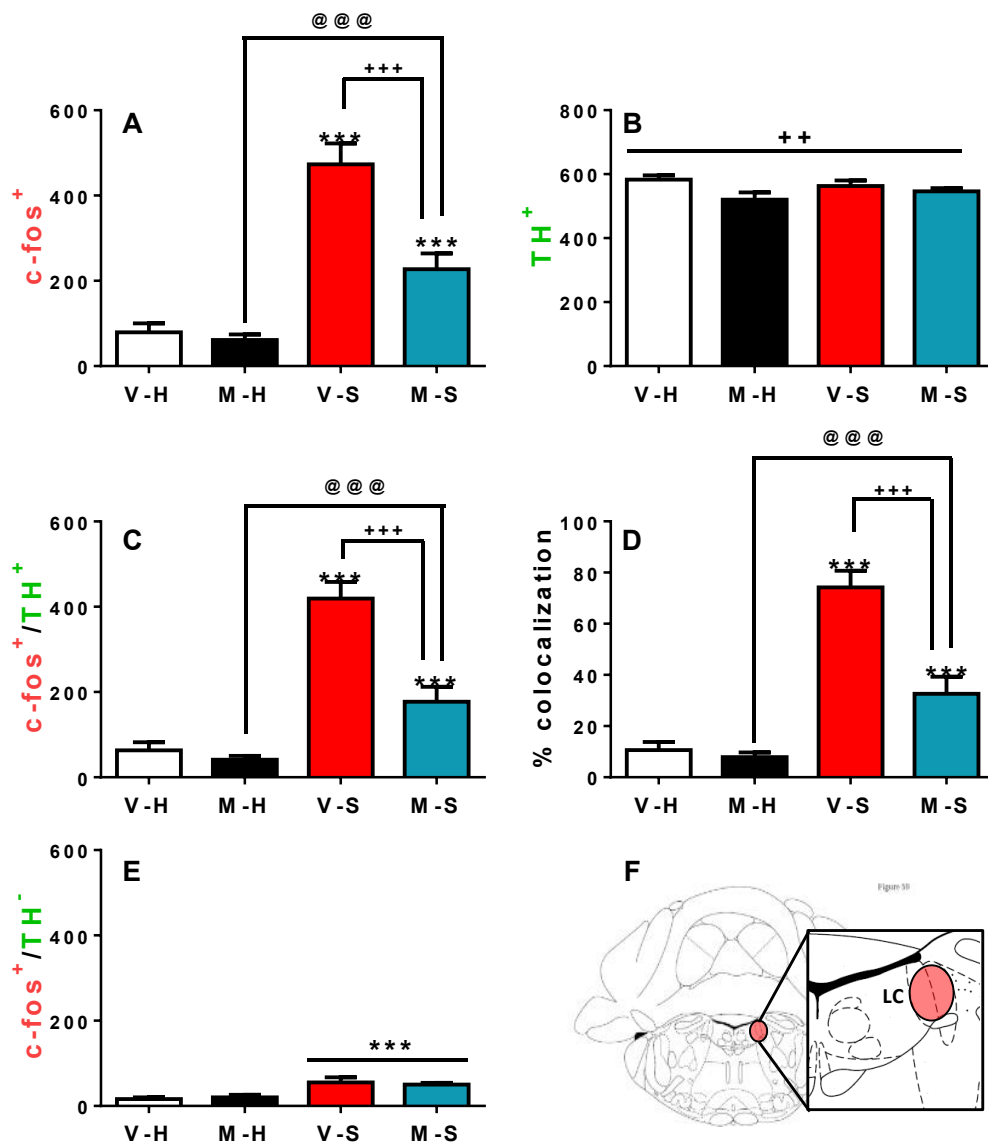


Figura 38. Activación de la población TH en el LC en respuesta a la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas TH⁺; **Panel C:** Número de neuronas TH⁺ activadas (c-fos⁺/TH⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas TH⁺ activadas respecto al total de la población TH⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para TH (c-fos⁺/TH⁻) y; **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. V-H (n = 8) representa el grupo inyectado con salino y devuelto a su caja de estabulación; M-H (n = 8) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente devuelto a su caja de estabulación; V-S (n = 8) representa el grupo administrado con salino e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada; y M-S (n = 10) representa el grupo administrado con 0,5 mg/kg de metilfenidato e inmediatamente expuesto a 30 minutos de natación forzada. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. *** p < 0,001 vs V-H o efecto del factor NADO; ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 vs V-S o efecto del factor MFD; @@@ p < 0,001 vs M-H.

Capítulo 3. *Interacción entre estímulos estresantes emocionales: efectos a nivel del SNC*

Introducción

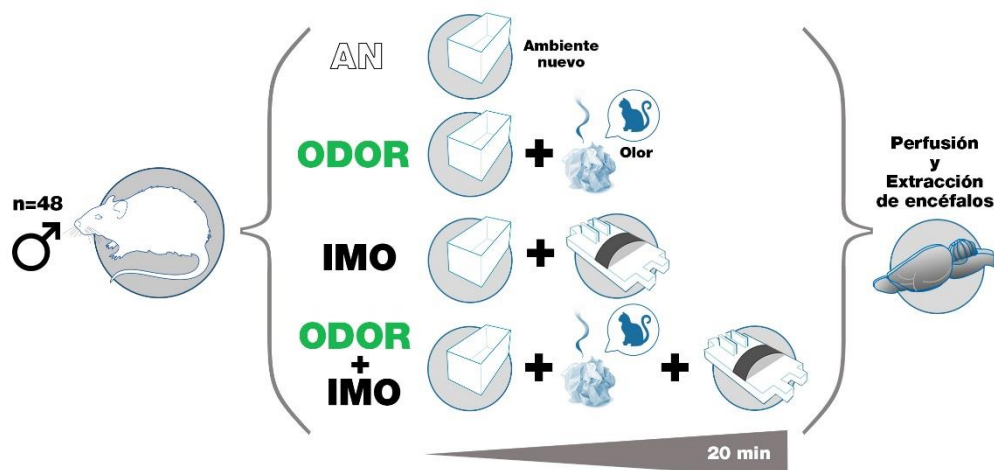
En los capítulos anteriores hemos demostrado cómo existe una interacción drogas de abuso (d-anfetamina) y fármacos terapéuticos (metilfenidato) cuando éstos se presentan de manera simultánea junto con un estímulo estresante predominantemente emocional (natación forzada). Sin embargo, la naturaleza de los dos estímulos empleados es de carácter muy diferente y es posible que dicha interacción venga dada por los mecanismos farmacológicos de los psicoestimulantes. ¿Se observa también esta interacción cuando los estímulos estresantes son de la misma naturaleza?

Desafortunadamente, existen pocos trabajos que hayan abordado cómo interaccionan a nivel fisiológico y conductual dos estímulos estresantes de la misma naturaleza cuando se presentan de manera simultánea. En nuestro laboratorio, decidimos abordar esta pregunta valorando los cambios fisiológicos y conductuales tras la exposición simultánea a dos estímulos muy bien caracterizados en nuestro laboratorio como son: la **inmovilización en plancha** y el **olor del depredador** (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011). A nivel fisiológico pudo observarse que tanto el olor del depredador como la inmovilización en plancha causaron un incremento en los niveles de ACTH, siendo mayor la liberación con la inmovilización en plancha. Sin embargo, la exposición simultánea no resultó en un efecto aditivo, hecho que cabría esperar si ambos estímulos se procesaran de manera independiente. Por lo tanto, podría existir algún tipo de interferencia entre los estímulos estresantes en relación a los circuitos cerebrales implicados en la activación del eje HPA. Por ello, nos planteamos estudiar cómo se procesa la información en el SNC de dos estímulos estresantes de la misma naturaleza cuando éstos se presentan de manera simultánea.

Diseño experimental

Se utilizaron 48 ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley que fueron asignadas de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales (ver **Tabla 5**): **i) BAS** (n = 8), los animales no se manipularon y se sacrificaron en condiciones basales; **ii) NE** (n = 10), los animales fueron expuestos a 20 minutos de ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor neutro; **iii) ODOR** (n = 10), los animales fueron expuestos al ambiente nuevo en presencia de un trapo impregnado con olor a gato, obtenido mediante frotis directo contra el gato (olor del depredador); **iv) IMO** (n = 10), los animales fueron expuestos al ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor neutro mientras estaban inmovilizadas; y **v) ODOR-IMO** (n = 10), los animales fueron expuestos al ambiente nuevo en presencia de un trapo impregnado con olor de gato mientras estaban inmovilizados. Todos los animales expuestos a la inmovilización en plancha se dejaron explorar libremente el ambiente nuevo durante 5 minutos y, seguidamente, fueron inmovilizados y se dejaron los 15 minutos restantes en el ambiente nuevo con el hocico muy cercano al trapo. Transcurridos estos 20 minutos, todos los animales se perfundieron para la obtención de los encéfalos (ver **Tabla 6**). Posteriormente, mediante dFISH se valoró la activación de las principales poblaciones neuronales en la PrL y, mediante FISH e ISH, la activación neuronal y los cambios en la expresión de hnCRH en el PVN, respectivamente. El grupo BAS sirvió como control negativo del experimento y no fue incluido en el análisis estadístico.

Tabla 6: Protocolo experimental del Capítulo 3.



Resultados

Los resultados de las diferentes dFISH se analizaron mediante el modelo lineal generalizado (*Generalized Linear Models, GzLM*) y el modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE) cuando se incorporaron medidas repetidas. Los dos factores entre-sujeto fueron OLOR (con 2 niveles: con y sin exposición al olor del depredador) e IMO (con 2 niveles: con y sin exposición a la inmovilización en plancha). Para el análisis de la distribución de intensidades se introdujo un factor intra-sujeto RANGO (con 6 niveles de rango de intensidades). Así mismo, los detalles de las comparaciones entre grupos se comentarán cuando sea necesario.

En la **Figura 39** se pueden observar imágenes representativas de la activación de la **población glutamatérgica** en el área PrL. En la **Figura 40**, la descomposición de la interacción OLOR*IMO evidencia que, únicamente el olor del depredador es capaz de incrementar, respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo, el número de neuronas *c-fos*⁺ ($p < 0,001$), *c-fos*⁺/VGlut1⁺ ($p < 0,01$), *c-fos*⁺/VGlut1⁻ ($p < 0,001$) y el % de colocación ($p < 0,01$). La exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización resulta en una disminución de la activación, respecto al grupo expuesto al olor del depredador, en el número de neuronas *c-fos*⁺, *c-fos*⁺/VGlut1⁺, *c-fos*⁺/VGlut1⁻ y el % de colocación ($p < 0,001$ en todos los casos). El número total de neuronas VGlut1⁺ muestra un efecto del factor IMO (Wald $X^2(1) = 11,4$; $p = 0,001$).

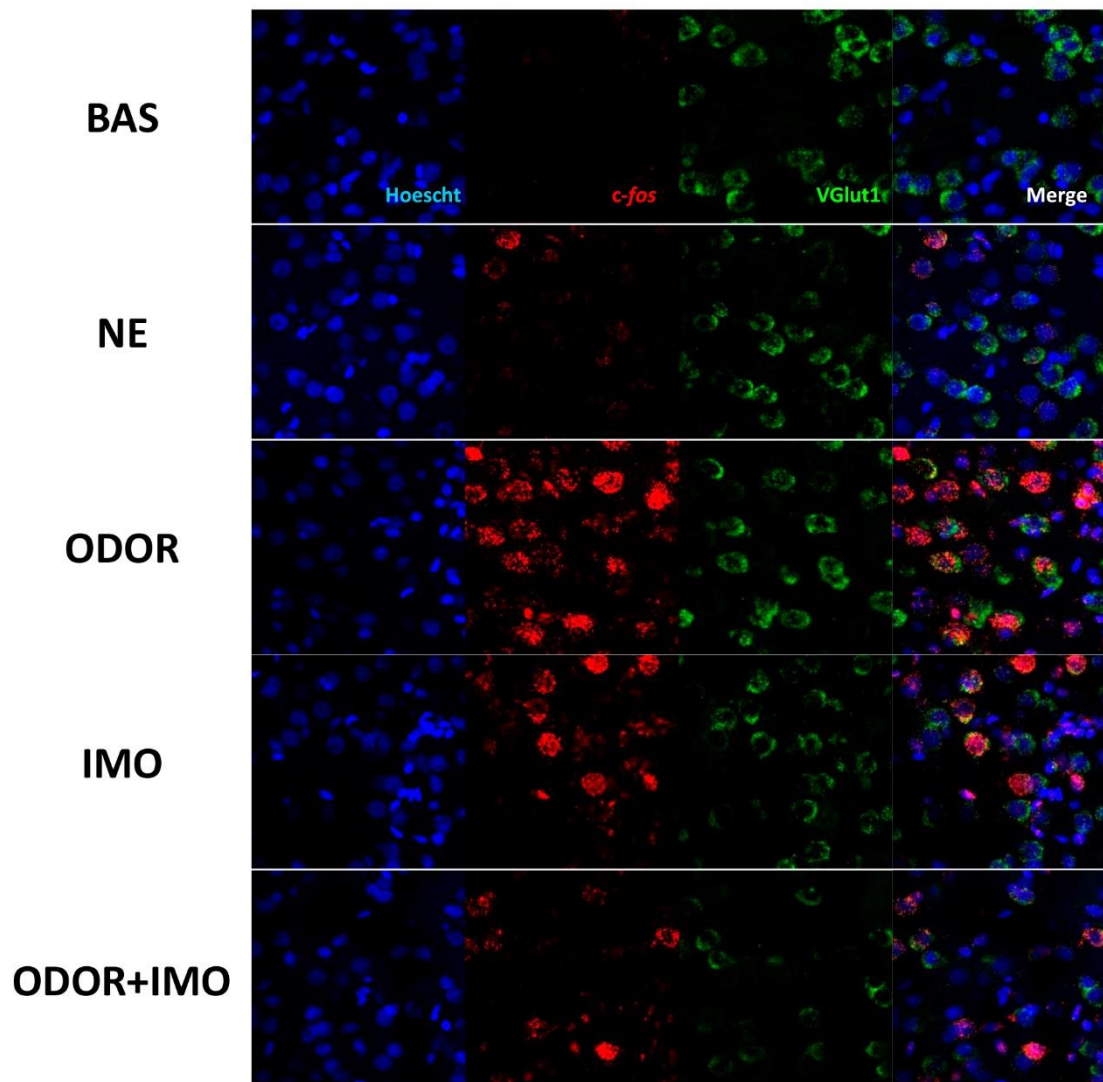


Figura 39. Imágenes representativas captadas a 40X de la dFISH VGlut1/*c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y la inmovilización en plancha.

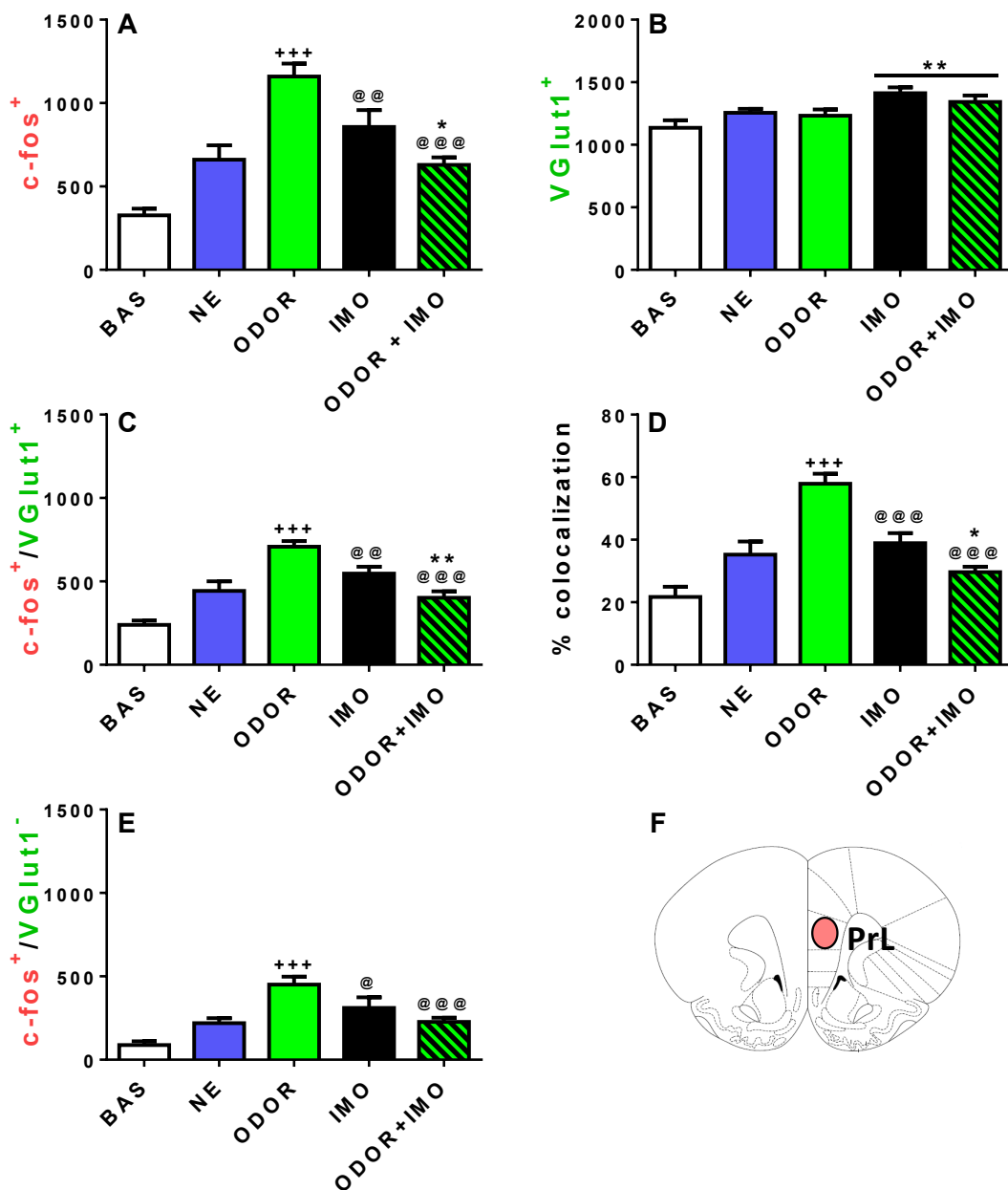


Figura 40. Activación de la población glutamatérgica en la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas VGlut1⁺; Panel C: Número de neuronas VGlut1⁺ activadas (c-fos⁺/VGlut1⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas VGlut1⁺ activadas respecto al total de la población VGlut1⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para VGlut1 (c-fos⁺/VGlut1⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapa inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapa con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapa inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapa con olor a gato. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. * p < 0,05; ** p < 0,01 vs grupo IMO o efecto del factor IMO; +++ p < 0,001 vs grupo NE; @ p < 0,05, @@ p < 0,01, @@@ p < 0,001 vs grupo ODOR.

La **Figura 41** muestra imágenes representativas de la activación de la **población GABAérgica** en las **capas superficiales** de la PrL. La descomposición de la interacción OLOR*IMO (ver **Figura 42**) muestra que, únicamente la exposición al olor del depredador aumentó el número de neuronas *c-fos*⁺, las *c-fos*⁺/GAD67⁺, las *c-fos*⁺/GAD67⁻ y el % colocalización respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo ($p < 0,001$ en todos los casos). La exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha mostró una reducción en todos los parámetros anteriormente mencionados, respecto al grupo expuesto al olor del depredador ($p < 0,001$ en todos los casos). Por último, observamos un efecto del factor OLOR (Wald $X^2(1) = 4,2$; $p < 0,05$) en el número total de neuronas GAD67⁺.

La **Figura 43** muestra la activación de la **población GABAérgica** en las **capas profundas** de la PrL. La descomposición de la interacción OLOR*IMO muestra que la exposición al olor del depredador incrementó el número de neuronas *c-fos*⁺, las *c-fos*⁺/GAD67⁺, y el % colocalización respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo ($p < 0,001$ en todos los casos). La exposición a la inmovilización en plancha únicamente incrementó el número de neuronas *c-fos*⁺ y el % colocalización respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo ($p < 0,05$). El número de neuronas *c-fos*⁺/GAD67⁻ mostró un efecto del factor OLOR (Wald $X^2(1) = 5,2$; $p < 0,05$). La exposición simultánea ambos estímulos mostró un incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺ respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo ($p < 0,01$) y una reducción, respecto al grupo expuesto al olor del depredador, del número de neuronas *c-fos*⁺/GAD67⁺ y el % colocalización ($p < 0,001$ en ambos casos). Por último, observamos un efecto de los factores OLOR (Wald $X^2(1) = 6,8$; $p < 0,01$) e IMO (Wald $X^2(1) = 8,8$; $p < 0,01$) en el número total de neuronas GAD67⁺.

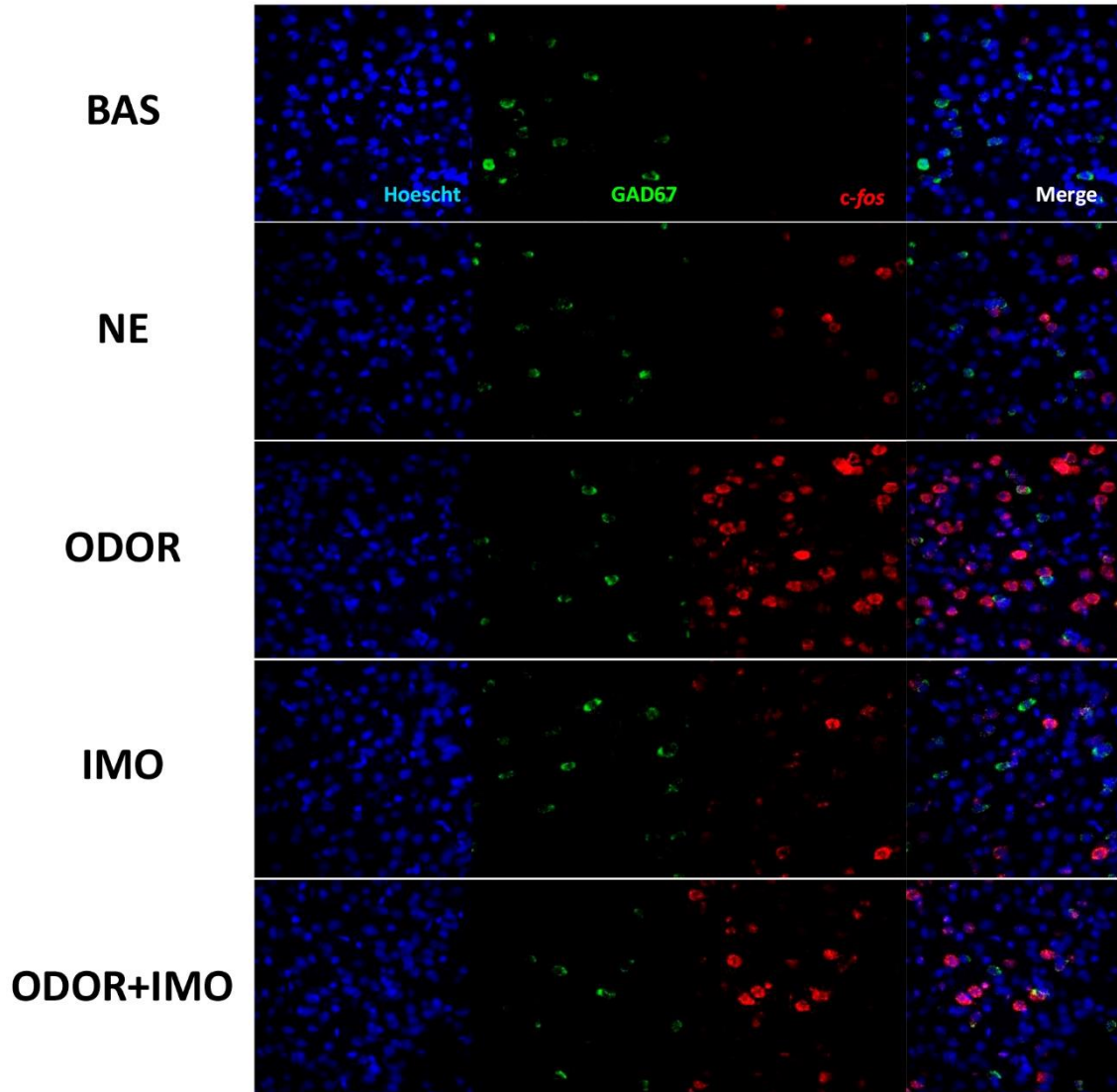


Figura 41. Imágenes representativas captadas a 20X de la *dFISH GAD67/c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización.

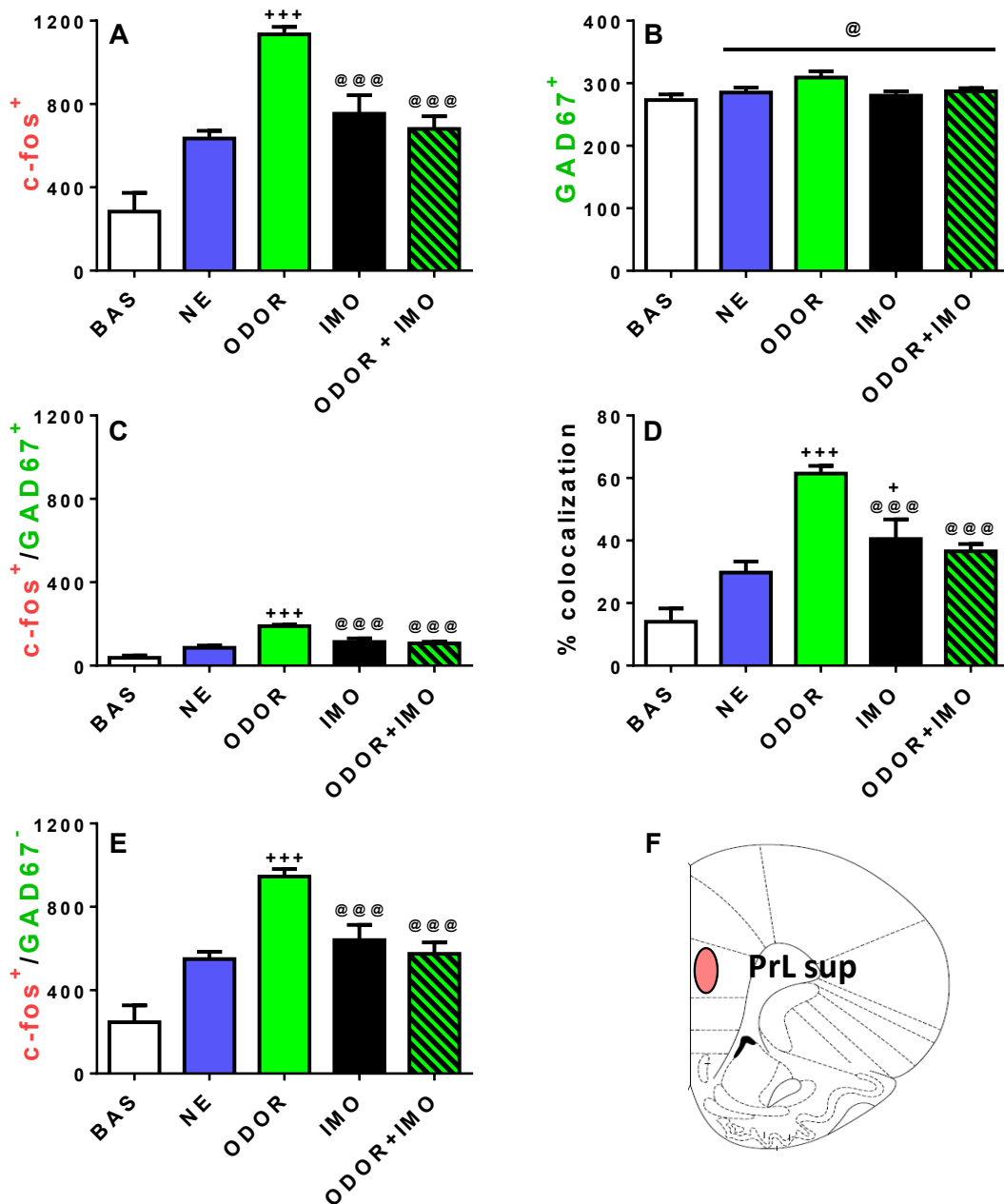


Figura 42. Activación de la población GABAérgica en las capas superficiales de la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización. **Panel A:** Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); **Panel B:** Número total de neuronas GAD67⁺; **Panel C:** Número de neuronas GAD67⁺ activadas (c-fos⁺/GAD67⁺); **Panel D:** Porcentaje del número de neuronas GAD67⁺ activadas respecto al total de la población GAD67⁺ (% colocalización); **Panel E:** Número de neuronas activadas que no son positivas para GAD67 (c-fos⁺/GAD67⁻); y **Panel F:** Esquema representativo de la localización estereotáctica del área analizada. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapa inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapa con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapa inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapa con olor a gato. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** p < 0,01 efecto del factor IMO; + p < 0,05; +++ p < 0,001 vs grupo NE; @ p < 0,05, @@@ p < 0,001 vs grupo ODOR o efecto del factor OLOR.

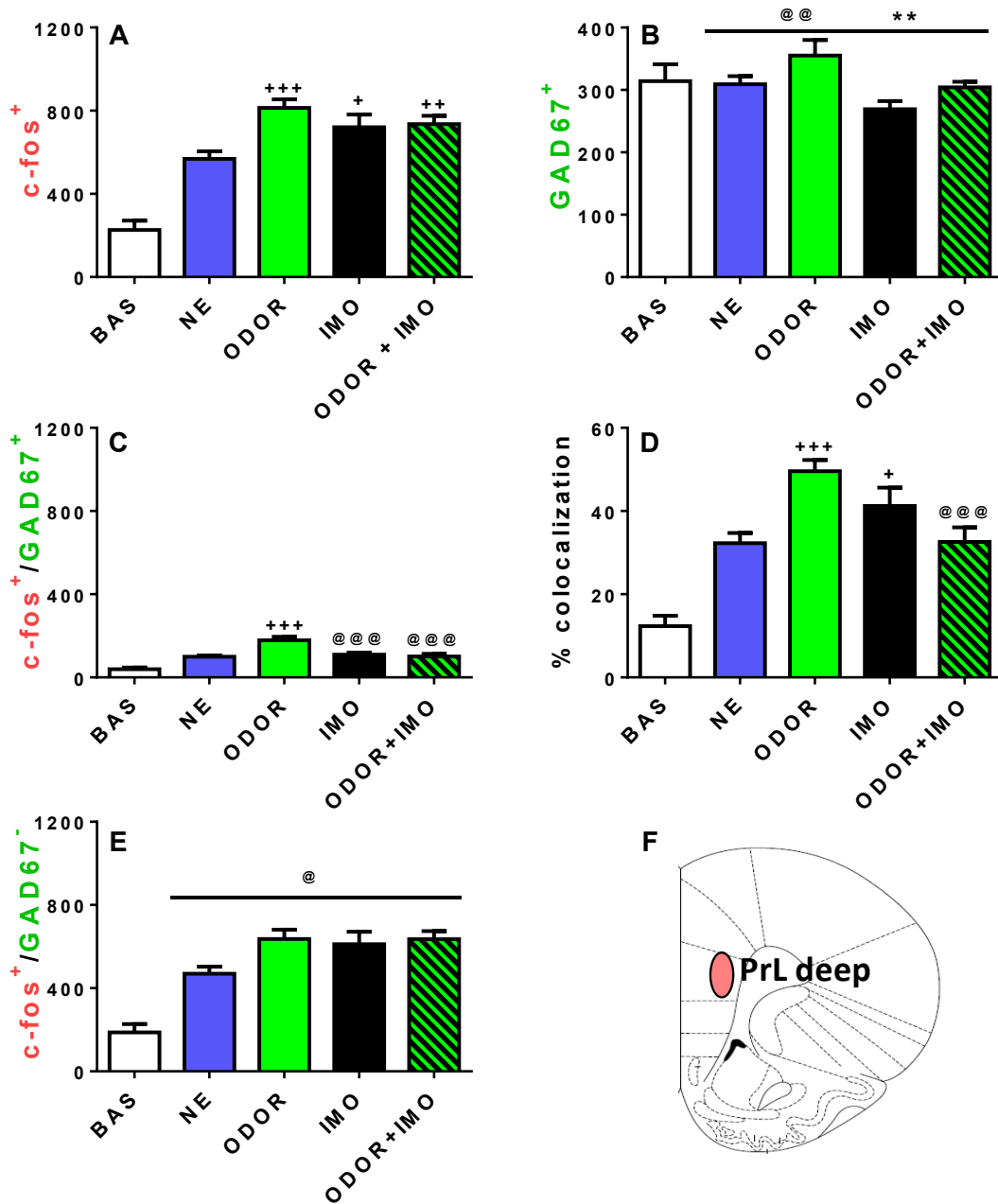


Figura 43. Activación de la población GABAérgica en las capas profundas de la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización. Panel A: Número total de neuronas activadas (c-fos⁺); Panel B: Número total de neuronas GAD67⁺; Panel C: Número de neuronas GAD67⁺ activadas (c-fos⁺/GAD67⁺); Panel D: Porcentaje del número de neuronas GAD67⁺ activadas respecto al total de la población GAD67⁺ (% colocalización); Panel E: Número de neuronas activadas que no son positivas para GAD67 (c-fos⁺/GAD67⁻) y; Panel F: Esquema representativo de la localización estereotóxica del área analizada. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapo inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapo inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor a gato. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas por mm² a excepción del Panel D donde los valores se representan en porcentaje. ** p < 0,01 efecto del factor IMO; + p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001 vs grupo NE; @ p < 0,05, @@@ p < 0,001 vs grupo ODOR o efecto del factor OLOR

La **Figura 44A** muestra los resultados del análisis de la varianza de la **señal integrada** de *c-fos* en el área PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. La descomposición de la interacción OLOR*IMO muestra que tanto la exposición al olor del depredador ($p < 0,001$) como a la inmovilización en plancha ($p < 0,05$) incrementan los niveles de expresión de *c-fos* respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo. Además, la exposición simultánea a ambos estímulos resulta en una disminución de los niveles de expresión de *c-fos* en comparación con el estímulo que mayor activación causó ($p < 0,001$ respecto al grupo expuesto al olor del depredador). La **Figura 44B** representa los resultados del análisis de la varianza de la **señal integrada** de *c-fos* por **neurona** en la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. La descomposición de la interacción OLOR*IMO mostró que tanto la exposición al olor del depredador ($p < 0,001$) como a la inmovilización en plancha ($p < 0,01$) incrementan la intensidad de activación por neurona respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo. La exposición simultánea a ambos estímulos resulta en una intensidad de activación por neurona similar al obtenido con cada estímulo por separado.

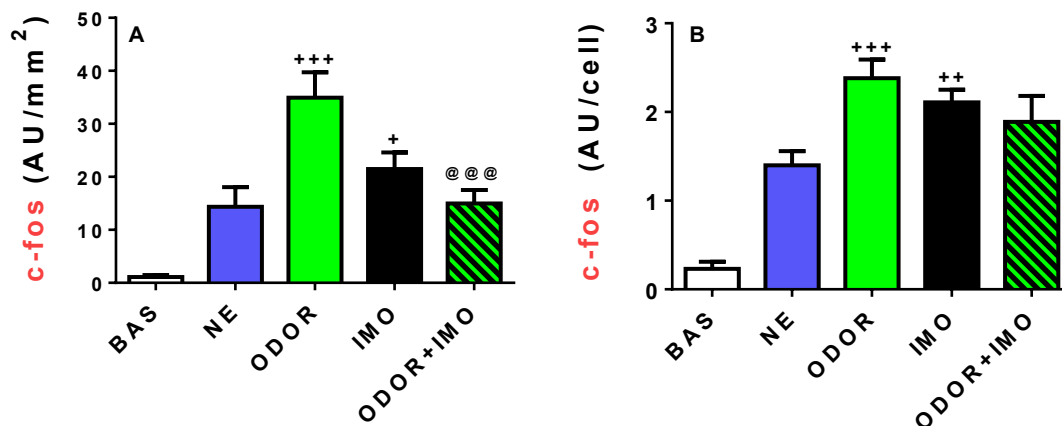


Figura 44. Cambios en la señal integrada de *c-fos* en la PrL tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización. Panel A: señal integrada de *c-fos* por mm² y; Panel B: señal integrada de *c-fos* por neurona. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato. Los valores del Panel A representan la media y el error estándar de los niveles de *c-fos* por mm² y en el Panel B se representa la media y el error estándar de los niveles de *c-fos* por neurona. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ vs grupo NE; @@@ $p < 0,001$ vs grupo OLOR.

En la **Figura 45A** se representan los resultados del análisis de la varianza de la **activación neuronal de *c-fos*** en el PVN en respuesta a la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. La descomposición de la interacción OLOR*IMO mostró que tanto la exposición al olor del depredador como a la inmovilización en plancha aumentó el número de neuronas *c-fos*⁺ en el PVN respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo ($p < 0,001$ en ambos casos). Sin embargo, la exposición a la inmovilización en plancha indujo una mayor activación que la causada por la exposición al olor del depredador ($p < 0,001$). La exposición simultánea a ambos estímulos resultó en una activación similar a la causada por el estímulo de mayor intensidad, la inmovilización en plancha.

En la **Figura 45B** se representan los resultados del análisis de la varianza de los niveles de **expresión del RNA heteronuclear del gen del CRH** en el PVN. La descomposición de la interacción OLOR*IMO muestra que tanto la exposición al olor del depredador ($p < 0,01$) como a la inmovilización en plancha ($p < 0,001$) incrementan los niveles de expresión del gen del CRH respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo. Además, la exposición a la inmovilización en plancha incrementó en mayor medida la expresión del RNA heteronuclear del CRH en comparación con el grupo expuesto al olor del depredador ($p < 0,001$). Por último, la exposición simultánea a ambos estímulos no causó una mayor activación que la inducida únicamente por la inmovilización en plancha.

La **Figura 46** muestra los resultados del análisis de la varianza de la **distribución de la señal integrada por neurona de *c-fos*⁺**. Se observó efecto de los factores OLOR (Wald $X^2(1) = 15,9$; $p < 0,001$), IMO (Wald $X^2(1) = 117,5$; $p < 0,001$) y RANGO (Wald $X^2(1) = 539,8$; $p < 0,001$) y de las interacciones OLOR*IMO (Wald $X^2(1) = 12,1$; $p = 0,001$), IMO*RANGO (Wald $X^2(1) = 65,0$; $p < 0,001$) y OLOR*IMO*RANGO (Wald $X^2(1) = 18,0$; $p < 0,01$). Si bien se pueden considerar comparaciones particulares (ver Figura 37), la conclusión general de la descomposición de la interacción OLOR*IMO*RANGO es que la intensidad de *c-fos* por célula se incrementa, respecto al grupo expuesto al ambiente nuevo, tras la exposición tanto al olor del depredador como a la inmovilización en plancha, siendo mayor en este último estímulo estresante. La exposición simultánea a

ambos estímulos resulta en un patrón de intensidad de *c-fos* por célula similar al obtenido con la inmovilización en plancha.

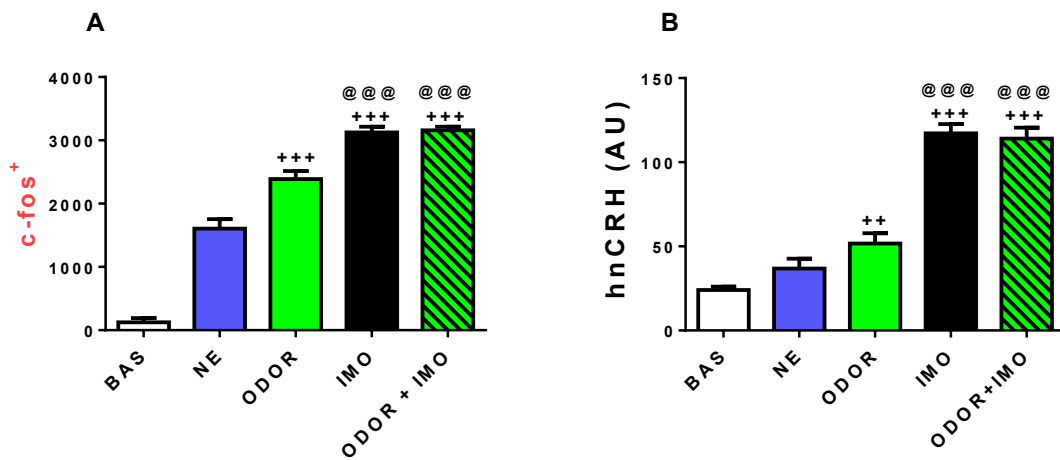


Figura 45. Expresión de mRNA de *c-fos* y hnRNA de CRH en el PVN tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. **Panel A:** Cuantificación del número total de neuronas *c-fos*⁺ activas (*c-fos*⁺); y **Panel B:** Niveles de expresión del RNA heteronuclear del gen del CRH. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato. En el panel A, los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas *c-fos*⁺ por mm², mientras que en el panel B hacen lo propio con los valores de la densidad integrada (ID) de RNA heteronuclear del CRH. ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 vs grupo NE; @@@ p < 0,001 vs grupo ODOR.

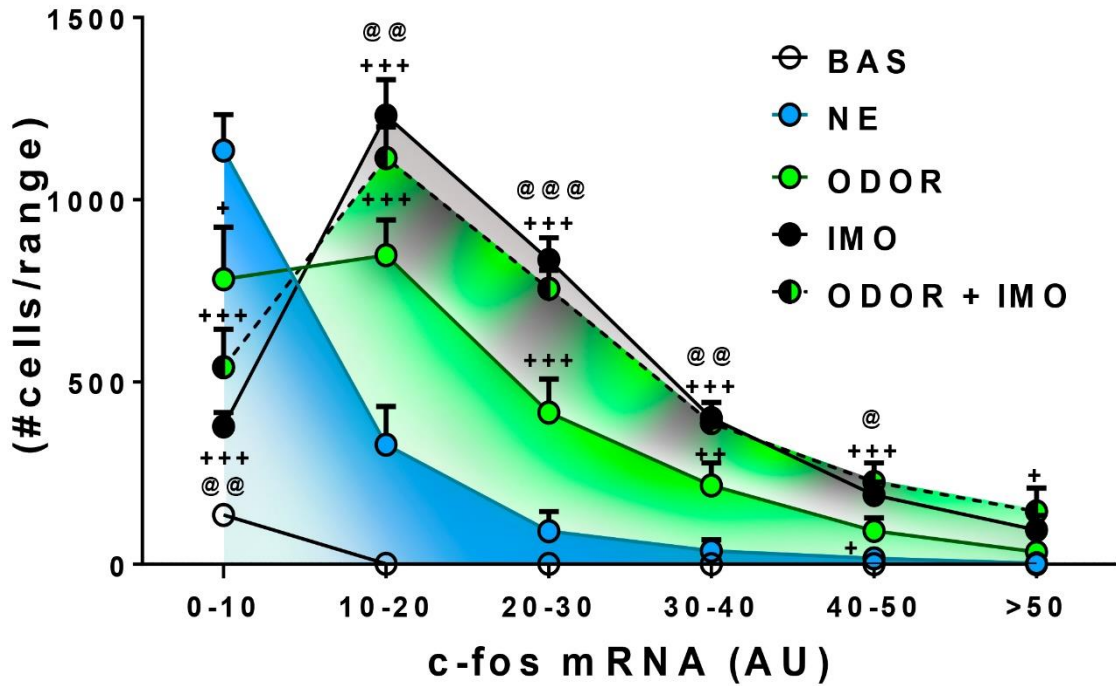


Figura 46. Distribución de la señal integrada de *c-fos* por neurona en el PVN tras la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha. BAS (n = 8) representa el grupo no manipulado; NE (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapo inodoro; ODOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapo inodoro; y ODOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trapo con olor a gato. Los valores representan la media y el error estándar del número de neuronas de *c-fos* por mm² distribuidas por rango de intensidad de señal. + p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001 vs grupo NE; @ p < 0,05; @@ p < 0,01; @@@ p < 0,001 vs grupo ODOR.

Discusión general

Discusión general

La finalidad de la presente tesis es conocer cómo se comportan poblaciones neuronales específicas de áreas del SNC relacionadas con la respuesta de estrés ante la exposición simultánea a diferentes tipologías de estímulos estresantes. El presente trabajo se enmarca en el interés de nuestro laboratorio por la interacción entre estímulos estresantes de diferente o igual naturaleza cuando éstos se presentan de manera simultánea (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011; Gómez-Román *et al.*, 2016; Gagliano *et al.*, 2017). La exposición simultánea a la anfetamina (que puede considerarse como un estímulo estresante farmacológico) y a un estímulo estresante emocional (natación forzada) o sistémico (interleukina 1 β) reduce la respuesta fisiológica y central del eje HPA a estos últimos (Gómez-Román *et al.*, 2016; Gagliano *et al.*, 2017). Puesto que la anfetamina es un psicoestimulante, también hemos abordado la posible interacción entre un derivado de la anfetamina de uso terapéutico (metilfenidato) y la exposición a un estímulo estresante emocional, demostrándose una reducción en la respuesta fisiológica del eje HPA a este último (Gagliano, 2015). Finalmente, también hemos explorado previamente la posible interacción entre dos estímulos estresantes emocionales como son el olor al depredador y la inmovilización en plancha (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011), observándose que la exposición a la inmovilización en plancha no es capaz de interferir con la eficacia del olor del depredador para inducir miedo condicionado, aunque se observa una tendencia a una menor respuesta del eje HPA en los animales expuestos a ambos estímulos de manera simultánea en comparación con los animales expuestos a la inmovilización en plancha (estímulo más intenso).

En base a estos precedentes, la presente tesis tiene como objetivo exponer a los animales de manera simultánea a dos estímulos estresantes (anfetamina/metilfenidato y natación forzada por un lado, o bien olor de depredador e inmovilización en plancha por otro) y valorar, mediante el uso de técnicas de doble hibridación *in situ* fluorescente (dFISH), los patrones de activación neuronal de las principales poblaciones neuronales en algunas de las áreas del SNC relacionadas con la respuesta a los psicoestimulantes y al estrés.

Interacción entre psicoestimulantes y estrés

Se realizaron dos experimentos: en el primero, unos animales recibieron anfetamina (4 mg/kg, vía subcutánea) o fueron expuestos a 30 minutos natación forzada por separado, mientras que otros fueron expuestos de manera simultánea a ambos estímulos; en el segundo, unos animales fueron administrados con metilfenidato (0,5 mg/kg, vía subcutánea) o fueron expuestos a 30 minutos de natación forzada por separado, mientras que otros fueron expuestos de manera simultánea a ambos estímulos. Se analizó, mediante dFISH, la activación de las principales poblaciones neuronales en áreas relacionadas con el estrés. A lo largo de la discusión comentaremos primero los efectos producidos por la exposición a la natación forzada y a la administración de psicoestimulantes (anfetamina y metilfenidato) por separado, continuando con la discusión de los efectos de la exposición simultánea a los psicoestimulantes y la natación forzada.

Natación forzada

La exposición a 30 minutos de natación forzada indujo un importante incremento de neuronas *c-fos*⁺ en las subdivisiones PrL e IL de la mPFC, en las subdivisiones CPuDM y CPuDL del estriado, en el PVN y en el LC. Sin embargo, ni la subdivisión CPuVM del estriado ni el VTA mostraron inducción de *c-fos*. El patrón de activación observado en el presente trabajo se asemeja al de estudios previos en los que se demuestra que la exposición a estímulos estresantes de carácter emocional (o predominantemente emocional) provoca una inducción generalizada de *c-fos* en áreas como la mPFC, el Acb, el LS, la MeA, el PVN, el rafe dorsal y el LC (Cullinan *et al.*, 1995; Li y Sawchenko, 1998; Ons *et al.*, 2004, Armario 2006b).

En la mPFC la exposición a 30 minutos de natación forzada fue capaz de inducir la expresión de *c-fos* tanto en la población glutamatérgica (VGlut1⁺) como en la población GABAérgica (GAD67⁺) de las subdivisiones PrL e IL. Sin embargo, la capacidad de la natación forzada de activar estas dos poblaciones es diferente en función del área

analizada. Así, en la PrL pudimos observar como la natación forzada activó aproximadamente el 40% del total de neuronas de ambas poblaciones neuronales, mientras que en la IL este porcentaje fue de un 20% aproximadamente.

Está ampliamente demostrado que la exposición aguda a estímulos estresantes emocionales como el ambiente nuevo, el *restraint*, la natación forzada y la inmovilización en plancha inducen la expresión de *c-fos* en la mPFC (Cullinan *et al.*, 1995; Li y Sawchenko, 1998; Ons *et al.*, 2004; Armario, 2006b; Rotllant *et al.*, 2013). Sin embargo, existen muy pocos estudios que hayan abordado la activación de poblaciones neuronales específicas de la mPFC en respuesta a los estímulos estresantes emocionales. En una primera aproximación, Ostrander y colaboradores (2003b), demostraron que la exposición a *restraint* indujo la expresión de c-Fos en neuronas de la mPFC que expresaban el receptor de glucocorticoides, lo que sugiere que estas neuronas de la PrL e IL podrían ser claves para la retroinhibición negativa de los glucocorticoides sobre el eje HPA tras la exposición al estrés (McKlveen *et al.*, 2013). Más tarde, Shepard y colaboradores (2016) demostraron en ratones que la exposición a un ambiente nuevo inducía la expresión de *c-fos* en neuronas GABAérgicas positivas para parvalbúmina tanto en la PrL como la IL. La inducción de *c-fos* tras la exposición a estímulos estresantes emocionales se da tanto en la PrL como en la IL, aunque cada subdivisión parece influir sobre el eje HPA de manera diferente. La activación de las neuronas glutamatérgicas de la PrL harían relevo en neuronas GABAérgicas del BNST, inhibiendo la respuesta del eje HPA al *restraint* (Radley *et al.*, 2009), mientras que la activación de las neuronas de la IL, harían relevo en el hipotálamo posterior, activando el eje HPA (Myers *et al.*, 2016). Nuestros datos y estos pocos estudios previos muestran la importancia de conocer en profundidad el fenotipo neuronal activado en respuesta a diferentes estímulos estresantes emocionales para tener una mejor comprensión del procesamiento de los estímulos estresantes por parte del SNC y sus posibles consecuencias negativas.

En el **estriado**, la exposición a 30 minutos de natación forzada incrementó la expresión de *c-fos* en la población D2R⁺ en las 3 subdivisiones analizadas (CPuDM, CPuDL y

CPuVM), activando entre un 10 y un 15 % del total de dicha población. Este incremento en la expresión de *c-fos* fue más robusto en las subdivisiones dorsales del estriado que en las ventrales. Además, en las subdivisiones dorsales observamos que la natación forzada activó tanto las neuronas D2R⁺ como las D2R, mientras que en las subdivisiones ventrales únicamente hubo incremento en la expresión de *c-fos* en las neuronas D2R⁺. En el estriado el 95% de las neuronas son de proyección y expresan D1R o D2R en igual porcentaje, en tanto que sólo un 5% son interneuronas GABAérgicas o colinérgicas (Graybiel 1990b), por lo que podemos inferir que la activación en la población neuronal que no expresa D2R es, en su mayoría, neuronas que expresan D1R.

Estudios previos han observado inducción de *c-fos* en el estriado tras la exposición a diferentes estímulos estresantes como un ambiente nuevo (Badiani *et al.*, 1998; 1999; Ons *et al.*, 2004), la natación forzada (Cullinan *et al.*, 1995; Ons *et al.*, 2004), o la inmovilización en plancha (Ons *et al.*, 2004). Respecto a las poblaciones neuronales principales del CPu (D1R y D2R), se ha demostrado que la exposición a un ambiente nuevo provoca una modesta inducción de *c-fos* en ambas poblaciones neuronales (Badiani *et al.*, 1999; Uslaner *et al.*, 2001b; Ferguson *et al.*, 2003). Además, un estudio reciente de Clark y colaboradores (2014) demostró que, tras la exposición a una sesión de choques eléctricos incontrolables, existía inducción de *c-fos* en un 5 % de las neuronas D1R y un 8% de las D2R del estriado. Tomados en conjunto nuestros datos y los de estos otros estudios, indican que los estímulos estresantes emocionales inducen la activación de *c-fos* en un número modesto de neuronas de ambas poblaciones mayoritarias del estriado.

En el PVN observamos una marcada activación de *c-fos* que afectó prácticamente a la totalidad de neuronas que expresan CRH (CRH⁺). El PVN es el principal núcleo de control del eje HPA y se ha demostrado, repetidamente, que existe inducción de *c-fos* en dicho núcleo tras la exposición a estímulos estresantes tanto emocionales como sistémicos (Cullinan *et al.*, 1995; Li y Sawchenko, 1998; Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013; Gómez-Román; Marín-Blasco *et al.*, 2017; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018). El PVN, al igual que otras áreas críticas en la regulación del eje HPA como el LSv y el LC, es sensible a la

intensidad del estímulo estresante, mostrando unos niveles de inducción de *c-fos* proporcionales a la intensidad de dichos estímulos (Campeau y Watson, 1997; Ons *et al.*, 2004; Pace *et al.*, 2005; Rotllant *et al.*, 2013; Marín-Blasco *et al.*, 2017). Esta última conclusión viene apoyada por datos de nuestro laboratorio comparando tres estímulos estresantes que difieren en intensidad (ambiente nuevo, olor al depredador e inmovilización en plancha), en los que se observa que la activación de la población CRH⁺ es proporcional a la intensidad del estímulo estresante, causando la inmovilización en plancha una activación de prácticamente la totalidad de la población CRH⁺ (Úbeda-Contreras *et al.*, 2018). En el presente trabajo hemos observado que la exposición a la natación forzada también activa la práctica totalidad de neuronas CRH⁺ del PVN. Teniendo en cuenta que la natación forzada es un estímulo estresante menos intenso que la inmovilización en plancha, valorado por los diferentes marcadores de intensidad del estrés (Rabasa *et al.*, 2015; Marín-Blasco *et al.*, 2017), ¿cómo es posible que, a igualdad de neuronas CRH⁺ activadas, la natación forzada genere una menor respuesta al estrés que la inmovilización en plancha? Como indican los resultados del último experimento de la presente tesis, estímulos estresantes de intensidad baja/moderada (ambiente nuevo y olor al depredador) activan un gran número de neuronas de *c-fos* en los rangos de menor intensidad, mientras que estímulos estresantes de mayor intensidad (inmovilización en plancha) reclutan un mayor número de neuronas de *c-fos* en los rangos de alta intensidad. De esta manera, parece probable que las neuronas de CRH del PVN se vayan reclutando progresivamente con estímulos de intensidad baja/moderada y, una vez superado este umbral, las diferencias entre estímulos se reflejen en la intensidad con la que éstas se activan, de tal manera que a mayor intensidad se produzca una mayor liberación de CRH.

En el experimento 1 no observamos activación de *c-fos* en el VTA, ni en la población dopaminérgica (caracterizada mediante la detección de la enzima tirosina hidroxilasa, TH) ni en la población que no expresa TH. Sin embargo, en el experimento 2 sí que pudimos observar activación en un 10% del total de neuronas dopaminérgicas, además de un incremento en la activación de neuronas que no expresan TH. Si analizamos en detalle los resultados, observamos que la exposición a la natación forzada activó un

número de neuronas *c-fos*⁺ muy similar en ambos experimentos (entre 50 y 60 neuronas por mm²), pero el número de neuronas de *c-fos*⁺ activadas por la inyección de vehículo fue mayor en el experimento 1, pudiendo enmascarar el efecto de la exposición a la natación forzada. Si dicha activación no guarda relación con la intensidad del estímulo estresante, como parece ser el caso (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013), pequeñas diferencias en la manipulación de los animales o la respuesta de los mismos entre experimentos podrían afectar a la inducción de *c-fos* en el grupo administrado con vehículo. El mero hecho de administrar vehículo a los animales podría actuar como un estímulo estresante de baja intensidad, con el consiguiente aumento en la inducción de *c-fos* (datos no mostrados). Así, no es descartable que las diferencias observadas entre los dos experimentos en respuesta a la exposición a la natación forzada, puedan deberse a una mayor respuesta de los animales a la inyección de vehículo. En este sentido, cabe mencionar la importancia de incluir un grupo en condiciones totalmente basales como control negativo del experimento. Aunque no estén representados en la estadística, hemos venido observando cómo la expresión de *c-fos* en el grupo Basal es prácticamente nula, poniendo de manifiesto la calidad de la técnica, así como la ausencia de efecto de manipulaciones no controladas.

El poco nivel de activación del VTA puede explicar los datos controvertidos que se encuentran en la literatura. No se ha observado inducción de *c-fos* en el VTA tras la exposición a estímulos estresantes de carácter emocional como la derrota social (Nikulina *et al.*, 1998) o al *restraint* (Watanabe *et al.*, 1994). Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios previos en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación, en los que sí se ha observado inducción de *c-fos* tras la exposición a estímulos estresantes como un ambiente nuevo o la inmovilización en plancha (Rotllant, 2008) y tras la reexposición al ambiente donde previamente se habían recibido choques eléctricos (Beck y Fibiger, 1995). Destaca el trabajo de Deutch y colaboradores (1991) que demostraron que tras la exposición al *restraint* existía una inducción específica de *c-Fos* en las neuronas que proyectan del VTA a la mPFC. Una posible explicación a la discrepancia entre resultados podría deberse al diseño experimental. Mientras que en el

presente trabajo los animales fueron perfundidos de manera inmediata tras la exposición a la natación forzada, en Rotllant (datos no publicados) los animales fueron perfundidos 1 hora y 40 minutos después de la terminación del estímulo estresante con el objetivo de valorar los niveles de la proteína c-Fos por inmunohistoquímica. En este sentido, Brischoux y colaboradores (2009) han observado que aproximadamente la mitad de las neuronas dopaminérgicas del VTA inhibidas por el choque eléctrico se activan una vez ha cesado el estímulo aversivo, sugiriendo que la terminación del estímulo aversivo, y no tanto la propia exposición a dicho estímulo, sería la causante, al menos en parte, de la activación de las neuronas del VTA.

Otra manera de evaluar la actividad de las neuronas del VTA es estudiar mediante microdiálisis la liberación de DA en el VTA (Zhang *et al.*, 1994) o en las áreas de proyección (Imperato *et al.*, 1991; Jedema y Moghaddam, 1994). Existen numerosas evidencias del aumento de los niveles extracelulares de DA en áreas como la mPFC y el Acb en respuesta al *restraint*, la inmovilización en plancha, los choques eléctricos y el olor al depredador (ver revisión en Holly y Miczek, 2016). Sin embargo, respecto a la natación forzada hay ciertas discrepancias, Jordan y colaboradores (1994) no observaron incremento en los niveles de DA en la mPFC tras la exposición a ocho minutos de natación forzada, en tanto que Azzi y colaboradores (1998) demostraron un incremento en los niveles extracelulares de DA en la mPFC tras la exposición a diez minutos de natación forzada. Se requieren de futuros estudios para acabar de dilucidar la activación del VTA tras la exposición a la natación forzada.

En el LC se observó una robusta inducción de *c-fos* tras la exposición a la natación forzada en la población noradrenérgica (TH⁺), activándose aproximadamente un 80 % del total de dicha población. También se observó un pequeño incremento en la población de neuronas que no expresa TH.

En consonancia con nuestros resultados, numerosos trabajos han demostrado inducción de *c-fos* en el LC tras la exposición a distintos tipos de estímulos estresantes (Brady, 1994; Cullinan *et al.*, 1995; Kollack-Walker *et al.*, 1997; Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013),

discriminando entre estímulos estresantes de diferente intensidad (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013). El LC es la fuente principal de NA de la corteza y del hipocampo. De hecho, la exposición aguda a la inmovilización en plancha induce una liberación masiva de NA en áreas relacionadas con la respuesta del estrés como son la mPFC, el LS, el BNST, la CeA y la MeA (ver revisión en Morilak *et al.*, 2005). Esta liberación masiva de NA estaría relacionada con el estado de alerta general (“*arousal*”) en situaciones de estrés (Ziegler *et al.*, 1999) y sería la responsable de promover un gran número de respuestas conductuales ansiogénicas asociadas a la exposición aguda al estrés, incluyendo la reducción de la interacción social o la disminución del tiempo de exploración de espacios abiertos (ver revisión en Morilak *et al.*, 2005).

La exposición tanto a estímulos estresantes emocionales como sistémicos, provoca también un aumento en la liberación de NA en el PVN (Pacak *et al.*, 1995). La influencia directa del LC sobre el eje HPA no parece ser muy importante dado que apenas tiene conexiones directas con el PVN (Sawchenko y Swanson, 1982; Dunn *et al.*, 2004), pero no se descarta una posible influencia indirecta, ya que el LC proyecta a otras estructuras en posición de regular la actividad del eje HPA como son la mPFC, la FH y la amígdala (Herman y Cullinan, 1997; Radley *et al.*, 2008). De hecho, la respuesta del eje HPA al *restraint* se ve reducida por lesiones neurotóxicas del LC (Ziegler *et al.*, 1999, Radley *et al.*, 2008). No obstante, las lesiones en el LC no siempre afectan a la actividad de las neuronas del PVN o a la liberación de corticosterona tras la exposición a la natación forzada (Ritter *et al.*, 2003). La mayor fuente de proyecciones noradrenérgicas al PVN proceden de las neuronas del grupo celular catecolaminérgico A2, confinadas en gran parte en el NTS (Cunningham y Sawchenko, 1988). Se ha demostrado que lesionando estas proyecciones noradrenérgicas al PVN existe una reducción en la inmunoreactividad del CRH y una mitigación de la respuesta del eje HPA (Sawchenko, 1988; Li *et al.*, 1996). Por lo tanto, las neuronas de proyección noradrenérgicas del área A2 serían las responsables de activar el eje HPA en respuesta a estímulos estresantes tanto sistémicos (Ritter *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2011) como emocionales (Flak *et al.*, 2014). Las neuronas de proyección noradrenérgicas del LC influirían en la respuesta de estrés, no tanto en

cuanto al eje HPA, sino actuando sobre otras áreas relacionadas con la respuesta del estrés como la mPFC, la FH o la amígdala para promover respuestas ansiogénicas.

Anfetamina

Gran parte de la literatura relacionada con la activación del SNC por la administración aguda de amfetamina ha utilizado la expresión de IEGs como herramienta y se ha centrado en áreas de proyección dopaminérgica como el estriado o el Acb (Graybiel *et al.*, 1990a; Johansson *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). No obstante, algunos estudios han obtenido una imagen general del procesamiento del SNC tras la administración aguda de amfetamina, demostrando la activación de áreas como la mPFC, el LSv, el BNST, el PVN y núcleos del tronco encefálico como el VTA o el LC (Badiani *et al.*, 1998; Harlan y García, 1998; Day *et al.*, 2001; Uslaner *et al.*, 2001a; 2001b; Colussi-Mas *et al.*, 2007; Rotllant *et al.*, 2010). Sin embargo, la inducción de *c-fos* en su forma simple no permite identificar el fenotipo de las poblaciones neuronales activadas. Por este motivo, hemos hecho uso de las técnicas de doble marcaje (dFISH) para la caracterización del fenotipo de dichas neuronas.

En la mPFC observamos que la administración aguda de amfetamina produjo un incremento en la expresión de *c-fos* en las neuronas VGlut1⁺ y GAD67⁺ tanto en la subdivisión PrL como la IL, siendo dicho incremento más robusto en la IL. Los datos mostraron una activación del 30% del total de la población neuronal tanto glutamatérgica como GABAérgica en la PrL, mientras que en la IL se produce una activación cercana al 20% en ambas poblaciones neuronales.

Está ampliamente demostrado que la administración aguda de amfetamina provoca la inducción de *c-fos* tanto en la subdivisión PrL como IL de la mPFC (Day *et al.*, 2001; Ostrander *et al.*, 2003a; Rotllant *et al.*, 2010). Combinando la administración de amfetamina con el uso de retro-trazadores y la detección de *c-Fos*, se ha demostrado un incremento en el número de neuronas piramidales activadas de la mPFC que proyectan tanto al VTA (Colussi-Mas *et al.*, 2007) como al LH (Morshedi y Meredith, 2008),

sugiriendo la activación de una vía glutamatérgica directa a dichas áreas. Además, tras la administración aguda de 1,5 mg/kg de anfetamina se ha demostrado un incremento en la expresión de *c-Fos* en las interneuronas que expresan parvalbúmina en la capa III del área PrL, pero no en el área IL (Morshedi y Meredith, 2007). Aunque la mayoría de interneuronas GABA⁺ colocalizan con parvalbúmina, existen otras interneuronas que colocalizan con otros marcadores como calretinina o calbindina (Gabbott *et al.*, 1997). Por lo tanto, la ausencia de inducción de *c-fos* en las interneuronas positivas para parvalbúmina en la IL en el trabajo de Morshedi y Meredith (2007) no implica que no exista inducción de *c-fos* en otro tipo de interneuronas GABAérgicas. En el presente trabajo hemos observado una modesta inducción de *c-fos* en las neuronas GABAérgicas de la PrL en comparación con la IL. Las diferencias en las dosis de anfetamina administradas (1,5 mg/kg en el trabajo mencionado y 4 mg/kg en el presente trabajo) pueden explicar parte de estas diferencias. En algunas áreas como la PrL, la administración aguda de dosis bajas de anfetamina (1,5 mg/kg) provoca una mayor inducción de *c-Fos* que la administración de 5 mg/kg de anfetamina (Rotllant *et al.*, 2010). Es probable que neuronas de otros núcleos que proyectan a la PrL y que se activan con dosis altas de anfetamina, podrían estar implicadas en la inhibición de las neuronas GABAérgicas de la PrL explicando, en parte, la modesta inducción de *c-fos* en la población neuronal GABAérgica de la PrL observada en el presente trabajo. Se requieren futuros estudios que evalúen, en las diferentes capas de la mPFC, los efectos de la administración aguda de anfetamina sobre la inducción de *c-fos* en los diferentes tipos de interneuronas.

En el **estriado dorsal** observamos que la administración aguda de anfetamina incrementó la inducción de *c-fos* en la población neuronal que no expresa D2R (presumiblemente D1R⁺) en las tres subdivisiones analizadas (CPuDM, CPuDL y CPuVM). La administración de anfetamina no ejerció efecto alguno sobre la activación de la población neuronal D2R⁺ en las subdivisiones CPuDM y CPuDL, pero sí provocó un pequeño incremento en la inducción de *c-fos* en la población neuronal D2R⁺ en la subdivisión CPuVM.

En consonancia con nuestros datos, existen numerosas evidencias que demuestran que la administración aguda de anfetamina induce la activación de *c-fos* en la población neuronal D1R⁺ (Graybiel *et al.*, 1990a; Berretta *et al.*, 1992; 1993; Ruskin y Marshall 1994; Konradi *et al.*, 1996; Harlan y García, 1998; Badiani *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2003). En consonancia, la inducción de *c-Fos* en el estriado causada por la administración de 5 mg/kg de anfetamina se bloquea tras la administración de antagonistas D1R como el SCH 23390 (Graybiel *et al.*, 1990a; Snyder-Keller, 1991). La contribución de la DA a la activación de las neuronas D2R⁺ es controvertida. La destrucción de las terminales de DA del estriado bloquean completamente la inducción de *c-fos* en las neuronas D1R⁺ pero en cambio no es capaz de bloquear la inducción en las neuronas D2R⁺ (Badiani *et al.*, 1999). En cambio, la administración de antagonistas de los D2R sí reduce la activación de *c-fos* causada por la anfetamina en el estriado (Graybiel *et al.*, 1990a; Ruskin y Marshall, 1994; LaHoste *et al.*, 2000). Así, la inducción de *c-fos* en el estriado tras la administración de anfetamina requeriría de la activación de las dos poblaciones neuronales mayoritarias del estriado, como confirman estudios más recientes (Ferguson *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado en el estriado y el Acb, que los receptores de adenosina A_{2A} colocalizan únicamente con las neuronas D2R⁺, en tanto que los receptores de adenosina A₁ lo harían con las neuronas D1R⁺ (Fink *et al.*, 1992), situando a los receptores de adenosina en una posición ideal para regular la inducción de *c-fos* provocada por la administración de anfetamina. De hecho, la administración de un agonista de los receptores A_{2A}, pero no de los A₁, atenúa la inducción de *c-Fos* causada por la administración de 1,5 mg/kg de anfetamina en el estriado y el Acb (Turgeon *et al.*, 1996).

Otro neurotransmisor implicado en la inducción de *c-fos* por la anfetamina es el glutamato, que parece ejercer sus efectos a través de los receptores NMDA, como se ha demostrado mediante el bloqueo con el antagonista MK-801 (Snyder-Keller, 1991). La expresión de *c-fos* inducida por la anfetamina requeriría la entrada de calcio en las neuronas a través de los receptores NMDA y el bloqueo de estos receptores disminuiría la habilidad de la DA para fosforilar cAMP, condición necesaria para inducir la expresión

de *c-fos* (Konradi *et al.*, 1996). No obstante, la habilidad de los receptores NMDA para inducir la expresión de *c-fos* podría ser distinta en otras áreas estriatales, ya que el MK-801 no es capaz de inhibir la inducción de *c-Fos* en el Acb (Dalia y Wallace, 1995).

En el PVN pudimos observar que la administración aguda de anfetamina indujo la expresión de *c-fos* en aproximadamente un 65% de las neuronas CRH⁺, siendo dicha activación menos intensa que la producida por la exposición a la natación forzada. Aunque se ha demostrado que la administración de anfetamina activa el eje HPA (valorada por los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona) todavía se desconocen los mecanismos precisos de dicha activación (Swerdlow *et al.*, 1993; Armario, 2010). Sin embargo, teniendo en cuenta el marcado incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺ que expresan CRH tras la administración de anfetamina (Rotllant *et al.*, 2007), resulta sorprendente que no se active la transcripción de CRH (Gómez-Román *et al.*, 2016). Esta disociación entre la activación de *c-fos* y la transcripción de CRH se ha demostrado en otros casos (Ginsberg *et al.*, 2003; Vallès *et al.*, 2003), sugiriendo que ambos procesos tienen mecanismos de acción diferenciados. Ya que la administración de anfetamina induce una menor expresión de *c-fos* en las neuronas individuales del PVN que la exposición a la natación forzada, es posible que se requiera de una activación más potente de cada neurona individual para desencadenar la transcripción de CRH. Sin embargo, no puede descartarse un posible efecto de la anfetamina sobre la eminencia media o la hipófisis.

En consonancia con nuestros datos, se ha demostrado que la administración aguda de anfetamina incrementa el número de neuronas que expresan *c-Fos* en el PVN (Engber *et al.*, 1998; Rotllant *et al.*, 2007; 2010). Sin embargo, existen ciertas discrepancias en cuanto a las poblaciones neuronales activadas tras dicha administración. La activación del 65% de la población CRH⁺ tras la administración de 4 mg/kg de anfetamina observada en el presente trabajo, contrasta con estudios previos de nuestro laboratorio en los que se observó un incremento en la expresión de *c-Fos* preferentemente en neuronas que no expresan CRH tras la administración aguda de 5 mg/kg de anfetamina (Rotllant *et al.*,

2007). Las diferencias entre nuestro trabajo y el de Rotllant y colaboradores (2007) podría residir en las técnicas empleadas para la detección tanto del CRH como de *c-fos*. Mientras que el presente trabajo ha abordado la detección de los correspondientes mRNAs mediante dFISH, en el caso de Rotllant y colaboradores (2007) se empleó la detección de las proteínas de ambos genes mediante inmunohistoquímica (IHQ). La sensibilidad de la dFISH podría ser mayor que la de la IHQ, pudiendo detectar niveles inferiores de mRNA de CRH como positivos, mientras que con la IHQ de CRH podríamos estar perdiendo alguna de las neuronas por no llegar al umbral de detección. La ausencia de transcripción de CRH podría provocar un vaciado del péptido de CRH preexistente en el soma neuronal que limitaría la detección del péptido de CRH por IHQ, pero no existe evidencia de una liberación somatodendrítica de CRH, aunque sí de otros péptidos como OXT y AVP (Engelmann *et al.*, 2004). A pesar de estas diferencias, parece evidente el papel activador de la amfetamina en el núcleo efector del eje HPA, provocando una respuesta típica de estrés, aunque de carácter farmacológico.

En el VTA observamos que la administración aguda de amfetamina no indujo la activación de *c-fos* en la población dopaminérgica (TH⁺), en tanto que sí lo hizo en la población que no expresa TH. Además, la administración de 4 mg/kg de amfetamina no es capaz de inducir la activación de *c-fos* en ninguna población neuronal del LC. En consonancia con estos resultados, hemos demostrado previamente que la administración de 5 mg/kg de amfetamina induce la expresión de *c-Fos* en el VTA, principalmente en la población que no expresa TH, sugiriendo que el fenotipo neuronal activado se correspondería, en gran medida, con neuronas GABAérgicas (Rotllant *et al.*, 2010). En este sentido, se ha demostrado que la administración crónica de amfetamina y cocaína provoca una acumulación de la isoforma Δ FosB en las neuronas GABAérgicas del VTA (Perotti *et al.*, 2005). El hecho de que no se activen ni la población neuronal dopaminérgica ni noradrenérgica del VTA y del LC, respectivamente, no es sorprendente dado que la administración de amfetamina provoca un aumento de la liberación de DA alrededor del soma de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Byrnes y Wallace, 1997), y de NA en las neuronas del LC (Sulzer *et al.*, 2005). Dicha liberación reduciría la activación

de estas neuronas a través de los autorreceptores situados en el soma (D2R para las neuronas dopaminérgicas y α -2 para las neuronas noradrenérgicas). De hecho, la administración de anfetamina inhibe la actividad electrofisiológica tanto de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Bernardini *et al.*, 1991; Mercuri *et al.*, 1992) como de las neuronas noradrenérgicas del LC (Holdefer y Jensen, 1987). Dosis mayores de anfetamina que las administradas en el presente trabajo podrían inducir la activación de *c-fos* en neuronas no noradrenérgicas del LC, aunque el efecto es modesto (Rotllant *et al.*, 2010).

Metilfenidato

La administración aguda de metilfenidato no indujo la expresión de *c-fos* en la PrL. Aunque estudios previos han demostrado que tras la administración de metilfenidato existe un incremento en la inducción de *c-fos* (Penner *et al.*, 2002; Chase *et al.*, 2005a; Allen *et al.*, 2010) y de otros IEG como *Arc* (Gronier *et al.*, 2010) en la mPFC, las dosis administradas fueron muy superiores a la empleada en el presente trabajo, oscilando entre 2 y 20 mg/kg. Datos previos de nuestro laboratorio, utilizando ISH radiactiva con estos mismos animales, sí muestran un aumento en los niveles de *c-fos* en la PrL, aunque no en la IL (Gagliano, 2015). Esta diferencia podría deberse a la sensibilidad de la técnica empleada, dado que la ISH radioactiva es mucho más sensible a los cambios en intensidad. Sin embargo, la dFISH nos permite valorar el número de neuronas activadas de un fenotipo en concreto, sacrificando en parte, la sensibilidad a los cambios de intensidad. Por lo tanto, el leve efecto de la administración de 0,5 mg/kg de metilfenidato sobre la activación de *c-fos* observado en Gagliano (2015), no queda reflejado en un incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺ en el presente trabajo.

Hasta la fecha, sólo conocemos de la existencia de un estudio que haya valorado la inducción de *c-fos* en las diferentes poblaciones neuronales de la mPFC. Zhang y colaboradores (2017) demostraron que tras la administración de 1 mg/kg de metilfenidato en ratas jóvenes existía un incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺ en la población de interneuronas que expresan parvalbúmina tanto en la PrL como la IL. No obstante, existen numerosas evidencias acerca de los efectos del metilfenidato sobre la actividad

electrofisiológica de las neuronas de la mPFC. Estudios *in vitro* demostraron un incremento en la excitabilidad de las neuronas piramidales corticales tras la administración de metilfenidato (Andrews y Lavin, 2008). Dicho incremento estaría mediado por los receptores α -2 adrenérgicos ya que la administración de yohimbina (antagonista de los receptores α -2 adrenérgicos) revierte este incremento en la excitabilidad. Estudios *in vivo* corroboran el aumento de la actividad electrofisiológica de las neuronas de la mPFC tras la administración de metilfenidato (1 y 3 mg/kg, vía intravenosa) en ratas adultas anestesiadas, siendo el efecto dependiente de la dosis (Gronier, 2011). Sin embargo, a diferencia de los estudios *in vitro*, el incremento inducido por el metilfenidato estaría mediado por los D1R, ya que se ha demostrado una reducción de la excitabilidad de dichas neuronas tras la administración de antagonistas de los D1R, no siendo así tras la administración de antagonistas de los receptores α -2 adrenérgicos (Gronier, 2011; Di Miceli y Gronier, 2015). La ausencia de inducción de *c-fos* observada en el presente trabajo tras la administración de metilfenidato, no implica necesariamente una ausencia de activación electrofisiológica, ya que como se ha comentado anteriormente estos dos procesos, en algunas circunstancias, pueden dissociarse (Luckman *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1995). Tomados en conjunto, parece que las dosis terapéuticas de metilfenidato ejercerían sus efectos incrementando la actividad de las neuronas piramidales.

En el **estriado dorsal**, la administración de 0,5 mg/kg de metilfenidato indujo la activación de *c-fos* en las subdivisiones CPuDM, CPuDL y CPuVM. Dicha activación se hizo evidente únicamente en la población presumiblemente D1R⁺. Apoyando nuestros datos, numerosos estudios han demostrado que la administración de metilfenidato promueve la inducción de *c-fos* en el CPu tanto en ratas juveniles como en adultas, siendo dicha activación neuronal dependiente de la dosis administrada (Brandon y Steiner, 2003; Hawken *et al.*, 2004; Yano y Steiner, 2005). Sin embargo, en los citados estudios la dosis más baja (0,5 mg/kg) no parecía activar el CPu y el efecto de la dosis emergía con la dosis intermedia de 2 mg/kg, siendo muy evidente con las dosis más altas (5 y 10 mg/kg). Una posible explicación de las discrepancias es que en estos estudios se valoró la activación del

mRNA de *c-fos* 1 hora después de la administración de metilfenidato, mientras que en el presente trabajo se ha valorado a los 30 minutos, cuando la expresión de *c-fos* suele alcanzar su nivel máximo (Imaki *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1994; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002; Marín-Blasco *et al.*, 2017). Otra posible explicación es que el estrés asociado a la manipulación del animal haya podido enmascarar, en los estudios precedentes, la modesta activación causada por la administración de dosis bajas de metilfenidato. Pese a estas diferencias en la inducción global de *c-fos*, nuestros datos coinciden con la literatura en que el metilfenidato ejerce sus efectos sobre la población neuronal D1R⁺ del CPu. Una prueba adicional de la activación funcional de estas neuronas es que, tras la administración de metilfenidato, tanto en ratas juveniles como adultas, se observa un incremento en los niveles del mRNA de la sustancia P, que se coexpresa en las neuronas D1R⁺ del CPu (Brandon y Steiner, 2003; Yano y Steiner, 2005), siendo dicho efecto más robusto en las subdivisiones dorsales del estriado medial/caudal en comparación con áreas más rostrales del estriado y subdivisiones ventrales (Yano y Steiner, 2005).

En el PVN la administración aguda de metilfenidato no fue capaz de inducir la activación de *c-fos*. Hasta la fecha, no existen estudios en la literatura respecto a la activación del eje HPA en respuesta a la administración aguda de metilfenidato en modelos animales, aunque en humanos sí que se ha descrito activación (Joyce *et al.*, 1986). Nuestros resultados apoyan datos previos de nuestro laboratorio en los que no se ha observado, tras la administración de dos dosis diferentes de metilfenidato (0,5 y 2 mg/kg), alteración alguna de los niveles del hnRNA del CRH o de los niveles de expresión de *c-fos* en dicha estructura, así como tampoco incrementos en los niveles circulantes de ACTH y corticosterona (Gagliano, 2015). Por lo tanto, en base a estas observaciones y a diferencia de lo que ocurre con la anfetamina, podemos afirmar que la administración de metilfenidato no tiene efecto sobre el PVN y el eje HPA, al menos a dosis cercanas a las terapéuticas en el tratamiento del ADHD.

En el VTA y en el LC la administración aguda de metilfenidato fue incapaz de inducir la activación de *c-fos* en la población neuronal TH⁺. Sin embargo, sí observamos un leve incremento en la inducción de *c-fos* que afectó a la población neuronal no dopaminérgica del VTA. Este hecho pone de manifiesto la importancia del uso de dobles marcajes ya que, en base a los resultados de activación global de *c-fos*, parecería que la administración de metilfenidato no tiene efecto sobre dicha estructura, cuando en realidad sí existe un leve efecto sobre la población no dopaminérgica. Por su parte, en el LC no se observó efecto alguno sobre las poblaciones neuronales analizadas.

Pocos estudios han evaluado la inducción de *c-fos* en respuesta a la administración de metilfenidato en las principales poblaciones neuronales del VTA y el LC. Los pocos estudios existentes se han centrado en la activación de la cola posterior del VTA, una zona rica en neuronas GABAérgicas cuya función consiste en regular las neuronas dopaminérgicas del VTA (Perotti *et al.*, 2005; Morales y Margolis, 2017). Se ha demostrado que tras la administración aguda de una dosis muy alta (10 mg/kg) existe un incremento en la expresión de FosB en las neuronas GABAérgicas de la cola posterior del VTA (Kaufling *et al.*, 2010). Además, dicha inducción parece seguir un patrón rostro-caudal, siendo mayor la activación en la zona más caudal del VTA. Existen estudios electrofisiológicos que demuestran el incremento, de manera dependiente de la dosis, en la actividad de las neuronas del VTA tras la administración de metilfenidato (0,6, 2,5 y 10 mg/kg), tanto en ratas adultas (Jones y Dafny, 2014) como en jóvenes (Karim *et al.*, 2017). Por lo tanto, no podemos descartar que tras la administración de 0,5 mg/kg de metilfenidato se pueda modificar la actividad electrofisiológica del VTA, pese a la ausencia de activación de *c-fos* observada en el presente trabajo.

Respecto al LC, no conocemos ningún trabajo que haya valorado directamente, mediante el uso de IEGs, la activación neuronal tras la administración de metilfenidato. Sin embargo, sí existen precedentes estudiando la activación electrofisiológica de las neuronas del LC, aunque con resultados controvertidos. Por ejemplo, diversos estudios observaron que la administración de dosis bajas de metilfenidato (0,25 – 1 mg/kg vía ip;

2 – 4 mg/kg, vía oral) disminuía moderadamente la actividad espontánea de las neuronas del LC en animales anestesiados (Devlbiss y Berridge, 2006), siendo dicha supresión mayor con dosis de 0,4 – 1,1 mg/kg vía iv (Olpe *et al.*, 1985; Lacroix y Ferron, 1988). No obstante, la administración aguda de 2,5 mg/kg (ip) de metilfenidato en animales no anestesiados incrementaba la frecuencia de disparo de las neuronas del LC (Tang y Dafny, 2012). Tomados en conjunto, parece que la dosis de metilfenidato administrada es crítica para determinar los efectos sobre la actividad neuronal del LC. Así, la ausencia de activación neuronal observada en el presente trabajo encajaría con la visión de que la administración de dosis terapéuticas de metilfenidato disminuye la actividad neuronal del LC, mientras que dosis altas podrían estimular dicha actividad.

No obstante, el hecho de que no se activen ni la población dopaminérgica del VTA ni la población noradrenérgica del LC en respuesta al metilfenidato es probablemente debido a la capacidad del metilfenidato para liberar monoaminas al espacio extracelular, consecuencia del bloqueo de DAT y NET, aumentando los niveles extracelulares de DA o NA y provocando la inhibición de las neuronas a través de los autorreceptores presinápticos. En este sentido, se ha demostrado que la administración de metilfenidato provoca un aumento de la concentración de DA y NA en el soma de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas del VTA y del LC, respectivamente (ver revisión en Wilens, 2008). Dicho incremento reduciría la activación de estas neuronas a través de autorreceptores situados en el soma (D2R para las dopaminérgicas y α -2 para las noradrenérgicas). De hecho, la administración de metilfenidato induce una hiperpolarización de las neuronas del LC en ratas (Ishimatsu *et al.*, 2002).

Interacción entre anfetamina y natación forzada

Tras la exposición simultánea a la anfetamina y a la natación forzada observamos la existencia de tres patrones de interacción diferentes: (i) un **efecto aditivo** en el CPuDL y el CPuDM; (ii) una **falta de efecto aditivo** que afectó al área IL y el PVN; y (iii) una **sinergia negativa** que afectó a áreas como la PrL, el CPuVM, el VTA y el LC.

Como se ha comentado previamente, en la mPFC existe inducción de *c-fos* tanto en respuesta a la administración de anfetamina como a la exposición a la natación forzada. Por lo tanto, no es de extrañar que en esta estructura puedan darse interacciones entre ambos estímulos. En la subdivisión IL se observó, tras la exposición simultánea a la anfetamina y a la natación forzada, una **falta de efecto aditivo** que afectó tanto a las neuronas VGlut1⁺ como a las GAD67⁺, obteniendo una inducción de *c-fos* similar a la obtenida con la administración de anfetamina y la exposición a la natación forzada por separado. En cambio, en la subdivisión PrL, la exposición simultánea a ambos estímulos dio lugar a una **sinergia negativa** que redujo la activación de *c-fos* inducida por la exposición a la natación forzada, disminuyendo la activación de la población neuronal VGlut1⁺ en un 10%, y de la GAD67⁺ en aproximadamente un 20%.

La presente tesis es el primer trabajo que ha abordado específicamente la interacción entre psicoestimulantes y estrés en poblaciones neuronales específicas de la mPFC ya que, hasta la fecha, no conocemos de otros estudios que hayan valorado esta cuestión. La exposición simultánea a ambos estímulos parece inducir diferentes patrones de activación en función del área del mPFC analizada, coincidiendo con datos previos de nuestro laboratorio donde se cuantificaron los niveles de expresión del mRNA de *c-fos* por ISH radiactiva (Gómez-Román, 2011). No obstante, otros investigadores han demostrado que la administración de 1,5 mg/kg de anfetamina en un ambiente nuevo (estímulo estresante de baja intensidad) induce un incremento en los niveles de expresión de *c-fos* en la mPFC en comparación con la administración de anfetamina y la exposición al ambiente nuevo por separado (Uslaner *et al.*, 2001a). Como se ha comentado previamente, la administración de dosis bajas de anfetamina induce una mayor expresión de *c-fos* en áreas como la PrL en comparación con la administración de dosis altas (Rotllant *et al.*, 2013). Por lo tanto, los patrones de activación inducidos por la interacción entre anfetamina y estrés podrían ser diferentes en función de la dosis de anfetamina administrada.

La sinergia negativa observada en la PrL y la falta de efecto aditivo en la IL podrían influir de manera diferente en las futuras consecuencias negativas del estrés. La PrL y la IL son áreas críticas en la regulación del eje HPA tras la exposición aguda a un estímulo estresante, siendo las neuronas de proyección de la PrL que proyectan al BNST y las neuronas de la IL que proyectan al hipotálamo posterior, claves para la inhibición y la estimulación del eje HPA, respectivamente (Radley *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2016). Se requieren futuros estudios que estudien de manera exhaustiva cómo afecta la exposición simultánea a la amfetamina y la natación forzada a la activación de las diferentes subpoblaciones neuronales de la mPFC (i.e. neuronas glutamatérgicas que coexpresan D1R y D2R o bien las diferentes subpoblaciones de neuronas GABAérgicas) y qué efectos podría tener sobre las consecuencias negativas del estrés.

En el **estriado dorsal**, la exposición simultánea a la amfetamina y a la natación forzada reveló resultados interesantes en función de la subdivisión analizada, de tal forma que las subdivisiones dorsales parecen comportarse diferente de las más ventrales. En las subdivisiones CPuDM y CPuDL observamos un efecto aditivo en el número de neuronas *c-fos*⁺, lo que sugeriría que ambos estímulos se procesan de manera independiente. Sin embargo, un análisis en profundidad de las poblaciones neuronales afectadas tras la exposición simultánea a ambos estímulos reveló una sinergia negativa en las neuronas D2R⁺ en CPuDM y CPuDL. Por el contrario, en la población D1R⁺ se evidenció un efecto sumatorio en CPuDM y una sinergia positiva en CPuDL, sugiriendo que, en esta última zona, la exposición a la natación forzada estaría potenciando los efectos de la amfetamina sobre la población neuronal D1R⁺. En la subdivisión CPuVM, tras la exposición simultánea a la amfetamina y a la natación forzada, observamos una sinergia negativa en la inducción de *c-fos* que afectó tanto a la población neuronal D2R⁺ como a la D1R⁺. El hecho de que cada subdivisión parezca comportarse de un modo distinto puede estar relacionado con las diferencias en las aferencias y eferencias de las diferentes subdivisiones del estriado (Voorn *et al.*, 2004). Nuestros datos, parecen encajar con la visión de que las diferencias funcionales del estriado estarían segregadas en función de la

región del estriado, habiéndose relacionado las regiones laterales con la corteza premotora y sensorial y las regiones mediales con estructuras como la mPFC.

Existe un número importante de estudios sobre la inducción de *c-fos* en el estriado dorsal tras la exposición simultánea a la anfetamina y a una situación de estrés como el ambiente nuevo (Badiani *et al.*, 1998, 1999; Day *et al.*, 2001; Uslaner *et al.*, 2001a; Ostrander *et al.*, 2003a). A diferencia de lo observado en nuestros datos, Badiani y colaboradores (1998; 1999) muestran que la administración aguda de 2 mg/kg de anfetamina en un ambiente nuevo induce la activación de *c-fos* tanto en la población neuronal D1R⁺ como D2R⁺, en tanto que la administración aguda de 2 mg/kg de anfetamina en un ambiente conocido (caja de estabulación) induce la expresión de *c-fos* únicamente en las neuronas D1R⁺. Además, Uslaner y colaboradores (2001a) demuestran que tras la administración aguda de 2 mg/kg de anfetamina en un ambiente nuevo se observa un aumento en la expresión de *c-fos* en todas las subdivisiones del CPU, mientras que nuestros datos no reportan tal aumento en la subdivisión ventral. Sin embargo, existen dos diferencias importantes entre estos estudios y el presente trabajo:

(a) Aunque tanto la natación forzada como el ambiente nuevo pueden considerarse estímulos estresantes emocionales, ambos difieren tanto en intensidad como en cualidad. La natación forzada es mucho más intensa que el ambiente nuevo, tanto por su capacidad para activar el PVN como el eje HPA (Ons *et al.*, 2004; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018). En cuanto a la cualidad, la natación forzada es un estímulo estresante en el que los animales deben desarrollar una actividad motora intensa de escape en la que estarían implicadas las áreas estriatales, mientras que el ambiente nuevo puede inducir la activación preferente de áreas más específicamente relacionadas con la exploración como por ejemplo la FH (Eichenbaum *et al.*, 1992; Ons *et al.*, 2004).

(b) La dosis de anfetamina administrada en el presente trabajo es de 4 mg/kg, en tanto que en el resto de estudios la dosis varía en un rango de entre 0,5 y 2 mg/kg. En este sentido, la administración de dosis bajas de anfetamina (1,5 mg/kg) provocan una mayor inducción de *c-fos* que dosis altas (5 mg/kg) en el CPU (Rotllant *et al.*, 2010). De algún

modo, nuestra dosis de anfetamina (4 mg/kg) podría estar introduciendo algún tipo de inhibición en estos núcleos que estaría afectando más a la población de neuronas sensibles al estrés (D2R).

En el núcleo efector del eje HPA, el PVN, observamos que tras la exposición simultánea a anfetamina y natación forzada se activaron el mismo número de neuronas CRH⁺ que con el estímulo más potente (natación forzada), revelando aparentemente una **falta de efecto aditivo**. Estudios previos de nuestro laboratorio ponen de manifiesto una sinergia negativa en los niveles de ACTH y una falta de efecto aditivo en los niveles de corticosterona tras la exposición simultánea a ambos estímulos, (Gómez-Román *et al.*, 2016; Gagliano *et al.*, 2017). Además, esta reducción en los niveles de ACTH vino acompañada de un bloqueo de la expresión de hnCRH en el PVN (Gómez-Román *et al.*, 2016). Por lo tanto, es sorprendente que una sinergia negativa tan evidente no se vea reflejada en el número de neuronas activadas. Puesto que es importante no sólo el número de neuronas activadas sino también el nivel de activación de éstas, estudiamos dicho nivel de activación. La exposición simultánea a la anfetamina y a la natación forzada activaba un número similar de neuronas de *c-fos* que la exposición a la natación forzada (estímulo más potente), pero la intensidad de activación de las neuronas individuales reflejaba un nivel de activación similar al inducido por la anfetamina (menor intensidad), indicando que la activación inducida específicamente por la natación forzada estaba realmente bloqueada (Gómez-Román *et al.*, 2016). Esta menor intensidad de activación se traduciría en una menor liberación de CRH al sistema portal hipofisario y, por consiguiente, una menor liberación de ACTH. Por otro lado, es posible que las neuronas de CRH del PVN necesiten una activación más robusta para desencadenar la transcripción del gen del CRH y de ahí la falta de respuesta observada tras la combinación de anfetamina y natación forzada.

Debido a que los estímulos aversivos/estresantes y los estímulos reforzantes/drogas interactúan a nivel conductual, es lógico pensar que existan interacciones a nivel de los circuitos neuronales implicados; en especial el sistema dopaminérgico

mesocorticolímbico y su principal núcleo de proyección: el VTA. No se conocen hasta la fecha estudios que hayan valorado la activación de las principales poblaciones neuronales de dicho núcleo en respuesta a la exposición simultánea a psicoestimulantes y estrés. En el VTA la exposición conjunta a anfetamina y natación forzada mostró una reducción en la activación de *c-fos* causada por la anfetamina. Esta sinergia negativa se reflejó únicamente en la población que no expresa TH, que fue, en realidad, la única población neuronal activada por la administración de anfetamina. Es muy posible que muchas de éstas sean GABAérgicas, como hemos demostrado previamente (Rotllant *et al.*, 2010). No obstante, estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto una falta de efecto aditivo cuando los animales se exponen de manera simultánea a la anfetamina (5 mg/kg) y a la inmovilización en plancha (Rotllant, 2008). Estas diferencias tras la exposición simultánea entre dicho estudio y el presente trabajo podrían deberse a aspectos como la dosis de anfetamina administrada o el tipo de estímulo estresante aplicado. En el VTA no existen diferencias respecto a la inducción de *c-fos* entre la administración de dosis bajas (1,5 mg/kg) y altas (5 mg/kg) de anfetamina (Rotllant *et al.*, 2013), sugiriendo que el estímulo estresante podría ser la razón de las diferencias, pero se pueden sacar pocas conclusiones debido a la ausencia de efecto de la natación forzada.

En el LC, tras la exposición simultánea a la anfetamina y la natación forzada observamos una fuerte sinergia negativa que afectó exclusivamente a la población TH⁺ (noradrenérgica). Hasta la fecha, no conocemos ningún estudio que aborde la activación de las poblaciones neuronales en el LC en respuesta a anfetamina y natación forzada, pero sí existe algún precedente con otros psicoestimulantes como la cocaína. Apoyando nuestros datos, la exposición simultánea a la cocaína y a una situación estresante como la derrota social induce una disminución en la expresión de *c-fos* en núcleos del tronco encefálico como PAG, DR y LC, aunque no en VTA (Nikulina *et al.*, 1998). Además, estudios previos de nuestro laboratorio han observado en el LC una sinergia negativa en la inducción de *c-fos* tras la exposición a la anfetamina y la inmovilización en plancha (Rotllant, 2008). Está bien establecido que la administración de anfetamina es capaz de inhibir la activación electrofisiológica de las neuronas del LC (Holdefer y Jensen, 1987),

probablemente por una gran liberación somatodendrítica de NA en el LC (Sulzer *et al.*, 2005). Aunque no existen pruebas directas al respecto con la anfetamina, la administración sistémica de cocaína sí incrementa los niveles de NA en el LC (Thomas *et al.*, 1994). Por lo tanto, esta sinergia negativa en la inducción de *c-fos* en la población noradrenérgica podría estar relacionada con la inhibición a través de los autorreceptores α -2 adrenérgicos situados en el soma de las neuronas que responden a la situación estresante.

Interacción entre metilfenidato y natación forzada

La exposición simultánea a metilfenidato y natación forzada no dio lugar a ninguna interacción en la PrL. Como ya se ha discutido, en esta estructura ninguna población neuronal estudiada mostró inducción de *c-fos* en respuesta a la administración de metilfenidato, pero la exposición a la natación forzada sí produjo una robusta activación de *c-fos* tanto en la población neuronal glutamatérgica como GABAérgica. Tras la exposición simultánea a ambos estímulos, la inducción de *c-fos* causada por la natación forzada no se vio afectada en ninguna de las dos poblaciones neuronales. Nuestros resultados se ven respaldados por datos obtenidos en nuestro laboratorio, utilizando la detección del mRNA de *c-fos* por ISH radiactiva, que demuestran el mismo patrón de activación tras la exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada (Gagliano, 2015). Es posible que la dosis de metilfenidato administrada en el presente trabajo (0,5 mg/kg) no sea capaz de inducir la activación de *c-fos*. Sin embargo, no podemos descartar interacción entre el metilfenidato y la natación forzada en la activación electrofisiológica de la mPFC.

En el **estriado dorsal**, la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada provocó un efecto aproximadamente aditivo en cuanto al número total de neuronas *c-fos*⁺ en las subdivisiones CPuDL, CPuDM y CPuVM. Sin embargo, un análisis más detallado de la activación de las poblaciones neuronales D1R⁺ y D2R⁺ mostró diferencias entre las subdivisiones dorsales y ventrales. En las subdivisiones dorsales (CPuDM y CPuDL), el efecto aditivo observado en el número total de neuronas *c-fos*⁺ afectó

únicamente a la población neuronal presumiblemente D1R⁺, mientras que en la población neuronal D2R⁺ únicamente se observó efecto de la natación forzada. En cambio, en la subdivisión CPuVM, el efecto aditivo observado en el número total de neuronas *c-fos*⁺ parece el resultado de un efecto independiente de cada uno de los estímulos: la administración de metilfenidato afectaría a la población neuronal presumiblemente D1R⁺, mientras que la exposición a la natación forzada afectaría a la población neuronal D2R⁺.

Existen, por lo tanto, importantes diferencias entre el metilfenidato y la anfetamina respecto a la interacción con el estrés en el estriado dorsal. La exposición simultánea al metilfenidato y la natación forzada provoca un efecto aproximadamente aditivo en el número total de neuronas *c-fos*⁺ en las tres subdivisiones estudiadas, mientras que la exposición a la anfetamina y la natación forzada induce un efecto aditivo en las subdivisiones dorsales (CPuDM y CPuDL) y una sinergia negativa en el CPuVM. Además, la exposición al metilfenidato y la natación forzada no tiene efecto alguno sobre la población neuronal D2R⁺ activada por la natación forzada, mientras que la exposición a la anfetamina y la natación forzada revela una sinergia negativa en dicha población en las tres subdivisiones estudiadas. Por último, la exposición al metilfenidato y la natación forzada revela un efecto aditivo en la población neuronal D1R⁺ en las subdivisiones dorsales y una ausencia de interacción en el CPuVM, mientras que la exposición a la anfetamina y la natación forzada induce un efecto aditivo en CPuDM, una sinergia positiva en CPuDL y una sinergia negativa en CPuVM. Estas diferencias entre ambos fármacos podrían explicarse por el diferente mecanismo de acción, aunque serían necesarios estudios con diferentes dosis de ambos psicoestimulantes para descartar un efecto de la dosis. Se ha de tener en cuenta que los animales fueron administrados con una dosis moderada/alta de anfetamina (4 mg/kg), en tanto que se administraron dosis más bajas de metilfenidato (0,5 mg/kg) que se encuentran claramente dentro del rango terapéutico en el tratamiento del ADHD.

En las subdivisiones dorsales del CPu parece que, tanto el metilfenidato como la natación forzada estarían actuando sobre el mismo fenotipo neuronal (presumiblemente D1R⁺), sugiriendo que cada uno de ellos activa una población diferente de neuronas D1R⁺ dando lugar a un efecto aditivo. Sin embargo, en el CPuVM, ambos estímulos darían lugar a un efecto aditivo en el número total de neuronas *c-fos*⁺ ya que el metilfenidato y la natación forzada estarían actuando sobre diferentes fenotipos neuronales (D1R⁺ y D2R⁺, respectivamente). Por lo tanto, parece que las subdivisiones dorsales sensorimotoras del estriado estarían más afectadas que las regiones ventrales, en función de sus diferentes conexiones con otras áreas (Voorn *et al.*, 2004).

Mención especial requiere el PVN. En esta estructura no se observó ninguna interacción entre la administración aguda de metilfenidato y la activación neuronal causada por la natación forzada. Estos resultados contrastan con datos previos de nuestro laboratorio que muestran una importante reducción de los niveles circulantes de ACTH y un bloqueo de la expresión del gen del CRH en el PVN (evaluado por el hnRNA del CRH) cuando ambos estímulos se presentan de manera simultánea (Gagliano, 2015). La disociación entre la expresión de *c-fos* y la actividad del gen del CRH ha sido descrita en otras situaciones (Ginsberg *et al.*, 2003; Vallés *et al.*, 2003), reflejando el hecho de que son dos procesos relacionados, pero diferenciados desde el punto de vista de los mecanismos intracelulares implicados. Por lo tanto, en este caso concreto, cabe la posibilidad de que la inducción de *c-fos* requiera un menor grado de activación (o una activación menos sostenida) que la transcripción del CRH.

En VTA no observamos ninguna interacción en cuanto al número total de neuronas *c-fos*⁺ tras la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada. No obstante, se observó un **efecto aditivo** en la población que no expresa TH, hecho que indicaría que ambos estímulos afectan a poblaciones neuronales no dopaminérgicas independientes. Se precisarían de más estudios de doble marcaje con el fin de poder identificar las posibles subpoblaciones implicadas en el procesamiento de cada estímulo.

Por último, en el LC la exposición simultánea al metilfenidato y a la natación forzada mostró una potente **sinergia negativa** que afectó, exclusivamente, a la población neuronal noradrenérgica. Hasta la fecha, no conocemos ningún trabajo que haya explorado la activación del LC en respuesta a la exposición simultánea a metilfenidato y estímulos estresantes. Por lo tanto, podemos especular que en el LC la administración de metilfenidato podría reducir la activación de las neuronas noradrenérgicas causada por la exposición a la natación forzada a través de la activación de los autorreceptores somatodendríticos, una explicación similar a lo que ocurre con la administración de anfetamina.

Interacción entre estímulos estresantes emocionales

Una vez demostrada la existencia de interacción entre drogas psicoestimulantes y estímulos estresantes predominantemente emocionales, hemos querido abordar si dicha interacción también se pone de manifiesto cuando dos estímulos estresantes emocionales se presentan de forma simultánea. Para ello, se han comparado los efectos de la exposición por separado y conjunta al olor a gato y a la inmovilización en plancha. En este estudio, nos hemos centrado en explorar la activación de las diferentes poblaciones neuronales de la mPFC y la valoración de la activación del PVN mediante la expresión de *c-fos* y de la activación del gen del CRH. Los resultados muestran una sinergia negativa en la mPFC, además de una ausencia de efecto aditivo en el PVN cuando ambos estímulos se presentan de manera simultánea.

Olor al depredador e inmovilización en plancha

En la corteza PrL, la exposición al ambiente nuevo, al olor del depredador y a la inmovilización en plancha indujo un incremento en el número total de neuronas *c-fos*⁺ y en los niveles globales de expresión de *c-fos*, siendo mayor dicho incremento por la exposición al olor del depredador en comparación con el ambiente nuevo o la inmovilización en plancha, que no difieren entre sí. No obstante, el análisis de los niveles de expresión de *c-fos* por neurona individual mostró que el ambiente nuevo fue el

estímulo que causó menor nivel de expresión, en tanto que la exposición al olor del depredador y a la inmovilización en plancha indujeron niveles similares. La exposición al olor del depredador provocó una activación de alrededor del 60% del total de las poblaciones neuronales VGlut1⁺ y GAD67⁺, mientras que el ambiente nuevo y la inmovilización en plancha indujeron la activación de aproximadamente un 30% del total de la población VGlut1⁺, y un porcentaje similar de la población GAD67⁺ (ambiente nuevo ≈ 30% e inmovilización en plancha ≈ 40%).

En consonancia con nuestros datos, numerosos estudios han evidenciado que tanto la exposición a un ambiente nuevo (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018), como al olor del depredador (McGregor *et al.*, 2004; Baisley *et al.*, 2011; Adamec *et al.*, 2012) o a la inmovilización en plancha (Ons *et al.*, 2010; Rotllant, 2013; Marín-Blasco *et al.*, 2017) activan de manera pronunciada la expresión de c-fos en la PrL, valorada mediante su mRNA o su proteína. Además, se ha demostrado en ratas expuestas directamente al gato un incremento en los niveles de la proteína c-Fos en neuronas piramidales glutamatérgicas de la PrL (Adamec *et al.*, 2012). No obstante, otros estudios no muestran una activación específica de la PrL al olor de un depredador (Dielenberg *et al.*, 2001). En este último trabajo, los animales tenían la oportunidad de escapar de la situación estresante, escondiéndose en un habitáculo pequeño. Se ha sugerido que la PrL no se activaría en situaciones escapables, mientras que sí lo haría en situaciones inescapables (McGregor *et al.*, 2004). Sin embargo, una explicación alternativa es que el grupo control también estaba expuesto a un ambiente nuevo, hecho que de por sí ya causa una marcada activación de la PrL.

Puesto que la activación de c-fos en la PrL no parece ser sensible a la intensidad del estímulo estresante (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018), la activación de dicha estructura podría ser debida no tanto a la intensidad, sino a la cualidad del estímulo estresante. Este hecho no es sorprendente dada la importancia del olor del depredador en el comportamiento de los roedores. A diferencia de la inmovilización en plancha, una cualidad muy importante del olor del depredador es la

capacidad para inducir condicionamiento del miedo, que se caracteriza por asociar un estímulo neutro (condicionado) a un estímulo aversivo (incondicionado), produciendo respuestas de miedo ante la mera exposición al estímulo neutro (Muñoz-Abellán *et al.*, 2009; Daviu *et al.*, 2012). Por lo tanto, esta mayor activación de *c-fos* en la PrL a causa de la exposición al olor del depredador en comparación con la inmovilización en plancha, podría jugar un papel en el establecimiento del condicionamiento. Apoyando esta afirmación, se ha demostrado que la exposición a choques eléctricos en las patas (estímulo típico para inducir condicionamiento del miedo), causa una activación de *c-Fos* similar a la exposición al olor del depredador (Baisley *et al.*, 2011).

Existen diferencias interesantes si comparamos la activación de las capas superficiales con las profundas tras la exposición a los estímulos estresantes por separado. En las **capas superficiales** (II-III), la exposición al ambiente nuevo y a la inmovilización en plancha activó un número similar de neuronas *c-fos*⁺, mientras que la exposición al olor del depredador fue el estímulo que mayor activación causó. Este patrón afectó tanto a la activación de las neuronas *GAD67*⁺ como de las *GAD67*⁻ (presumiblemente glutamatérgicas). Por el contrario, en las **capas profundas** (V-VI) la exposición al olor del depredador y la inmovilización en plancha por separado activaron un número similar de neuronas *GAD67*⁻, mientras que la activación de neuronas *GAD67*⁺ fue mayor con la exposición al olor del depredador en comparación con la inmovilización en plancha.

Las neuronas de las capas superficiales de la mPFC (capas II/III) establecen interacciones cortico-corticales mientras que las capas profundas (capas V/VI) proyectan a áreas subcorticales, incluyendo la amígdala (ver revisión en Giustino y Maren, 2015). Uno de los principales circuitos implicados en el condicionamiento y la extinción del miedo es el formado por la mPFC-amígdala. Por lo tanto, es posible que la capacidad del olor del depredador para establecer procesos de condicionamiento del miedo (Muñoz-Abellán *et al.*, 2009; Daviu *et al.*, 2012) induzca una mayor actividad de las capas superficiales (capas II/III) de la PrL como consecuencia de las proyecciones que le llegan desde la BLA. La mayor activación de la población GABAérgica en las capas profundas tras la exposición

al olor del depredador en comparación con la inmovilización en plancha y el ambiente nuevo podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre las neuronas corticales que proyectan tanto a la amígdala como a la FH.

En el PVN, nuestros datos mostraron que la exposición al ambiente nuevo, al olor del depredador y a la inmovilización en plancha indujeron un incremento en el número de neuronas *c-fos*⁺, siendo mayor la activación causada por la inmovilización en plancha. El mismo patrón de resultados se observó en la activación de la transcripción del gen de CRH (valorada por su hnRNA). Además, el análisis de la distribución de intensidad por neurona mostró que tanto el ambiente nuevo como el olor del depredador reclutaron un mayor número de neuronas en los rangos de baja intensidad, mientras que la inmovilización en plancha las reclutó en los rangos de mayor intensidad. Está ampliamente demostrada la existencia de inducción tanto del mRNA como de la proteína de *c-fos* en el PVN tras la exposición a estímulos estresantes que abarcan un amplio rango de intensidades como un ambiente nuevo (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018) el olor del depredador (Vanderhaven *et al.*, 2015; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018), la inmovilización en plancha (Ons *et al.*, 2004; Rotllant *et al.*, 2013; Marín-Blasco *et al.*, 2017; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018), y el 2,5-dihidro-2,4,5-trimethylthiazolina (TMT, Janitzky *et al.*, 2015), un compuesto sintético derivado de las heces de zorro capaz de inducir conductas de miedo innatas, muy utilizado por su alta reproducibilidad entre ensayos (Day *et al.*, 2004). En consonancia con nuestros datos, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inmovilización en plancha es capaz de inducir mayor activación neuronal (*c-fos*) así como un mayor incremento de la actividad del gen del CRH que la inducida por el olor del depredador (Armario, 2012; Úbeda-Contreras *et al.*, 2018). Pese a que estos estímulos estresantes difieren en aspectos cualitativos, está demostrado que difieren en cuanto a intensidad, evaluada por diferentes marcadores de la intensidad del estrés como, por ejemplo, la activación del eje HPA (Muñoz-Abellán *et al.*, 2008; 2011). Esto confirma que el PVN es un núcleo sensible a la intensidad del estímulo estresante, como ha sido ampliamente demostrado en muchos

laboratorios (Campeau y Watson, 1997; Ons *et al.*, 2004; Pace *et al.*, 2005; Rotllant *et al.*, 2013; Marín-Blasco *et al.*, 2017).

Interacción entre el olor al depredador y la inmovilización en plancha

En las **capas superficiales** de la PrL, la exposición simultánea al olor del depredador y a la inmovilización en plancha mostró una **sinergia negativa** de tal manera que la activación de *c-fos* causada por la exposición exclusiva al olor del depredador, se redujo por la exposición conjunta a la inmovilización en plancha, afectando dicha sinergia tanto a la población glutamatérgica como a la GABAérgica. Por su parte, en las **capas profundas** de la PrL se observó una **falta de efecto aditivo** en el número total de neuronas *c-fos*⁺ tras la exposición conjunta a ambos estímulos que afectó de manera diferente a ambas poblaciones neuronales: mientras que en la **población neuronal glutamatérgica** se observó una **falta de efecto aditivo**, la población neuronal **GABAérgica** mostró una **sinergia negativa**. Hasta la fecha, no conocemos de ningún estudio que haya valorado la activación del SNC cuando dos estímulos estresantes emocionales se presentan de manera simultánea, aunque sí que existe un precedente valorando las consecuencias fisiológicas y conductuales de dicha exposición. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la exposición conjunta al olor del depredador y la inmovilización en plancha provoca en las ratas condicionamiento del miedo al contexto medido 8 días después de la exposición conjunta (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011). Así, parece que la inmovilización en plancha, que no condiciona *per se*, no es capaz de interferir en el condicionamiento del miedo causado por la exposición al olor del depredador. Por lo tanto, la sinergia negativa observada en la PrL en el presente trabajo no parece afectar en la capacidad del olor del depredador para inducir condicionamiento del miedo. Se requieren futuros estudios para acabar de dilucidar el significado biológico de la sinergia negativa observada en respuesta a la exposición conjunta al olor del depredador y la inmovilización en plancha.

De manera sorprendente, la exposición conjunta a ambos estímulos induce una activación neuronal, una distribución de intensidad por neurona y un incremento en la

actividad del gen del CRH similar a la causada por la inmovilización en plancha, no observándose ninguna sinergia o efecto aditivo. Estos datos coinciden con lo descrito en estudios previos de nuestro laboratorio donde se observa un patrón de liberación de ACTH similar tras la exposición simultánea a ambos estímulos (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011). Es muy probable que la inmovilización en plancha esté causando un “efecto techo” produciendo una activación máxima tanto del PVN como de la liberación de ACTH por parte de la hipófisis, razón por la cual no se observa activación adicional al incorporar el olor del depredador. Sin embargo, tampoco se han observado diferencias significativas en los niveles de ACTH durante el periodo de recuperación posterior al estrés donde los niveles de ACTH son submáximos (Muñoz-Abellán *et al.*, 2011). Por lo tanto, no queda claro si en el PVN podría existir un enmascaramiento de la inmovilización en plancha (estímulo más potente) sobre el olor del depredador (estímulo menos potente). Una solución interesante a explorar sería exponer a los animales de manera simultánea al olor del depredador y a un estímulo estresante emocional de menor intensidad que la inmovilización en plancha (v.g. *restraint*, choques eléctricos en las patas) con el objetivo de desenmascarar una posible interacción entre estímulos estresantes en los distintos niveles del eje HPA.

Trabajos previos de otros investigadores de nuestro laboratorio mostraron una ausencia de interacción a nivel conductual entre el olor del depredador y la inmovilización en plancha, hecho que podría sugerir que ambos estímulos no interactúan entre sí (Muñoz-Abellán, 2011). Pese a que en la presente tesis nos hemos centrado en dos áreas críticas en la respuesta del estrés como la PrL y el PVN, resulta de interés comentar resultados previos de nuestro laboratorio en estos mismos animales, en los que se valoró la activación de *c-fos* en áreas relacionadas con el procesamiento de las señales olfativas y de las conductas defensivas, críticas para el procesamiento del olor del depredador (Ver Figura 47).

Está bien establecido que los roedores son muy sensibles a señales olfativas y que la exposición al olor de los depredadores desencadena conductas defensivas muy robustas

(Blanchard *et al.*, 1990; Dielenberg *et al.*, 1999; Dielenberg y McGregor, 1999). Estas señales olfativas son procesadas como cariomonas, siendo crítico en este procesamiento el órgano vomeronasal y el bulbo olfatorio accesorio (AOB) (Blanchard y Blanchard, 1999). En la Figura 47 podemos observar que, tras la exposición al ambiente nuevo y al olor del depredador, la inducción de *c-fos* en la subdivisión ventral del AOB (AOV) es mucho mayor que la producida por la exposición a la inmovilización en plancha. La exposición conjunta al olor del depredador y la inmovilización en plancha provoca una clara sinergia negativa en dicha estructura, sugiriendo que la inmovilización en plancha interfiere con el procesamiento de la señal olfativa.

Los núcleos mediales del hipotálamo son críticos para la conducta defensiva de los animales (ver revisión en Dielenberg, 2001a, Dielenberg *et al.*, 2001b). Tanto en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) como en la subdivisión dorsal del núcleo premamilar (PMD) existe inducción de *c-fos* tras la exposición al olor del depredador, pero no en respuesta a la inmovilización en plancha (Ver Figura 47). Estos datos están en consonancia con estudios previos que demuestran que el patrón de activación producido por la exposición al olor del depredador difiere del de otros estímulos estresantes como los choques eléctricos (Pezzone *et al.*, 1993), el *restraint* (Chen y Herbert, 1995), la natación forzada (Cullinan *et al.*, 1995) y la inmovilización en plancha (Muñoz-Abellán, 2011)). Cuando ambos estímulos se presentan de manera conjunta ambas estructuras parecen responder de manera muy diferente: mientras que en el VMH no se observa interacción alguna, observándose únicamente la activación causada por el olor del depredador; en el PMD se observa una sinergia negativa de tal manera que la inmovilización en plancha reduce la activación causada por el olor del depredador. Estos datos son los primeros en poner de manifiesto que cuando estímulos estresantes emocionales como el olor del depredador y la inmovilización en plancha se presentan conjuntamente, existe una interacción a nivel del SNC que provoca una disminución en la inducción de *c-fos* en estructuras críticas para el procesamiento olfativo y las conductas defensivas. Las implicaciones funcionales y conductuales de esta interacción están por explorar.

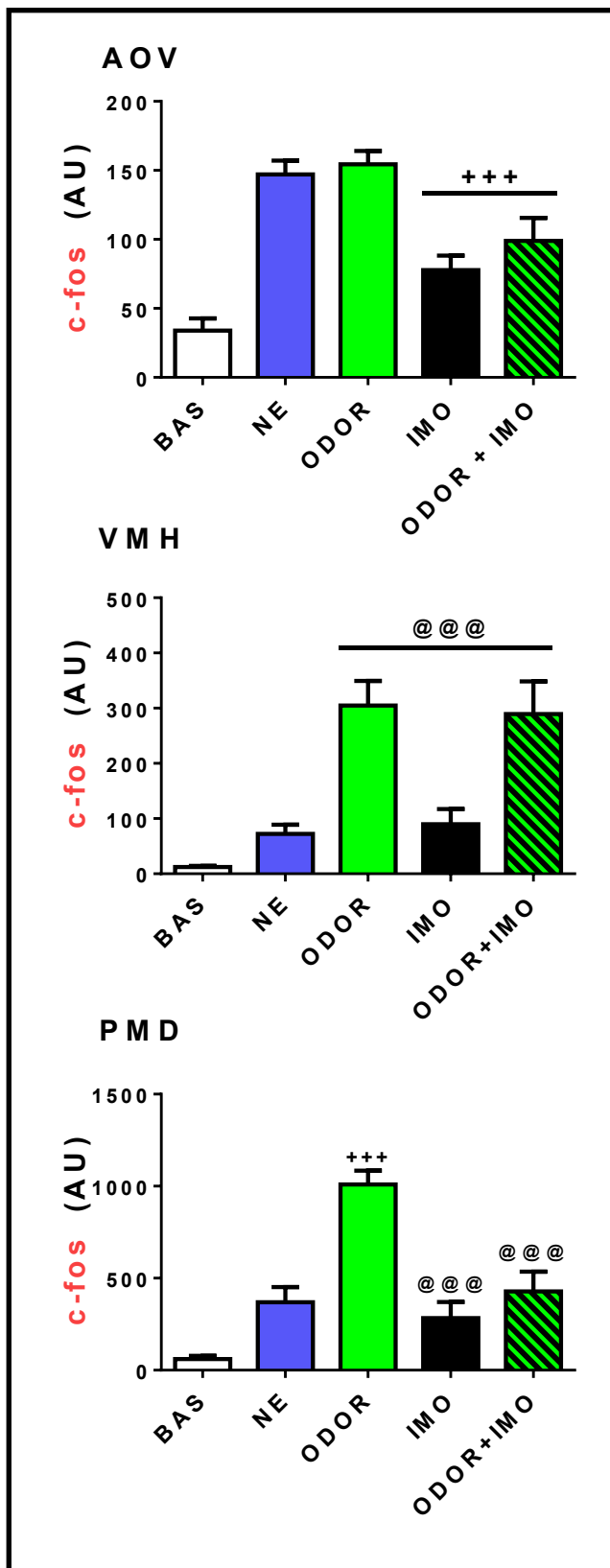


Figura 47. Expresión de *c-fos* en tras la exposición simultánea al olor del depredador y la inmovilización en plancha (Adaptado de Muñoz-Abellán, 2011). AOV: bulbo olfatorio accesorio ventral; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; PMD: subdivisión dorsal del núcleo premamilar. BAS (n = 8) representa el grupo perfundido directamente sin ninguna manipulación previa; AN (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; OLOR (n = 10) representa el grupo expuesto al ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato; IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo inodoro; y OLOR-IMO (n = 10) representa el grupo inmovilizado en el ambiente nuevo en presencia de un trazo con olor a gato. Los valores representan la media y el error estándar de la densidad integrada de *c-fos*. +++ p < 0.001 vs AN o efecto del factor IMO. @@@ p < 0.001 vs OLOR o efecto del factor OLOR.

Conclusiones

Conclusiones

- 1) La exposición a 30 minutos de natación forzada causa un patrón de activación generalizado del SNC que se asemeja al de otros estímulos estresantes emocionales. Nuestros resultados indican activación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de mPFC, neuronas D2R⁺ del estriado (vía indirecta); neuronas CRH⁺ del PVN y neuronas tanto TH⁺ como TH⁻ de VTA y LC (dopaminérgicas y noradrenérgicas, respectivamente).
- 2) La administración de un estímulo estresante farmacológico como la anfetamina (4 mg/kg) causa activación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de la mPFC; neuronas D1R⁺ (vía directa) de las subdivisiones dorsales del estriado y D1R⁺ y D2R⁺ de la subdivisión ventral del estriado; neuronas CRH⁺ del PVN; y neuronas TH⁻ del VTA y LC. El patrón de activación tras la administración de anfetamina coincide en algunas áreas con el de la natación forzada.
- 3) La administración de dosis terapéuticas (0,5 mg/kg) de metilfenidato, un psicoestimulante ampliamente utilizado en el tratamiento del *ADHD*, causa muy poca activación del SNC, poniéndose únicamente de manifiesto una activación de neuronas D1R⁺ y D2R⁺ en todas las subdivisiones del estriado y de las neuronas TH⁻ del VTA.
- 4) La administración de anfetamina seguida inmediatamente de la exposición a natación forzada da lugar a varios patrones distintos de activación respecto a la exposición individual a cada uno de los estímulos: (a) una ausencia de efecto aditivo (v.g. poblaciones glutamatérgica y GABAérgica de la subdivisión infralímbica de la mPFC o neuronas CRH⁺ del PVN); (b) un efecto aditivo en la población D1R⁺ del estriado dorsomedial; (c) una sinergia positiva en la población D1R⁺ del estriado dorsolateral; y (d) una sinergia negativa en diversas poblaciones neuronales (neuronas glutamatérgica y GABAérgica de la subdivisión prelímbica de la mPFC, D1R⁺ de la subdivisión ventromedial del estriado, D2R⁺ en todas las subdivisiones del estriado, población TH⁻ de VTA y población noradrenérgica del LC. Por lo tanto, se producen interacciones, a nivel de la activación del SNC, entre anfetamina y natación forzada.

5) La administración de metilfenidato seguida inmediatamente de la exposición a natación forzada da lugar a varios patrones distintos de activación respecto a la exposición individual a cada uno de los estímulos: (a) efecto aditivo sobre la población D1R⁺ de las subdivisiones dorsales del estriado y sobre las neuronas TH del VTA; (b) ausencia de efecto aditivo (neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de la subdivisión prelímbica de la mPFC; neuronas D2R⁺ en todas las subdivisiones del estriado, neuronas CRH⁺ del PVN, y neuronas dopaminérgica del VTA); y (c) sinergia negativa que afecta únicamente a la población noradrenérgica del LC. Nuestros resultados afirman que existe interacción entre el metilfenidato y la natación forzada cuando éstos se presentan de manera simultánea, aunque el grado de interacción es considerablemente menor que con la anfetamina.

6) La exposición separada a estímulos estresantes de naturaleza predominantemente emocional como el ambiente nuevo, el olor del depredador y la inmovilización en plancha, causa activación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de la subdivisión prelímbica de la mPFC. El número de neuronas activadas es mayor con el olor del depredador que con los otros dos estímulos, pero la activación de *c-fos* en cada neurona individual es superior tras la exposición al olor del depredador e inmovilización que con el ambiente nuevo. Estos datos sugieren las limitaciones de cuantificar solo el número de neuronas activadas.

7) La exposición al olor del depredador y a la inmovilización en plancha por separado inducen activación del PVN en términos de inducción de *c-fos* y de incremento en la transcripción del gen del CRH, siendo mayor el efecto de la inmovilización en plancha en comparación con el ambiente nuevo o el olor del depredador. La exposición a la inmovilización en plancha recluta un mayor número de neuronas y éstas muestran un nivel más elevado de inducción de *c-fos* que las reclutadas por la exposición al olor del depredador. Se confirma que la activación de neuronas del PVN es proporcional a la intensidad de los estímulos estresantes.

8) La exposición conjunta al olor del depredador y a la inmovilización en plancha redujo la activación de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas de la subdivisión prelímbica de la mPFC causada por la exposición al olor del depredador, reflejando una sinergia negativa en cuanto al número de neuronas activadas. No obstante, la exposición conjunta al olor del depredador y a la inmovilización en plancha no modifica los niveles de expresión de *c-fos* por neurona individual.

9) En el PVN, la exposición conjunta no mostró efecto aditivo en ninguno de todos los parámetros estudiados, aunque este hecho podría deberse a una saturación de la respuesta del PVN a un estímulo de gran intensidad como la inmovilización en plancha.

10) Los datos aquí presentados demuestran claramente la existencia de interacción en la activación del SNC causada por psicoestimulantes y un estrés predominantemente emocional. Aunque los datos obtenidos son restringidos, esta interacción también parece evidente cuando se combinan estímulos emocionales, lo que es de gran relevancia potencial en el estudio de patologías asociadas al estrés.

Bibliografía

Bibliografía

Adamec R, Toth M, Haller J, Halasz J, Blundell J (2012). *A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress*. *Physiol Behav* **105**: 628-638.

Aguilera G, Liu Y (2012). *The molecular physiology of crh neurons*. *Front Neuroendocrinol* **33**: 67-84.

Alescio-Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B (2000). *Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin*. *Eur J Pharmacol* **405**: 63-72.

Allen JK, Wilkinson M, Soo EC, Hui JP, Chase TD, Carrey N (2010). *Chronic low dose adderall xr down-regulates cfos expression in infantile and prepubertal rat striatum and cortex*. *Neuroscience* **169**: 1901-1912.

Andrews GD, Lavin A (2006). *Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors*. *Neuropsychopharmacology* **31**: 594-601.

Andrzejewski ME, Spencer RC, Harris RL, Feit EC, McKee BL, Berridge CW (2014). *The effects of clinically relevant doses of amphetamine and methylphenidate on signal detection and drl in rats*. *Neuropharmacology* **79**: 634-641.

Antelman SM, Caggiula AR, Knopf S, Kocan DJ, Edwards DJ (1992). *Amphetamine or haloperidol 2 weeks earlier antagonized the plasma corticosterone response to amphetamine; evidence for the stressful/foreign nature of drugs*. *Psychopharmacology* **107**: 331-336.

Anthony TE, Dee N, Bernard A, Lerchner W, Heintz N, Anderson DJ (2014). *Control of stress-induced persistent anxiety by an extra-amygdala septohypothalamic circuit*. *Cell* **156**: 522-536.

Antoni FA (1986). *Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor*. *Endocr Rev* **7**: 351-378.

Armario A (1998). *Estrés: Concepto y respuesta fisiológica.*, in: Tresguerres J. (Ed.), *Tratado de endocrinología básica y clínica*. Síntesis, Madrid, pp. 2176-2205.

Armario A (2000). *Neurobiología del estrés: Una perspectiva desde el eje hipotálamo-pituitario-adrenal.*, in: C. S. J.C. (Ed.), *Estrés: Consecuencias psicológicas, fisiológicas y clínicas*. Sanz Torres, pp. 47-79.

Armario A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Ons S (2004). *Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Neurobiologic mechanisms*. *Ann N Y Acad Sci* **1018**: 162-172.

- Armario A (2006a). *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: What can it tell us about stressors?* CNS Neurol Disord Drug Targets 5: 485-501.
- Armario A (2006b). *The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressors.*, in: Pinaud R., Tremere L. (Eds.), Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders. Springer Science.
- Armario A (2010). *Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: Different pathways, common outcome.* Trends Pharmacol Sci 31: 318-325.
- Armario A, Daviu N, Munoz-Abellan C, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R (2012). *What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors?* Cell Mol Neurobiol 32: 749-758.
- Armstrong W (2004). *Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei*, in: Paxinos G. (Ed.), The rat nervous system (3ed). Academic Press, Sidney, pp. 377-403.
- Arnsten AF, Dudley AG (2005). *Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine d1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in attention deficit hyperactivity disorder.* Behav Brain Funct 1: 2.
- Azzi M, Betancur C, Sillaber I, Spanagel R, Rostene W, Berod A (1998). *Repeated administration of the neurotensin receptor antagonist sr 48692 differentially regulates mesocortical and mesolimbic dopaminergic systems.* J Neurochem 71: 1158-1167.
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1998). *Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mrna expression: Modulation by environmental novelty.* J Neurosci 18: 10579-10593.
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1999). *Environmental modulation of amphetamine-induced c-fos expression in d1 versus d2 striatal neurons.* Behav Brain Res 103: 203-209.
- Baisley SK, Cloninger CL, Bakshi VP (2011). *Fos expression following regimens of predator stress versus footshock that differentially affect prepulse inhibition in rats.* Physiol Behav 104: 796-803.
- Bale TL, Vale WW (2004). *Crf and crf receptors: Role in stress responsivity and other behaviors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 525-557.
- Bassareo V, Di Chiara G (1999). *Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments.* Neuroscience 89: 637-641.
- Beck CH, Fibiger HC (1995). *Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: With and without diazepam pretreatment.* J Neurosci 15: 709-720.

- Belda X, Marquez C, Armario A (2004). *Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: Comparison of two outbred rat strains.* Behav Brain Res 154: 399-408.
- Belda X, Rotllant D, Fuentes S, Delgado R, Nadal R, Armario A (2008). *Exposure to severe stressors causes long-lasting dysregulation of resting and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* Ann N Y Acad Sci 1148: 165-173.
- Bernardini GL, Gu X, Viscardi E, German DC (1991). *Amphetamine-induced and spontaneous release of dopamine from a9 and a10 cell dendrites: An in vitro electrophysiological study in the mouse.* J Neural Transm Gen Sect 84: 183-193.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1992). *Dopamine and glutamate agonists stimulate neuron-specific expression of fos-like protein in the striatum.* J Neurophysiol 68: 767-777.
- Berretta S, Robertson HA, Graybiel AM (1993). *Neurochemically specialized projection neurons of the striatum respond differentially to psychomotor stimulants.* Prog Brain Res 99: 201-205.
- Berridge KC, Robinson TE (2003). *Parsing reward.* Trends Neurosci 26: 507-513.
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC (2006). *Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function.* Biol Psychiatry 60: 1111-1120.
- Berridge KC (2007). *The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience.* Psychopharmacology 191: 391-431.
- Bhatnagar S, Dallman M (1998). *Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress.* Neuroscience 84: 1025-1039.
- Bhatnagar S, Vining C, Denski K (2004). *Regulation of chronic stress-induced changes in hypothalamic-pituitary-adrenal activity by the basolateral amygdala.* Ann N Y Acad Sci 1032: 315-319.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM (1990). *The characterization and modelling of antipredator defensive behavior.* Neurosci Biobehav Rev 14: 463-472.
- Borowsky B, Kuhn CM (1991). *Monoamine mediation of cocaine-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activation.* J Pharmacol Exp Ther 256: 204-210.
- Boudaba C, Szabo K, Tasker JG (1996). *Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus.* J Neurosci 16: 7151-7160.

- Brady LS (1994). *Stress, antidepressant drugs, and the locus coeruleus*. Brain Res Bull 35: 545-556.
- Brandon CL, Steiner H (2003). *Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum*. Eur J Neurosci 18: 1584-1592.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009). *Phasic excitation of dopamine neurons in ventral vta by noxious stimuli*. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 4894-4899.
- Burow A, Day HE, Campeau S (2005). *A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation*. Brain Res 1062: 63-73.
- Byrnes JJ, Wallace LJ (1997). *Amphetamine-induced sensitization and release of dopamine in slices from the ventral tegmental area of rats is enhanced following administration of cholera toxin into the ventral tegmental area*. Neurosci Lett 223: 45-48.
- Cain DW, Cidlowski JA (2015). *Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 29: 545-556.
- Caldwell JA, Caldwell JL, Darlington KK (2003). *Utility of dextroamphetamine for attenuating the impact of sleep deprivation in pilots*. Aviat Space Environ Med 74: 1125-1134.
- Campeau S, Watson SJ (1997). *Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress*. J Neuroendocrinol 9: 577-588.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Lachenal G, Halkerston KM, Rudarakanchana N, Hall J, Morrison CH, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2002). *Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats*. Behav Neurosci 116: 553-567.
- Carlezon WA, Jr., Wise RA (1996). *Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex*. J Neurosci 16: 3112-3122.
- Chase TD, Carrey N, Brown RE, Wilkinson M (2005a). *Methylphenidate differentially regulates c-fos and fosb expression in the developing rat striatum*. Dev Brain Res 157: 181-191.
- Chase TD, Carrey N, Brown RE, Wilkinson M (2005b). *Methylphenidate regulates c-fos and fosb expression in multiple regions of the immature rat brain*. Dev Brain Res 156: 1-12.

Chen X, Herbert J (1995). *Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: Correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses.* Neuroscience **64**: 675-685.

Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007). *Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Implications for the integration of limbic inputs.* J Neurosci **27**: 2025-2034.

Clark PJ, Ghasem PR, Mika A, Day HE, Herrera JJ, Greenwood BN, Fleshner M (2014). *Wheel running alters patterns of uncontrollable stress-induced cfos mrna expression in rat dorsal striatum direct and indirect pathways: A possible role for plasticity in adenosine receptors.* Behav Brain Res **272**: 252-263.

Claussen CM, Dafny N (2014). *Acute administration of methylphenidate alters the prefrontal cortex neuronal activity in a dose-response characteristic.* J Exp Pharmacol **6**: 1-9.

Cole RL, Sawchenko PE (2002). *Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.* J Neurosci **22**: 959-969.

Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Berod A (2007). *Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: A double-labelling study.* Eur J Neurosci **26**: 1011-1025.

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995). *Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress.* Neuroscience **64**: 477-505.

Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE (1988). *Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus.* J Comp Neurol **274**: 60-76.

Dalia A, Wallace LJ (1995). *Amphetamine induction of c-fos in the nucleus accumbens is not inhibited by glutamate antagonists.* Brain Res **694**: 299-307.

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

Dal-Zotto S, Marti O, Delgado R, Armario A (2004). *Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress.* Psychopharmacology **177**: 230-237.

- Daviu N, Delgado-Morales R, Nadal R, Armario A (2012). *Not all stressors are equal: Behavioral and endocrine evidence for development of contextual fear conditioning after a single session of footshocks but not of immobilization.* Front Behav Neurosci 6: 69.
- Day HE, Badiani A, Uslaner JM, Oates MM, Vittoz NM, Robinson TE, Watson SJ, Jr., Akil H (2001). *Environmental novelty differentially affects c-fos mrna expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala.* J Neurosci 21: 732-740.
- Day HE, Masini CV, Campeau S (2004). *The pattern of brain c-fos mrna induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (tmt), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics.* Brain Res 1025: 139-151.
- Day HE, Nebel S, Sasse S, Campeau S (2005). *Inhibition of the central extended amygdala by loud noise and restraint stress.* Eur J Neurosci 21: 441-454.
- Day HE, Kryskow EM, Nyhuis TJ, Herlihy L, Campeau S (2008). *Conditioned fear inhibits c-fos mrna expression in the central extended amygdala.* Brain Res 1229: 137-146.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (1999). *Neuroendocrine responses to an emotional stressor: Evidence for involvement of the medial but not the central amygdala.* Eur J Neurosci 11: 2312-2322.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA (2001). *Stressor categorization: Acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups.* Eur J Neurosci 14: 1143-1152.
- de Goeij DC, Jezova D, Tilders FJ (1992). *Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus.* Brain Res 577: 165-168.
- de Kloet ER, Rotteveel F, Voorhuis TA, Terlouw M (1985). *Topography of binding sites for neurohypophyseal hormones in rat brain.* Eur J Pharmacol 110: 113-119.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998). *Brain corticosteroid receptor balance in health and disease.* Endocr Rev 19: 269-301.
- de Kloet ER (2003). *Hormones, brain and stress.* Endocr Regul 37: 51-68.
- de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E (2009). *Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA.* Brain Res 1293: 129-141.

- Deutch AY, Lee MC, Gillham MH, Cameron DA, Goldstein M, Iadarola MJ (1991). *Stress selectively increases fos protein in dopamine neurons innervating the prefrontal cortex.* Cereb Cortex 1: 273-292.
- Devlbiss DM, Berridge CW (2006). *Low-dose methylphenidate actions on tonic and phasic locus coeruleus discharge.* J Pharmacol Exp Ther 319: 1327-1335.
- Devlbiss DM, Berridge CW (2008). *Cognition-enhancing doses of methylphenidate preferentially increase prefrontal cortex neuronal responsiveness.* Biol Psychiatry 64: 626-635.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003). *Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: A fast feedback mechanism.* J Neurosci 23: 4850-4857.
- Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG (2009). *Glucocorticoids regulate glutamate and gaba synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways.* J Neurosci 29: 393-401.
- Di Chiara G, Imperato A (1988). *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.* Proc Natl Acad Sci U S A 85: 5274-5278.
- Di Ciano P, Robbins TW, Everitt BJ (2008). *Differential effects of nucleus accumbens core, shell, or dorsal striatal inactivations on the persistence, reacquisition, or reinstatement of responding for a drug-paired conditioned reinforcer.* Neuropsychopharmacology 33: 1413-1425.
- Di Miceli M, Gronier B (2015). *Psychostimulants and atomoxetine alter the electrophysiological activity of prefrontal cortex neurons, interaction with catecholamine and glutamate nmda receptors.* Psychopharmacology 232: 2191-2205.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001). *"When a rat smells a cat": The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor.* Neuroscience 104: 1085-1097.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993). *The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress.* J Neurosci 13: 3839-3847.
- Doyle JR, Yamamoto BK (2010). *Serotonin 2 receptor modulation of hyperthermia, corticosterone, and hippocampal serotonin depletions following serial exposure to chronic stress and methamphetamine.* Psychoneuroendocrinology 35: 629-633.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996). *Neuroanatomical characterization of fos induction in rat behavioral models of anxiety.* Brain Res 713: 79-91.

- Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V (2004). *Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress*. *Ann N Y Acad Sci* **1018**: 25-34.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ (1992). *The hippocampus--what does it do?* *Behav Neural Biol* **57**: 2-36.
- Emmert MH, Herman JP (1999). *Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: Evidence for distinctive stress pathways*. *Brain Res* **845**: 60-67.
- Engber TM, Koury EJ, Dennis SA, Miller MS, Contreras PC, Bhat RV (1998). *Differential patterns of regional c-fos induction in the rat brain by amphetamine and the novel wakefulness-promoting agent modafinil*. *Neurosci Lett* **241**: 95-98.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004). *The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited*. *Front Neuroendocrinol* **25**: 132-149.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Linke R, Riechert U, Holtt V (1999). *Long-lasting sensitization towards morphine in motoric and limbic areas as determined by c-fos expression in rat brain*. *Mol Brain Res* **72**: 1-16.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1994). *A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons*. *J Neurosci* **14**: 897-913.
- Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG (2010). *Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system*. *J Neuroendocrinol* **22**: 846-861.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005). *Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion*. *Nat Neurosci* **8**: 1481-1489.
- Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J (1994). *Differential effect of amygdaloid lesions on crf-41, acth and corticosterone responses following neural stimuli*. *Brain Res* **658**: 21-26.
- Ferguson SM, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003). *Amphetamine-evoked c-fos mRNA expression in the caudate-putamen: The effects of da and nmda receptor antagonists vary as a function of neuronal phenotype and environmental context*. *J Neurochem* **86**: 33-44.
- Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP (2003). *Stress integration after acute and chronic predator stress: Differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. *Endocrinology* **144**: 5249-5258.

- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM (1992). *Molecular cloning of the rat α_2 adenosine receptor: Selective co-expression with d_2 dopamine receptors in rat striatum*. Mol Brain Res 14: 186-195.
- Flak JN, Myers B, Solomon MB, McKlveen JM, Krause EG, Herman JP (2014). *Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress*. Eur J Neurosci 39: 1903-1911.
- Gabbott PL, Bacon SJ (1997). *Calcineurin immunoreactivity in prelimbic cortex (area 32) of the rat*. Brain Res 747: 352-356.
- Gabbott PL, Bacon SJ (1997). *Vasoactive intestinal polypeptide containing neurones in monkey medial prefrontal cortex (mpfc): Colocalisation with calretinin*. Brain Res 744: 179-184.
- Gagliano H, Fuentes S, Nadal R, Armario A (2008). *Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses*. Behav Brain Res 187: 239-245.
- Gagliano H, Andero R, Armario A, Nadal R (2009). *Repeated amphetamine administration in rats revealed consistency across days and a complete dissociation between locomotor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis effects of the drug*. Psychopharmacology 207: 447-459.
- Gagliano H (2015). *¿puede el metilfenidato atenuar el impacto del estrés?: Un modelo experimental en rata*. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Univeritat Autònoma de Barcelona (UAB) Bellaterra, Barcelona.
- Gagliano H, Ortega-Sanchez JA, Nadal R, Armario A (2017). *Psychostimulants and forced swim stress interaction: How activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress-induced hyperglycemia are affected*. Psychopharmacology 234: 2859-2869.
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A (2000). *Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure*. Neuroendocrinology 72: 114-125.
- Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL (2003). *Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnrna but does not affect c-fos mrna or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Neuroendocrinol 15: 1075-1083.

Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1994). *Nerve growth factor activates a ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of creb*. Cell 77: 713-725.

Giustino TF, Maren S (2015). *The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear*. Front Behav Neurosci 9: 298.

Goldstein DS, Kopin IJ (2007). *Evolution of concepts of stress*. Stress 10: 109-120.

Gomez-Roman A, Ortega-Sanchez JA, Rotllant D, Gagliano H, Belda X, Delgado-Morales R, Marin-Blasco I, Nadal R, Armario A (2016). *The neuroendocrine response to stress under the effect of drugs: Negative synergy between amphetamine and stressors*. Psychoneuroendocrinology 63: 94-101.

Gomez-Román A (2011). *La exposició simultànea al estrés y a la anfetamina revela sinergias negativas que afectan a la respuesta neuroendocrina y a la activación del sistema nervioso central*. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona Bellaterra, Barcelona.

Gore F, Schwartz EC, Brangers BC, Aladi S, Stujenske JM, Likhtik E, Russo MJ, Gordon JA, Salzman CD, Axel R (2015). *Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses*. Cell 162: 134-145.

Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990a). *Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum*. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6912-6916.

Graybiel AM (1990b). *The basal ganglia and the initiation of movement*. Rev Neurol 146: 570-574.

Grissom NM, Bhatnagar S (2011). *The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via beta-adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase*. Neuroscience 178: 108-122.

Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2012). *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling*. Mol Cell Endocrinol 350: 299-309.

Gronier B, Aston J, Liauzun C, Zetterstrom T (2010). *Age-dependent effects of methylphenidate in the prefrontal cortex: Evidence from electrophysiological and arc gene expression measurements*. J Psychopharmacol 24: 1819-1827.

Gronier B (2011). *In vivo electrophysiological effects of methylphenidate in the prefrontal cortex: Involvement of dopamine d1 and alpha 2 adrenergic receptors*. Eur Neuropsychopharmacol 21: 192-204.

- Haller J, Mikics E, Makara GB (2008). *The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings.* Front Neuroendocrinol 29: 273-291.
- Han DD, Gu HH (2006). *Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs.* BMC Pharmacol 6: 6.
- Hardin J, Hilbe J (2003). *Generalized estimating equations.* Chapman and Hall/ CRC Boca Ratón.
- Harlan RE, Garcia MM (1998). *Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain.* Mol Neurobiol 16: 221-267.
- Hauger RL, Millan MA, Lorang M, Harwood JP, Aguilera G (1988). *Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress.* Endocrinology 123: 396-405.
- Hawken CM, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M (2004). *Long-term methylphenidate treatment down-regulates c-fos in the striatum of male cd-1 mice.* Neuroreport 15: 1045-1048.
- Herdegen T, Kovary K, Buhl A, Bravo R, Zimmermann M, Gass P (1995). *Basal expression of the inducible transcription factors c-jun, junb, jund, c-fos, fosb, and krox-24 in the adult rat brain.* J Comp Neurol 354: 39-56.
- Herdegen T, Leah JD (1998). *Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: Control of gene expression by jun, fos and krox, and creb/atf proteins.* Brain Res Rev 28: 370-490.
- Herman JP, Schafer MK, Thompson RC, Watson SJ (1992). *Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo.* Mol Endocrinol 6: 1061-1069.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (1994). *Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic crh and avp mrna expression.* J Neuroendocrinol 6: 433-442.
- Herman JP, Cullinan WE (1997). *Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.* Trends Neurosci 20: 78-84.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003). *Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness.* Front Neuroendocrinol 24: 151-180.

- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005). *Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29: 1201-1213.
- Herrera DG, Robertson HA (1996). *Activation of c-fos in the brain*. Prog Neurobiol 50: 83-107.
- Hoffman GE, Lyo D (2002). *Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: Are we all 'fos-ed out'?* J Neuroendocrinol 14: 259-268.
- Holdefer RN, Jensen RA (1987). *The effects of peripheral d-amphetamine, 4-oh amphetamine, and epinephrine on maintained discharge in the locus coeruleus with reference to the modulation of learning and memory by these substances*. Brain Res 417: 108-117.
- Holly EN, Miczek KA (2016). *Ventral tegmental area dopamine revisited: Effects of acute and repeated stress*. Psychopharmacology 233: 163-186.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). *Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci 29: 565-598.
- Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H (1992). *Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress*. Endocrinology 131: 240-246.
- Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H (1993). *Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mrna expression in brain regions related to stress responses: Comparison with pattern of c-fos mrna induction after stress*. Brain Res 616: 114-125.
- Imaki T, Shibasaki T, Demura H (1995). *Regulation of gene expression in the central nervous system by stress: Molecular pathways of stress responses*. Endocr J 42: 121-130.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L (1991). *Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis*. Brain Res 538: 111-117.
- Ishimatsu M, Kidani Y, Tsuda A, Akasu T (2002). *Effects of methylphenidate on the membrane potential and current in neurons of the rat locus coeruleus*. J Neurophysiol 87: 1206-1212.
- Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2000). *Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats*. J Neurosci 20: 7489-7495.

- Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004). *Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell*. Nat Neurosci 7: 389-397.
- Jacobson L, Sapolsky R (1991). *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*. Endocr Rev 12: 118-134.
- Jaferi A, Bhatnagar S (2006). *Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in animals that habituate to repeated stress*. Endocrinology 147: 4917-4930.
- Janak PH, Tye KM (2015). *From circuits to behaviour in the amygdala*. Nature 517: 284-292.
- Janitzky K, D'Hanis W, Krober A, Schwegler H (2015). *Tmt predator odor activated neural circuit in c57bl/6j mice indicates tmt-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress*. Brain Res 1599: 1-8.
- Jankord R, Herman JP (2008). *Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress*. Ann N Y Acad Sci 1148: 64-73.
- Jedema HP, Moghaddam B (1994). *Glutamatergic control of dopamine release during stress in the rat prefrontal cortex*. J Neurochem 63: 785-788.
- Johansson B, Lindstrom K, Fredholm BB (1994). *Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger rna induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat*. Neuroscience 59: 837-849.
- Jones KR, Myers B, Herman JP (2011). *Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors*. Physiol Behav 104: 266-271.
- Jones Z, Dafny N (2014). *Acute and chronic dose-response effect of methylphenidate on ventral tegmental area neurons correlated with animal behavior*. J Neural Transm (Vienna) 121: 327-345.
- Jordan S, Kramer GL, Zukas PK, Petty F (1994). *Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swim stress*. Neurochem Res 19: 1521-1525.
- Joyce PR, Donald RA, Nicholls MG, Livesey JH, Abbott RM (1986). *Endocrine and behavioral responses to methylphenidate in normal subjects*. Biol Psychiatry 21: 1015-1023.
- Kalivas PW, Stewart J (1991). *Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity*. Brain Res Rev 16: 223-244.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005). *The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice*. Am J Psychiatry 162: 1403-1413.

- Kant GJ, Lenox RH, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL (1983). *Comparison of stress response in male and female rats: Pituitary cyclic amp and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone*. *Psychoneuroendocrinology* **8**: 421-428.
- Karim TJ, Reyes-Vazquez C, Dafny N (2017). *Comparison of the vta and lc response to methylphenidate: A concomitant behavioral and neuronal study of adolescent male rats*. *J Neurophysiol* **118**: 1501-1514.
- Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010). *Pharmacological recruitment of the gabaergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure*. *Br J Pharmacol* **161**: 1677-1691.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984). *Corticosteroid inhibition of acth secretion*. *Endocr Rev* **5**: 1-24.
- Koda K, Ago Y, Cong Y, Kita Y, Takuma K, Matsuda T (2010). *Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice*. *J Neurochem* **114**: 259-270.
- Kollack-Walker S, Watson SJ, Akil H (1997). *Social stress in hamsters: Defeat activates specific neurocircuits within the brain*. *J Neurosci* **17**: 8842-8855.
- Kollins SH, MacDonald EK, Rush CR (2001). *Assessing the abuse potential of methylphenidate in nonhuman and human subjects: A review*. *Pharmacol Biochem Behav* **68**: 611-627.
- Kollins SH, English J, Robinson R, Hallyburton M, Chrisman AK (2009). *Reinforcing and subjective effects of methylphenidate in adults with and without attention deficit hyperactivity disorder (adhd)*. *Psychopharmacology* **204**: 73-83.
- Konradi C, Leveque JC, Hyman SE (1996). *Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic nmda receptors and calcium*. *J Neurosci* **16**: 4231-4239.
- Koob GF (2003). *Alcoholism: Allostasis and beyond*. *Alcohol Clin Exp Res* **27**: 232-243.
- Koob GF, Le Moal M (2005). *Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction*. *Nat Neurosci* **8**: 1442-1444.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ (1999). *Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology*. *Neurosci Biobehav Rev* **23**: 925-935.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk

- G, Wohr M, Fuchs E (2011). *Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept*. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1291-1301.
- Korosi A, Baram TZ (2008). *The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood*. *Eur J Pharmacol* 583: 204-214.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS (2005). *The darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease*. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 3-38.
- Kovacs KJ, Sawchenko PE (1996). *Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons*. *J Neurosci* 16: 262-273.
- Kovacs KJ (1998). *C-fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map*. *Neurochem Int* 33: 287-297.
- Kovacs KJ (2005). *Psychological and physiological stressors*, in: Steckler T. (Ed.), *Handbook of stress and the brain*. Elsevier, pp. 775-792.
- Kovary K, Bravo R (1991a). *Expression of different jun and fos proteins during the g0-to-g1 transition in mouse fibroblasts: In vitro and in vivo associations*. *Mol Cell Biol* 11: 2451-2459.
- Kovary K, Bravo R (1991b). *The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts*. *Mol Cell Biol* 11: 4466-4472.
- Kuczenski R, Segal DS (1997). *Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine*. *J Neurochem* 68: 2032-2037.
- Kuczenski R, Segal DS (2002). *Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: Preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine*. *J Neurosci* 22: 7264-7271.
- Lacroix D, Ferron A (1988). *Electrophysiological effects of methylphenidate on the coeruleo-cortical noradrenergic system in the rat*. *Eur J Pharmacol* 149: 277-285.
- LaHoste GJ, Henry BL, Marshall JF (2000). *Dopamine d1 receptors synergize with d2, but not d3 or d4, receptors in the striatum without the involvement of action potentials*. *J Neurosci* 20: 6666-6671.
- Lazarus RS (1993). *From psychological stress to the emotions: A history of changing outlooks*. *Annu Rev Psychol* 44: 1-21.
- Le Moal M, Koob GF (2007). *Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives*. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 377-393.

- Levin ED, Bushnell PJ, Rezvani AH (2011). *Attention-modulating effects of cognitive enhancers*. *Pharmacol Biochem Behav* **99**: 146-154.
- Li HY, Sawchenko PE (1998). *Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "Neurogenic" Stress: A comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels*. *J Comp Neurol* **393**: 244-266.
- Lin JS, Hou Y, Jouvet M (1996). *Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat*. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 14128-14133.
- Luciana M (2013). *Adolescent brain development in normality and psychopathology*. *Dev Psychopathol* **25**: 1325-1345.
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G (1994). *Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity*. *J Neurosci* **14**: 4825-4830.
- Ma XM, Aguilera G (1999). *Transcriptional responses of the vasopressin and corticotropin-releasing hormone genes to acute and repeated intraperitoneal hypertonic saline injection in rats*. *Mol Brain Res* **68**: 129-140.
- Makara GB, Haller J (2001). *Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications*. *Prog Neurobiol* **65**: 367-390.
- Makara GB, Mergl Z, Zelena D (2004). *The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: An assessment of the evidence*. *Ann N Y Acad Sci* **1018**: 151-161.
- Marín-Blasco I, Muñoz-Abellan C, Andero R, Nadal R, Armario A (2017). *Neuronal activation after prolonged immobilization: Do the same or different neurons respond to a novel stressor?* *Cereb Cortex*: 1-12.
- 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 (1998). *Anterior pituitary response to stress: Time-related changes and adaptation*. *Int J Dev Neurosci* **16**: 241-260.
- Martí O, Garcia A, Valles 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.

- Masini CV, Day HE, Gray T, Crema LM, Nyhuis TJ, Babb JA, Campeau S (2012). *Evidence for a lack of phasic inhibitory properties of habituated stressors on hpa axis responses in rats*. *Physiol Behav* **105**: 568-575.
- Matsumoto K, Suzuki W, Tanaka K (2003). *Neuronal correlates of goal-based motor selection in the prefrontal cortex*. *Science* **301**: 229-232.
- McCulloch C, Searle S (2001). *Generalized, linear and mixed models*. Wiley and Sons, New York.
- McEwen BS, Stellar E (1993). *Stress and the individual. Mechanisms leading to disease*. *Arch Intern Med* **153**: 2093-2101.
- McEwen BS (1998). *Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load*. *Ann N Y Acad Sci* **840**: 33-44.
- McEwen BS, Wingfield JC (2003). *The concept of allostasis in biology and biomedicine*. *Horm Behav* **43**: 2-15.
- McEwen BS, Gianaros PJ (2011). *Stress- and allostasis-induced brain plasticity*. *Annu Rev Med* **62**: 431-445.
- McGregor IS, Dielenberg RA (1999). *Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats*. *Psychopharmacology* **147**: 174-181.
- McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004). *Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: Region-specific effects of the benzodiazepine midazolam*. *J Neurosci* **24**: 4134-4144.
- McKlveen JM, Myers B, Flak JN, Bundzikova J, Solomon MB, Seroogy KB, Herman JP (2013). *Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion*. *Biol Psychiatry* **74**: 672-679.
- Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G (1992). *The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area*. *Life Sci* **51**: 711-718.
- Miller EK, Cohen JD (2001). *An integrative theory of prefrontal cortex function*. *Annu Rev Neurosci* **24**: 167-202.
- Milstein JA, Dalley JW, Robbins TW (2010). *Methylphenidate-induced impulsivity: Pharmacological antagonism by beta-adrenoreceptor blockade*. *J Psychopharmacol* **24**: 309-321.
- Miyamoto S, Snouwaert JN, Koller BH, Moy SS, Lieberman JA, Duncan GE (2004). *Amphetamine-induced fos is reduced in limbic cortical regions but not in the caudate or*

accumbens in a genetic model of nmda receptor hypofunction. Neuropsychopharmacology **29**: 2180-2188.

Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004). *Computational roles for dopamine in behavioural control.* Nature **431**: 760-767.

Morales M, Margolis EB (2017). *Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour.* Nat Rev Neurosci **18**: 73-85.

Morgan JJ, Curran T (1991). *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun.* Annu Rev Neurosci **14**: 421-451.

Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO (2005). *Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**: 1214-1224.

Morshedi MM, Meredith GE (2007). *Differential laminar effects of amphetamine on prefrontal parvalbumin interneurons.* Neuroscience **149**: 617-624.

Morshedi MM, Meredith GE (2008). *Repeated amphetamine administration induces fos in prefrontal cortical neurons that project to the lateral hypothalamus but not the nucleus accumbens or basolateral amygdala.* Psychopharmacology **197**: 179-189.

Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER, Datson NA (2006). *Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time.* J Neuroendocrinol **18**: 239-252.

Mueller NK, Dolgas CM, Herman JP (2006). *Regulation of forebrain gabaergic stress circuits following lesion of the ventral subiculum.* Brain Res **1116**: 132-142.

Muñoz-Abellán C, Andero R, Nadal R, Armario A (2008). *Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor.* Psychoneuroendocrinology **33**: 1139-1150.

Muñoz-Abellán C, Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A (2009). *Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety.* Horm Behav **56**: 465-471.

Munoz-Abellan C (2011). *¿es la exposición al olor del depredador en ratas un modelo animal de trastorno de estrés post-traumático?* Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona Bellaterra, Barcelona.

- Muñoz-Abellán C, Rabasa C, Daviu N, Nadal R, Armario A (2011). *Behavioral and endocrine consequences of simultaneous exposure to two different stressors in rats: Interaction or independence?* PLoS One 6: e21426.
- Myers B, Mark Dolgas C, Kasckow J, Cullinan WE, Herman JP (2014). *Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and gabaergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis.* Brain Struct Funct 219: 1287-1303.
- Myers B, Carvalho-Netto E, Wick-Carlson D, Wu C, Naser S, Solomon MB, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2016). *Gabaergic signaling within a limbic-hypothalamic circuit integrates social and anxiety-like behavior with stress reactivity.* Neuropsychopharmacology 41: 1530-1539.
- Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, Calhoon GG, Halbert SA, Wichmann R, Holden SS, Mertens KL, Anahtar M, Felix-Ortiz AC, Wickersham IR, Gray JM, Tye KM (2015). *A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations.* Nature 520: 675-678.
- Nash JF, Jr., Meltzer HY, Gudelsky GA (1988). *Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine.* J Pharmacol Exp Ther 245: 873-879.
- Nedivi E, Hevroni D, Naot D, Israeli D, Citri Y (1993). *Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning.* Nature 363: 718-722.
- Nikulina EM, Marchand JE, Kream RM, Miczek KA (1998). *Behavioral sensitization to cocaine after a brief social stress is accompanied by changes in fos expression in the murine brainstem.* Brain Res 810: 200-210.
- Nikulina EM, Covington HE, 3rd, Ganschow L, Hammer RP, Jr., Miczek KA (2004). *Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala.* Neuroscience 123: 857-865.
- Olpe HR, Steinmann MW, Jones RS (1985). *Locus coeruleus as a target for psychogeriatric agents.* Ann N Y Acad Sci 444: 394-405.
- Ons S, Martí O, Armario A (2004). *Stress-induced activation of the immediate early gene arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: Relationship to c-fos mRNA.* J Neurochem 89: 1111-1118.
- Ons S, Rotllant D, Marín-Blasco IJ, Armario A (2010). *Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and arc mRNA levels appear to be less sensitive than c-fos mRNA to adaptation.* Eur J Neurosci 31: 2043-2052.

- Ostrander MM, Badiani A, Day HE, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003a). *Environmental context and drug history modulate amphetamine-induced c-fos mrna expression in the basal ganglia, central extended amygdala, and associated limbic forebrain*. *Neuroscience* 120: 551-571.
- Ostrander MM, Richtand NM, Herman JP (2003b). *Stress and amphetamine induce fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors*. *Brain Res* 990: 209-214.
- Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (1995). *Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: In vivo microdialysis studies*. *Front Neuroendocrinol* 16: 89-150.
- Pacak K, Palkovits M (2001). *Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders*. *Endocr Rev* 22: 502-548.
- Pace TW, Gaylord R, Topczewski F, Girotti M, Rubin B, Spencer RL (2005). *Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experience is not directly related to the stressfulness of that experience*. *Eur J Neurosci* 22: 1679-1690.
- Papavassiliou AG, Treier M, Chavrier C, Bohmann D (1992). *Targeted degradation of c-fos, but not v-fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-jun*. *Science* 258: 1941-1944.
- Paterson NE, Wetzler C, Hackett A, Hanania T (2012). *Impulsive action and impulsive choice are mediated by distinct neuropharmacological substrates in rat*. *Int J Neuropsychopharmacol* 15: 1473-1487.
- Pattij T, Schettters D, Schoffelmeer AN, van Gaalen MM (2012). *On the improvement of inhibitory response control and visuospatial attention by indirect and direct adrenoceptor agonists*. *Psychopharmacology* 219: 327-340.
- Penner MR, McFadyen MP, Pinaud R, Carrey N, Robertson HA, Brown RE (2002). *Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of cd-1 mice after acute methylphenidate administration*. *Dev Brain Res* 135: 71-77.
- Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M (2005). *Deltafosb accumulates in a gabaergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment*. *Eur J Neurosci* 21: 2817-2824.
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, Uhl GR (1993). *Brain transcription factor expression: Effects of acute and chronic amphetamine and injection stress*. *Mol Brain Res* 20: 91-100.

- Pezzone MA, Lee WS, Hoffman GE, Pezzone KM, Rabin BS (1993). *Activation of brainstem catecholaminergic neurons by conditioned and unconditioned aversive stimuli as revealed by c-fos immunoreactivity*. Brain Res 608: 310-318.
- Piazza PV, Le Moal M (1998). *The role of stress in drug self-administration*. Trends Pharmacol Sci 19: 67-74.
- Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M (1979). *Forced swimming in rats: Hypothermia, immobility and the effects of imipramine*. Eur J Pharmacol 57: 431-436.
- Rabasa C, Gagliano H, Pastor-Ciurana J, Fuentes S, Belda X, Nadal R, Armario A (2015). *Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective*. Neurosci Biobehav Rev 56: 35-49.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006). *Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress*. J Neurosci 26: 12967-12976.
- Radley JJ, Williams B, Sawchenko PE (2008). *Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress*. J Neurosci 28: 5806-5816.
- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009). *A discrete gabaergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response*. J Neurosci 29: 7330-7340.
- Radley JJ (2012). *Toward a limbic cortical inhibitory network: Implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress*. Front Behav Neurosci 6: 7.
- Reul JM, de Kloet ER (1985). *Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation*. Endocrinology 117: 2505-2511.
- Rezvani AH, Kholdebarin E, Cauley MC, Dawson E, Levin ED (2009). *Attenuation of pharmacologically-induced attentional impairment by methylphenidate in rats*. Pharmacol Biochem Behav 92: 141-146.
- Risold PY, Swanson LW (1997). *Connections of the rat lateral septal complex*. Brain Res Rev 24: 115-195.
- Ritter S, Watts AG, Dinh TT, Sanchez-Watts G, Pedrow C (2003). *Immunotoxin lesion of hypothalamically projecting norepinephrine and epinephrine neurons differentially affects circadian and stressor-stimulated corticosterone secretion*. Endocrinology 144: 1357-1367.

- Rivest S, Laflamme N (1995). *Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brains of immune-challenged rats*. J Neuroendocrinol 7: 501-525.
- Rivier C, Vale W (1983). *Modulation of stress-induced acth release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin*. Nature 305: 325-327.
- 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.
- Robbins TW (2002). *The 5-choice serial reaction time task: Behavioural pharmacology and functional neurochemistry*. Psychopharmacology 163: 362-380.
- Robertson LM, Kerppola TK, Vendrell M, Luk D, Smeyne RJ, Bocchiaro C, Morgan JJ, Curran T (1995). *Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements*. Neuron 14: 241-252.
- Roland BL, Sawchenko PE (1993). *Local origins of some gabaergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat*. J Comp Neurol 332: 123-143.
- Root CM, Denny CA, Hen R, Axel R (2014). *The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour*. Nature 515: 269-273.
- Rotllant D, Nadal R, Armario A (2007). *Differential effects of stress and amphetamine administration on fos-like protein expression in corticotropin releasing factor-neurons of the rat brain*. Dev Neurobiol 67: 702-714.
- Rotllant D (2008). *Activación del sistema nervioso central por el estrés y la anfetamina: Relación entre estrés, adicción y diferencias individuales*. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) Bellaterra, Barcelona.
- Rotllant D, Márquez C, Nadal R, Armario A (2010). *The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits*. Neuroscience 168: 691-705.
- Rotllant D, Pastor-Ciurana J, Armario A (2013). *Stress-induced brain histone h3 phosphorylation: Contribution of the intensity of stressors and length of exposure*. J Neurochem 125: 599-609.
- Rotondo F, Butz H, Syro LV, Yousef GM, Di Ieva A, Restrepo LM, Quintanar-Stephano A, Berczi I, Kovacs K (2016). *Arginine vasopressin (avp): A review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system*. Pituitary 19: 345-355.

- Ruskin DN, Marshall JF (1994). *Amphetamine- and cocaine-induced fos in the rat striatum depends on d2 dopamine receptor activation*. Synapse 18: 233-240.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. Endocr Rev 21: 55-89.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982). *The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat*. Brain Res 257: 275-325.
- Sawchenko PE (1988). *Effects of catecholamine-depleting medullary knife cuts on corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamus of normal and steroid-manipulated rats*. Neuroendocrinology 48: 459-470.
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A (2000). *Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: A tale of two paradigms*. Prog Brain Res 122: 61-78.
- Schultz W (2002). *Getting formal with dopamine and reward*. Neuron 36: 241-263.
- Segal DS, Kuczenski R (1999). *Escalating dose-binge treatment with methylphenidate: Role of serotonin in the emergent behavioral profile*. J Pharmacol Exp Ther 291: 19-30.
- Selye H (1946). *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. J Allergy 17: 231-289
- Selye H (1976). *Forty years of stress research: Principal remaining problems and misconceptions*. Can Med Assoc J 115: 53-56.
- Senba E, Umemoto S, Kawai Y, Noguchi K (1994). *Differential expression of fos family and jun family mrnas in the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis after immobilization stress*. Mol Brain Res 24: 283-294.
- Senba E, Ueyama T (1997). *Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat*. Neurosci Res 29: 183-207.
- Sheng M, Greenberg ME (1990). *The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system*. Neuron 4: 477-485.
- Shepard JD, Liu Y, Sassone-Corsi P, Aguilera G (2005). *Role of glucocorticoids and camp-mediated repression in limiting corticotropin-releasing hormone transcription during stress*. J Neurosci 25: 4073-4081.
- Shepard R, Page CE, Coutellier L (2016). *Sensitivity of the prefrontal gabaergic system to chronic stress in male and female mice: Relevance for sex differences in stress-related disorders*. Neuroscience 332: 1-12.

- Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG (1989). *The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mrna degradation pathways*. Genes Dev 3: 60-72.
- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K (2011). *The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses*. Neuropsychopharmacology 36: 793-804.
- Snyder-Keller AM (1991a). *Striatal c-fos induction by drugs and stress in neonatally dopamine-depleted rats given nigral transplants: Importance of nmda activation and relevance to sensitization phenomena*. Exp Neurol 113: 155-165.
- Snyder-Keller AM (1991b). *Striatal c-fos induction in neonatally dopamine-depleted rats given transplants*. Ann N Y Acad Sci 627: 395-398.
- Stamp JA, Herbert J (1999). *Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress*. Neuroscience 94: 1313-1322.
- Steinkellner T, Freissmuth M, Sitte HH, Montgomery T (2011). *The ugly side of amphetamines: Short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (mdma, 'ecstasy'), methamphetamine and d-amphetamine*. Biol Chem 392: 103-115.
- Steketee JD, Kalivas PW (2011). *Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior*. Pharmacol Rev 63: 348-365.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005). *Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review*. Prog Neurobiol 75: 406-433.
- Sumner BE, Cruise LA, Slattery DA, Hill DR, Shahid M, Henry B (2004). *Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs*. Psychopharmacology 171: 306-321.
- Svetlov SI, Kobeissy FH, Gold MS (2007). *Performance enhancing, non-prescription use of ritalin: A comparison with amphetamines and cocaine*. J Addict Dis 26: 1-6.
- Swanson LW, Sawchenko PE (1983). *Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei*. Annu Rev Neurosci 6: 269-324.
- Swanson LW, Simmons DM, Hofmann SL, Goldstein JL, Brown MS (1988). *Localization of mrna for low density lipoprotein receptor and a cholesterol synthetic enzyme in rabbit nervous system by in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci 85: 9821-9825.
- Swerdlow NR, Koob GF, Cador M, Lorang M, Hauger RL (1993). *Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat*. Pharmacol Biochem Behav 45: 629-637.
- Tang B, Dafny N (2012). *Methylphenidate modulates the locus ceruleus neuronal activity in freely behaving rat*. Eur J Pharmacol 695: 48-56.

Tanimura SM, Watts AG (1998). *Corticosterone can facilitate as well as inhibit corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus*. *Endocrinology* **139**: 3830-3836.

Tanimura SM, Watts AG (2000). *Adrenalectomy dramatically modifies the dynamics of neuropeptide and c-fos gene responses to stress in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *J Neuroendocrinol* **12**: 715-722.

Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). *Minireview: Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors*. *Endocrinology* **147**: 5549-5556.

Tavares RF, Correa FM, Resstel LB (2009). *Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats*. *J Neurosci Res* **87**: 2601-2607.

Thomas DN, Post RM, Pert A (1994). *Focal and systemic cocaine differentially affect extracellular norepinephrine in the locus coeruleus, frontal cortex and hippocampus of the anaesthetized rat*. *Brain Res* **645**: 135-142.

Torres G, Horowitz JM (1999). *Drugs of abuse and brain gene expression*. *Psychosom Med* **61**: 630-650.

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

Turgeon SM, Pollack AE, Schusheim L, Fink JS (1996). *Effects of selective adenosine a1 and a2a agonists on amphetamine-induced locomotion and c-fos in striatum and nucleus accumbens*. *Brain Res* **707**: 75-80.

Úbeda-Contreras J, Marín-Blasco I, Nadal R, Armario A (2018). *C-fos expression patterns in brain areas activated by emotional stressors differing in nature and intensity*. *Brain Struct Funct* **223**: 2213-2227.

Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). *Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses*. *Nat Rev Neurosci* **10**: 397-409.

Umemoto S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E (1997). *Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of ngfi-a*. *Neuroscience* **80**: 763-773.

Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001a). *Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mrna expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context*. *Eur J Neurosci* **13**: 1977-1983.

- Uslaner J, Badiani A, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001b). *Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to induce c-fos mrna expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens*. Brain Res **920**: 106-116.
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio DA, Herman JP (2005). *Comparative analysis of acth and corticosterone sampling methods in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab **289**: E823-828.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004). *Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of erk activation in mouse brain*. Eur J Neurosci **19**: 1826-1836.
- Valles A, Marti O, 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.
- Vanderhaven MW, Cornish JL, Staples LG (2015). *The orexin-1 receptor antagonist sb-334867 decreases anxiety-like behavior and c-fos expression in the hypothalamus of rats exposed to cat odor*. Behav Brain Res **278**: 563-568.
- Vigas M (1984). *Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response*. Gordon and Breach Sci. Publ., New York.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004). *Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum*. Trends Neurosci **27**: 468-474.
- Wang JQ, Smith AJ, McGinty JF (1995). *A single injection of amphetamine or methamphetamine induces dynamic alterations in c-fos, zif/268 and preprodynorphin messenger rna expression in rat forebrain*. Neuroscience **68**: 83-95.
- Watanabe Y, Stone E, McEwen BS (1994). *Induction and habituation of c-fos and zif/268 by acute and repeated stressors*. Neuroreport **5**: 1321-1324.
- Watts AG (2005). *Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine crh neurons: A complexity beyond negative feedback*. Front Neuroendocrinol **26**: 109-130.
- Weiss JM (1972). *Psychological factors in stress and disease*. Sci Am **226**: 104-113.
- Wilens TE (2008). *Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder*. J Clin Psychopharmacol **28**: S46-53.
- Williams (2008). *Textbook of endocrinology, 8 ed*. Wilson and Foster. Saunders and Imprint of Elsevier Company.

- Winstanley CA, Olausson P, Taylor JR, Jentsch JD (2010). *Insight into the relationship between impulsivity and substance abuse from studies using animal models*. *Alcohol Clin Exp Res* 34: 1306-1318.
- Wise RA (2008). *Dopamine and reward: The anhedonia hypothesis 30 years on*. *Neurotox Res* 14: 169-183.
- Wittkowski W, Bockmann J, Kreutz MR, Bockers TM (1999). *Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary*. *Int Rev Cytol* 185: 157-194.
- Woods KA, Buechi KA, Illig AM, Badura LL (1998). *Norepinephrine content in the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a function of photoperiod and dopaminergic tone*. *Endocrine* 8: 79-83.
- Yano M, Steiner H (2005). *Topography of methylphenidate (ritalin)-induced gene regulation in the striatum: Differential effects on c-fos, substance p and opioid peptides*. *Neuropsychopharmacology* 30: 901-915.
- Yano M, Steiner H (2007). *Methylphenidate and cocaine: The same effects on gene regulation?* *Trends Pharmacol Sci* 28: 588-596.
- Zangenehpour S, Chaudhuri A (2002). *Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps*. *Mol Brain Res* 109: 221-225.
- Zhang J, Niu X (1994). *Changes of monoamines, purines and amino acids in rat striatum as measured by intercerebral microdialysis during ischemia/reperfusion*. *Chin Med Sci J* 9: 225-229.
- Zhang YC, Zhu XQ, Zhang XH (2017). *[effect of methylphenidate on c-fos expression in parvalbumin interneurons of juvenile rat frontal cortex]*. *Sheng Li Xue Bao* 69: 378-384.
- Ziegler DR, Cass WA, Herman JP (1999). *Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress*. *J Neuroendocrinol* 11: 361-369.
- Ziegler DR, Herman JP (2002). *Neurocircuitry of stress integration: Anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat*. *Integr Comp Biol* 42: 541-551.
- Zorrilla EP, Koob GF (2004). *The therapeutic potential of crf1 antagonists for anxiety*. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 799-828.
- Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF (2014). *Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction*. *Front Neuroendocrinol* 35: 234-244.

