



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Estrés crónico controlable durante la adolescencia.

Impacto sobre la respuesta endocrina, conductual y el sistema nervioso central

Jesús Úbeda-Contreras Gallego de la Sacristana

Institut de Neurociències

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Unidad de Fisiología Animal

DIRECTORES

Antonio Armario García

Roser Nadal i Alemany

Institut de Neurociències

Institut de Neurociències

Departamento de Biología Celular,
Fisiología e Inmunología

Departamento de Psicobiología y
Metodología de las Ciencias de la
Salud

Unidad de Fisiología Animal

Unidad de Psicobiología

Facultad de Biociencias

Facultad de Psicología

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral nuestro laboratorio ha recibido las siguientes becas y ayudas:

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

SAF2014-53876-R

SAF2017-017-83430-R

RTC-2015-3898-1

Generalitat de Catalunya:

SGR2009-16

GR2014-1020

SGR2017-457

ICREA-ACADEMIA (2015-2019) otorgada a Roser Nadal Alemany

Otras ayudas:

RD12/0028/0014, Red de Trastornos Adictivos, RETICS, Instituto de Salud Carlos III

CIBER en Salud Mental, CIBERSAM, Instituto de Salud Carlos III

2011/021, Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Consumo y bienestar Social

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral (Diciembre 2015-Diciembre 2019), el doctorando Jesús Úbeda-Contreras Gallego de la Sacristana estuvo contratado a través de una beca para la Formación de Personal Investigador (FPI: BES-2015-071464), beca otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad.

-Vamos, Torrou, ¿qué es lo que impulsa a usted a ocuparse de esto?

-No sé. Mi moral, probablemente.

-¿Cuál?

-La comprensión.

Albert Camus.

Resumen

Si bien la exposición a estrés puede tener consecuencias negativas, factores como la edad o el tipo de situación estresante pueden modular su impacto. Las edades tempranas, incluyendo la adolescencia, con un sistema nervioso aún en desarrollo, son especialmente sensibles al estrés. Durante la adolescencia cambia el sistema dopaminérgico y sus relaciones funcionales con la corteza prefrontal medial (mPFC) y el estriado, áreas claves en la detección de la posibilidad de control sobre situaciones de estrés y sus consecuencias. En animales adultos, la posibilidad de ejercer control en situaciones de estrés reduce su impacto negativo y protege frente a futuras exposiciones. Sin embargo, la influencia de la controlabilidad en las consecuencias de la exposición a estrés durante la adolescencia ha sido poco estudiada.

En la presente tesis estudiamos el impacto diferencial de la controlabilidad en ratas macho *Sprague-Dawley* expuestas a estrés crónico entre los días 27 y 48 (etapa prepuberal y pospuberal). Los animales se asignaron a tres grupos: (i) estrés controlable (CST), que podían evitar/escapar de choques eléctricos en una tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA) en una caja lanzadera; (ii) estrés incontrolable (UST), expuestos al mismo tiempo de choque que el CST, pero sin que su conducta pudiese prevenir la aparición del choque; y (iii) sin estrés (NS), expuestos a la caja lanzadera sin recibir choques eléctricos. Se realizaron 8 sesiones distribuidas de forma irregular.

En los grupos CST y UST se observó un incremento similar respecto al grupo NS de los niveles de corticosterona en pelo, un indicador de la cantidad total de corticosterona liberada durante el periodo de estrés. Sin embargo, la sensibilización a corto plazo de la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) a nuevos estímulos estresantes fue más evidente en el grupo UST que en el CST, como lo fue el impacto negativo sobre la interacción social. En ambos grupos de estrés se incrementó de igual forma las estrategias de afrontamiento activo en la prueba de natación forzada (FST). Estos cambios en conducta no se reflejaron en el patrón general de activación del sistema nervioso central en respuesta a la FST, valorado mediante la expresión de *c-fos*, pero sí en el patrón de activación de las dos poblaciones neuronales principales del estriado, observándose un mayor nivel de activación de la población neuronal que expresan el receptor de dopamina D1 en los dos grupos de estrés respecto al NS. Además, la controlabilidad alteró el impacto

de los antagonistas selectivos D1 o D2, incrementándolos en los UST y reduciéndolos en los CST. Finalmente, estudiamos si el estrés adolescente había afectado de forma diferencial a la expresión basal de dos genes de expresión temprana: Δ FosB, un marcador de activación crónica y *Arc*, un marcador de plasticidad sináptica. Respecto al primero solo se observó un incremento en el lateral septum, similar en ambos grupos de estrés, en tanto que se observó un descenso de *Arc* en la mPFC y en el estriado, que fue más evidente en mPFC en el grupo CST.

Dado que los datos anteriores indicaban que el impacto de la exposición a choques y la controlabilidad eran moderados, decidimos estudiar los efectos en la cepa de rata *Long-Evans*, que son más sensibles al condicionamiento del miedo asociado a choques eléctricos. Las ratas *Long-Evans* mostraron más dificultades para aprender la tarea TWAA, una sorprendente mayor activación del eje HPA en el grupo CST respecto al UST durante la tarea, niveles muy elevados de condicionamiento del miedo a largo plazo y signos de anhedonia (valorada por el consumo de sacarina), pero fueron menos sensibles al estrés en otros aspectos, demostrando la importancia de las diferencias individuales.

Abstract

Although being exposed to stress may have negative consequences, there are some factors that could modulate them, as the age of the individual or the characteristics of the stressor. Early ages, including adolescence, when the nervous system is in development, are especially sensitive to stress exposure. During adolescence substantial changes take place in the dopaminergic system as well as in the functional connection between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the striatum, which are key areas in the detection the availability of control over stressful situations. In adult animals, being able to control a stressor blunts its negative consequences and protects towards new exposures. However, the influence of controllability in the consequences of exposure to stress during adolescence has been poorly studied.

In the present work, male *Sprague-Dawley* rats were exposed to chronic stress from day 27 to 48 (pre- and post- adolescence), in order to study the mediation of control. Animals were assigned to three groups: (i) controllable stress group (CST), which could avoid/escape footshocks in a two-way active avoidance task in a shuttle-box (TWAA); (ii) uncontrollable stress group (UST), which received the same amount of shock as CST, but without contingency between their behaviour and the shock appearance and (iii) no-stress group (NS), exposed to the shuttle-box without receiving footshocks. They were exposed to 8 sessions irregularly distributed.

Hair corticosterone, which is an indicator of total corticosterone released during the period of stress exposure, was equally elevated in the CST and UST groups compared to the NS group. However, hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) short-term sensitization to new stressors was evident in UST but not in the CST group, as were the negative consequences over social interaction. Both groups exposed to stress increased active coping strategies in the forced swimming test (FST). These behavioural changes were not reflected in the general activation pattern of the central nervous system in response to FST, which was assessed by analysis of *c-fos* expression. Nevertheless, the neuronal population expressing D1 dopamine receptor in the medial striatum was more activated in the stressed groups than in the NS. In addition, controllability altered the effects of selective dopamine antagonists D1 or D2, which were increased in the UST group and reduced in the CST. Finally, we analysed the basal expression of two immediate early genes: Δ FosB, a stress

chronic activation marker, and *Arc*, a synaptic plasticity marker. The former was only increased in the lateral septum by stress without differences due to controllability, whereas the latter was reduced in the mPFC and the striatum, being more evident in the CST than in the UST group in the mPFC.

Because the abovementioned data suggested that the effects of footshocks and controllability were moderated, we decided to study this paradigm in *Long-Evans* rats, which are more susceptible to fear conditioning associated to footshocks. They had more difficulties to learn the TWAA than *Sprague-Dawley*, a greater HPA axis activation in the CST than in the UST group during the task, high levels of fear conditioning at the long-term and anhedonia (evaluated by saccharine consumption). However, they were less sensitive to stress in other aspects, remarking the relevance of individual differences.

Índice

Abreviaturas.....	15
Introducción.....	19
1. El concepto de estrés.....	20
2. Respuesta de estrés.....	24
2.1. El eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal.....	26
2.2. El primer mediador.....	29
2.3. La exposición crónica a estrés.....	35
3. El sistema dopaminérgico.....	37
3.1. Sistema dopaminérgico y estrés.....	41
3.2. Desarrollo, dopamina y estrés.....	44
4. Controlabilidad.....	46
4.1. Controlabilidad, indefensión aprendida y evitación activa.....	46
4.2. Controlabilidad, eje HPA y procesamiento.....	53
4.3. Controlabilidad y sus implicaciones funcionales en humanos.....	56
5. La adolescencia.....	58
5.1. Pubertad, cambios neuroendocrinos y del eje HPA.....	59
5.2. Adolescencia y SNC.....	63
5.3. Adolescencia y cambios conductuales.....	66
6. Modelos de estrés adolescente.....	70
6.1. Controlabilidad durante la adolescencia.....	71
6.2. Modelos de estrés repetido.....	72
6.3. Estrés crónico impredecible.....	74
6.4. Estrés social.....	77
6.5. Conclusiones generales de los modelos de estrés adolescente.....	82
Hipótesis y objetivos.....	83
Material y Métodos.....	85
1. Sujetos y procedimientos generales.....	86

2.	Métodos de grabación y análisis de las pruebas conductuales.....	87
3.	Tarea de evitación activa en dos sentidos.....	87
4.	Pruebas conductuales.....	90
4.1.	Nado forzado (FST).....	90
4.2.	Campo Abierto (OF).....	91
4.3.	Interacción Social (IS).....	91
4.4.	Hiponeofagia Alimentaria.....	92
4.5.	Consumo de sacarina.....	93
5.	Fármacos.....	94
6.	Toma de muestras.....	94
6.1.	Sangre.....	94
6.2.	Pelo.....	95
6.3.	Encéfalo.....	96
7.	Análisis bioquímico.....	97
7.1.	Radioinmunoanálisis (RIA).....	97
7.2.	Valoración enzimática de la glucemia.....	98
7.3.	Hibridación <i>in situ</i> (ISH).....	98
7.4.	Inmunohistoquímica (IHC).....	102
7.5.	Captura y análisis de imágenes.....	103
7.6.	Áreas estudiadas.....	104
8.	Análisis estadístico.....	106
	Resultados	109
	Experimento 1. Consecuencias endocrinas, conductuales y sobre el SNC de la exposición a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia.....	110
1.	Planteamientos y objetivos.....	110
2.	Diseño experimental.....	111
3.	Resultados.....	112
3.1.	Caja lanzadera y TWAA.....	112
3.2.	Consecuencias endocrinas a corto plazo.....	116

3.3.	Consecuencias conductuales a corto plazo.....	117
3.4.	Activación del SNC durante el período de estrés adolescente: Δ FosB 122	
3.5.	Actividad constitutiva de Arc en la mPFC y el estriado.....	125
3.6.	Expresión de Arc en la mPFC y el estriado en respuesta a un estímulo heterotípico.....	128
3.7.	Expresión de <i>c-fos</i> en el SNC en respuesta a un estímulo heterotípico 131	
4.	Conclusiones.....	137
Experimento 2: Consecuencias endocrinas, conductuales y sobre el sistema dopaminérgico de la exposición a estrés controlable/ incontrolable durante la adolescencia		
		139
1.	Planteamientos y objetivos	139
2.	Diseño experimental.....	139
3.	Resultados	141
3.1.	Caja lanzadera y TWAA: Segunda cohorte.....	141
3.2.	Consecuencias endocrinas de la exposición a estrés adolescente ..	145
3.3.	Efectos sobre la conducta de interacción social a corto plazo.....	147
3.4.	Conducta exploratoria en la prueba de hiponeofagia a largo plazo	149
3.5.	Efectos de la administración de antagonistas dopaminérgicos sobre la respuesta a FST	151
4.	Conclusiones.....	161
Experimento 3: Consecuencias endocrinas y conductuales de la exposición a estrés controlable/ incontrolable durante la adolescencia en animales de la cepa <i>Long-Evans</i>		
		163
1.	Planteamientos y objetivos	163
2.	Diseño experimental.....	163
3.	Resultados estrés controlable/ incontrolable en <i>Long-Evans</i>	164
3.1.	Caja lanzadera y TWAA.....	164
3.2.	Respuesta hormonal a la caja lanzadera	168

3.3.	Impacto sobre el peso	170
3.4.	Consecuencias sobre la actividad de eje HPA (respuesta de corticosterona)	171
3.5.	Consecuencias conductuales (conducta exploratoria, la interacción social, las estrategias de afrontamiento y la anhedonia).....	172
3.6.	TWAA a largo plazo	178
4.	Conclusiones.....	183
Discusión		185
1.	Caja lanzadera y TWAA (Experimentos 1 y 2).....	186
2.	Consecuencias de la exposición a estrés controlable/incontrolable (Experimentos 1 y 2).....	188
2.1.	Consecuencias endocrinas	188
2.2.	Consecuencias conductuales.....	192
2.3.	Consecuencias sobre el SNC.....	197
2.4.	Administración de antagonistas dopaminérgicos.....	205
3.	Estrés adolescente controlable/ incontrolable en ratas de la cepa <i>Long-Evans</i> (Experimento 3)	210
3.1.	Caja lanzadera y la TWAA.....	210
3.2.	Consecuencias endocrinas	212
3.3.	Consecuencias conductuales.....	214
4.	Conclusiones e Implicaciones teóricas y clínicas.....	218
4.1.	Conclusiones.....	218
4.2.	Implicaciones teóricas.....	220
Conclusiones		225
Referencias		229

Abreviaturas

ACTH: corticotropina.

Anta-D1: Antagonista D1.

Anta-D2: Antagonista D2.

AVP: angionina-vasopresina.

BLA: amígdala basolateral.

BNST: núcleo del lecho de la estría terminal.

CeA: amígdala central.

Cg1: subdivisión cingulada de la mPFC.

CISH: ISH cromógena.

CPP: preferencia de lugar condicionada.

CR: respuesta condicionada.

CRH: hormona liberadora de corticotropina.

CS: estímulo condicionado.

CST: estrés controlable.

CUS: estrés crónico impredecible.

DA: dopamina.

dFISH: ISH fluorescente doble.

DMH: hipotálamo dorsal-medial.

DR: núcleo del rafe dorsal.

dSUB: subículum dorsal.

FH: formación hipocampal.

FS: choque eléctrico en las patas.

FST: prueba de natación forzada.

GC: glucocorticoides.

GEE: modelo de ecuaciones estructurales generalizadas.

GR: receptor glucocorticoide.

GzLM: modelo lineal generalizado.

HPA: hipotálamo-pituitaria-adrenal.

HPG: hipotálamo-pituitario-gonadal.

IEG: gen de expresión temprana.

IHC: inmunohistoquímica.

IL: subdivisión infralímbica de la mPFC.

IMO: inmovilización sobre tabla.

IS: interacción social.

ISH: hibridación *in situ*.

ITI: tiempo entre ensayos.

LC: *locus coeruleus*.

LS: *septum lateral*.

MeA: amígdala medial.

mPFC: corteza prefrontal medial.

MR: receptor mineralocorticoide.

MSN: *medium spiny neurons*.

NAc: núcleo *accumbens*.

NAcC: *NAc core*.

NAcSh: *NAc shell*.

NS: sin exposición a estrés.

NTS: núcleo del tracto solitario.

OF: campo abierto.

OXT: oxitocina.

PAG: sustancia gris periacueductal.

PND: día postnatal.

POAm: área preóptica medial.

POMC: pro-omelanocortina.

PrL: subdivisión prelímbica de la mPFC.

PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo.

PVNdc: subdivisión *dorsal cap* del PVN.

PVNm: subdivisión magnocelular del PVN.

PVNmp: subdivisión medial parvocelular del PVN.

PVNmpd: subdivisión parvocelular dorsal-medial del PVN.

PVNmpv: subdivisión parvocelular medial-ventral del PVN

PVNsm: subdivisión submagnocelular del PVN.

PVT: núcleo paraventricular del tálamo.

RIA: radioinmunoanálisis.

SGA: Síndrome general de adaptación.

SMA: Simpático-médulo-adrenal.

SN: substancia *nigra*.

SNC: Sistema nervioso central.

SNc: SN *pars compacta*.

SNr: SN *pars reticulate*.

TM: toma de muestra sanguínea.

TWAA: tarea de evitación activa en dos sentidos.

UR: respuesta incondicionada.

US: estímulo incondicionado.

UST: estrés incontrolable.

VEH: vehículo.

vSUB: subículum ventral.

VTA: área tegmental ventral.

Introducción

1. El concepto de estrés

Según la RAE, el término estrés se define como: tensión provocada por situaciones agobiantes que originan reacciones psicósomáticas o trastornos psicológicos a veces graves. Este término se ha popularizado en los últimos años, hasta el punto de que si realizamos una simple revisión en la sección de noticias de un buscador popular como Google encontramos más de 7.000.000 de publicaciones en castellano relacionadas con estrés, a pesar de que este término no aparece con su significado actual hasta la primera mitad del siglo XX. Su aparición y posterior desarrollo se debe principalmente a las figuras de Walter B. Cannon y Hans Selye.

Cannon acuñó el término homeostasis para definir el esfuerzo del organismo por mantener dentro de unos parámetros aceptables distintas variables fisiológicas como el pH, la temperatura corporal o los niveles de glucosa. Cuando un estímulo (v.g. exposición a bajas temperaturas o una hemorragia) altera estas variables, aparecen una serie de cambios fisiológicos destinados a recuperar el equilibrio homeostático. Estos cambios también pueden aparecer como respuesta anticipatoria en presencia de una amenaza psicosocial, la cual desencadena la respuesta de lucha o huida, que incluye cambios endocrinos y conductuales preventivos. Cannon demostró la relevancia del sistema nervioso simpático (eje simpático-médulo-adrenal; SMA) en la regulación de la homeostasis. La activación del eje SMA acaba en la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al torrente sanguíneo, las cuales inducirían cambios (v.g. incremento del ritmo cardíaco y de la presión arterial) necesarios para restituir el equilibrio homeostático o como respuesta anticipatoria frente una posible actividad física o daño (McEwen 2000; Armario 2006a; Goldstein y Kopin 2007).

Selye describió el síndrome general de adaptación (SGA) y definió el concepto de estrés tal y como lo conocemos actualmente. El SGA aparece debido a “un esfuerzo del organismo por adaptarse a nuevas condiciones (estresantes)” (Selye 1936). Tal y como Selye definió este síndrome en 1936, constaría de tres estadios: alarma, resistencia y agotamiento. Durante la fase de alarma se dan una serie de respuestas de emergencia para afrontar una situación crítica para el organismo (v.g. descarga hormonal por parte de las glándulas adrenales o hipoglucemia). Si la situación se mantiene la respuesta se puede estabilizar sin afectar drásticamente al funcionamiento de los órganos. Sin embargo, si la situación perdura en el tiempo, el sistema no puede mantener la situación y se

entra en la fase de agotamiento. Para nominar a esta respuesta del organismo, Selye tomó prestado del campo de la física el término inglés “*stress*”, que hace referencia a “la presión o tensión ejercida sobre un material” y creó el término “*stressor*”, sin equivalente en castellano por lo que hablaremos de estímulo estresante, para nominar al agente nocivo. Para Selye estrés es “la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda sobre él”. Selye destaca como principal responsable de la respuesta al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) que provoca la liberación de glucocorticoides, a diferencia de Cannon que señaló el eje SMA y las catecolaminas, aunque ambos sistemas convergen en la glándula adrenal. Una diferencia notable es que Selye se centró en la exposición a estímulos crónicos, mientras que Cannon lo hizo en exposiciones agudas (Levine 2005). Ambos autores abrieron la puerta al estudio del estrés, pero los conceptos y teorías elaboradas por ambos investigadores han sido modificados con el paso del tiempo.

El término homeostasis resulta limitado para explicar el funcionamiento de un sistema fisiológico completo. El concepto de equilibrio homeostático es demasiado rígido y estático para explicar muchos cambios fisiológicos, por lo que Sterling y Eyer (1988) desarrollaron el concepto de “alostasis”, que se define como “estabilidad a través del cambio”. La alostasis no fija un punto de equilibrio inalterable para las variables reguladas como en el caso de la homeostasis, sino que desplaza ese punto en función de las demandas ambientales. Sin embargo, si las demandas ambientales exigen cambios que desafían el rango de variación de la respuesta o si las demandas perduran mucho en el tiempo, el organismo acusa el esfuerzo que el ambiente exige para sobrevivir, dando lugar a la “carga alostática” (McEwen y Stellar 1993). Este concepto se define como la tensión provocada por la exposición a estímulos estresantes que desafían la elasticidad de la respuesta alostática o exigen mantenerla durante un período de tiempo demasiado prolongado.

Otra de las asunciones iniciales de la teoría de Selye (1950) es que: “el patrón básico de activación siempre es el mismo, independientemente del agente que produce el estrés”. Selye (1950) asume que hay diferencias en la respuesta a diferentes estímulos estresantes, pero que, si restas los componentes específicos de la respuesta a cada estímulo, queda una respuesta común para todos ellos. Esta idea dio lugar a voces discordantes en el campo del estrés. De hecho, Mason (1971) consideraba que el “primer mediador” de la respuesta de estrés era la reacción emocional a la situación estresante. Observó, en una serie

de estudios con monos, que suprimiendo el componente psicológico de la exposición a ayuno o calor se bloqueaba el incremento de los niveles de 17-hidroxycorticosteroide (marcador indirecto de los niveles de glucocorticoides) en orina que se observaba cuando el componente psicológico no estaba suprimido, resaltando la importancia del procesamiento psicológico en la respuesta del eje HPA. Con estos datos Mason limitó la respuesta endocrina al componente emocional de la exposición a estrés, aunque sus datos pueden interpretarse desde otros ángulos (ver Marti y Armario 1998) y existen numerosas pruebas de la activación de la respuesta de estrés en condiciones (v.g. respuesta quirúrgica bajo anestesia general) en la que no se da el componente emocional (Dallman y Jones 1973; Bereiter et al. 1988). Otro enfoque para estudiar la especificidad ha sido estudiar el patrón de respuesta neuroendocrina (Pacák et al. 1998) y de activación del encéfalo (Pacák y Palkovits 2001) a diferentes estímulos estresantes (principalmente sistémicos). Estos investigadores llegaron a la conclusión de que la inespecificidad tal como la defendía Selye no era demostrable experimentalmente, pero que el patrón de respuesta a estímulos estresantes de distinta naturaleza era heterogéneo. Lo que les llevo a deducir que la respuesta de estrés, a pesar de tener elementos comunes, no es enteramente inespecífica. En la actualidad, se considera que hay una respuesta común inespecífica y una respuesta específica al estímulo estresante (Armario 2006a).

Volviendo a los aspectos psicológicos, ha habido un gran interés por aspectos cualitativos del estrés, como la predictibilidad y el control. Weiss (1972) observó que ratas expuestas a la misma cantidad de choque eléctrico, pero con la posibilidad de predecir su aparición y/o evitar/escapar de él desarrollaban lesiones gástricas considerablemente menos extensas que las que no tenían estas posibilidades, destacando así la importancia de la predictibilidad y de la controlabilidad. Ambos factores son determinantes en el proceso de evaluación de la capacidad de afrontar la situación estresante. Para Richard Lazarus (1993) esta evaluación resulta clave para dilucidar la capacidad de un individuo de afrontar la situación. Si la evaluación cognitiva indica que se puede afrontar con éxito dicha situación, se utilizará un estilo de afrontamiento “centrado en el problema”, que tendrá como objetivo eliminar el estímulo nocivo, mientras que si se valora como incontrolable se cambiará a un estilo de afrontamiento “centrado en la emoción”, con el objetivo de modificar la evaluación del estímulo para reducir el malestar generado por

éste. Aunque el estilo de afrontamiento pueda depender en parte del contexto como plantea Lazarus; Koolhaas y colaboradores (1999), consideraron que el estilo viene determinado por un rasgo de personalidad estable en el tiempo, independiente de la situación. Identificaron, en animales, dos estilos de afrontamiento: proactivo (activo) y reactivo (pasivo), ligados a un fenotipo conductual y endocrino. A nivel conductual observaron, entre otros aspectos, que los animales proactivos tenían una latencia de ataque más corta a un macho de la misma especie, realizaban mejor las conductas de evitación activa, y tenían menos flexibilidad cognitiva que los reactivos (Koolhaas et al. 1999). A nivel endocrino vieron que los animales con una estrategia de afrontamiento proactiva mostraban menos reactividad del eje HPA y del sistema parasimpático, pero más reactividad del simpático y niveles mayores de testosterona basal que los reactivos (Koolhaas et al. 1999). En conjunto, las consecuencias de la exposición a estrés pueden diferir en función de la evaluación cognitiva de la situación estresante y del estilo de afrontamiento utilizado (ya sea resultante de la evaluación momentánea o del estilo de afrontamiento ligado a la personalidad del sujeto). Además de las diferencias en la respuesta aguda a estímulos estresantes, los rasgos de personalidad y la experiencia previa con situaciones estresantes, sobre todo controlables y afrontables por el individuo, modifican las consecuencias de la exposición a estrés. En consecuencia, una historia previa de estrés, en las circunstancias adecuadas, puede promover la resiliencia y, por tanto, proteger frente al impacto negativo de la exposición a situaciones estresantes (Rutter 2013).

¿Qué entendemos actualmente por estrés? Quizás la actitud más cómoda, y tal vez más inteligente, sería la adoptada por Levine (2005) en su revisión histórica del estudio del estrés en la que renuncia a proponer una definición. En cualquier caso, ante la necesidad de utilizar un lenguaje común, consideramos necesario enmarcar lo que entendemos por “estrés”. En nuestro caso, sin desmerecer otras posibles definiciones, nos adscribimos a la propuesta por Vigas (1980), quien describe 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”**. Esta definición abarca tanto los estímulos reales (sistémicos o físicos) como los simbólicos (emocionales o psicológicos) y es compatible con la visión de Herman y Cullinan (1997) quienes clasifican los estímulos en estas dos grandes

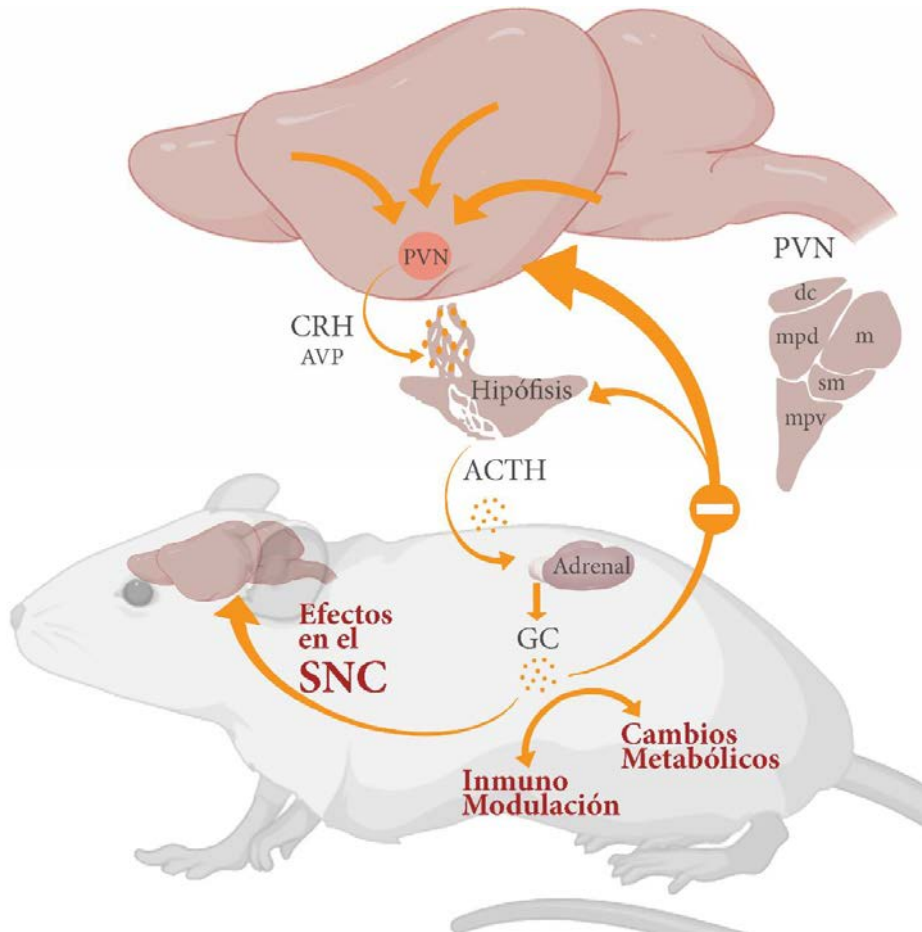
categorías en función del patrón de activación que evocan en el sistema nervioso central (SNC) (Herman y Cullinan 1997; Herman et al. 2003). Los estímulos sistémicos amenazan directamente la homeostasis (v.g. hemorragia, temperaturas extremas o procesos inflamatorios), mientras que los emocionales representan una amenaza potencial para el organismo, ya sea adquirida mediante condicionamiento a estímulos estresantes físicos, o por predisposición filogenética (v.g. olor de predador). Los estímulos estresantes típicamente utilizados en laboratorio pueden tener componentes de ambas categorías y ser considerados como estímulos estresantes mixtos. Por ejemplo, la inmovilización sobre tabla (IMO), con las extremidades ligadas con cinta a una plataforma, es principalmente un estímulo emocional, pero puede tener un pequeño componente sistémico debido a inflamación local en las extremidades (Armario 2006a; Armario et al. 2012). Otro ejemplo sería la prueba de nado forzado (FST) que implica ejercicio físico y si se realiza a temperaturas bajas puede generar hipotermia (Dal-Zotto et al. 2000). No obstante, si observamos el patrón de activación del SNC estos estímulos típicos de laboratorio son predominantemente emocionales (Armario 2006b).

2. Respuesta de estrés

Sin entrar demasiado en detalles, la activación del eje SMA acaba en la liberación de adrenalina, que daría lugar entre otros efectos a la glucogenólisis y a un incremento de la frecuencia cardíaca, y de noradrenalina, que, entre otros efectos, incrementaría la presión sanguínea. Aunque Cannon señaló como glándula efectora a la médula adrenal, en torno al 70 % de la noradrenalina liberada al torrente sanguíneo en respuesta a un estímulo estresante proviene de los terminales nerviosos simpáticos (Kvetnansky et al. 2009; Nostramo y Sabban 2015). El resto de la noradrenalina y prácticamente toda la adrenalina liberadas en respuesta a estímulos estresantes sí provienen de la médula adrenal. Ambas son liberadas en respuesta a estímulos estresantes emocionales como la IMO, pero ante estímulos sistémicos como la exposición a frío o hipoglucemia hay predominancia de la respuesta de una de las dos (v.g. noradrenalina en el primer caso y adrenalina en el segundo).

La activación del eje HPA (**figura 1**), empieza en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), en el que convergen señales excitadoras o inhibitoras procedentes de otras áreas del SNC (**figura 2**). La activación del eje HPA acaba en la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal. Los

glucocorticoides son claves para la movilización de energía, modulan la síntesis y la acción de otras hormonas e inhiben el sistema inmune (Aguilera 2012). En nuestro caso, nos centraremos en la descripción del eje HPA y solo se comentarán aspectos del eje SMA puntualmente.



La exposición a un estímulo estresante inducirá la activación de neuronas hipofisiotrópicas de la región medial dorsal parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVNmpd). Tras su activación, estas neuronas secretarán factores de liberación, como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP), al sistema portal hipofisario desde la eminencia media. Estas hormonas actuarán sobre la adenohipófisis promoviendo la secreción al sistema circulatorio de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez actuará sobre la corteza adrenal (zona fasciculada) induciendo la síntesis y liberación de glucocorticoides (corticosterona en rata y ratón; predominantemente cortisol en humanos y otros mamíferos). Los glucocorticoides circulantes tienen un gran número de efectos fisiológicos sobre otros sistemas (por ejemplo, sobre el metabolismo y la función inmune). Un efecto principal de los glucocorticoides es la de inhibir la propia actividad del eje HPA a través de mecanismos de retroinhibición, actuando sobre múltiples áreas como la adenohipófisis, el PVN y estructuras suprahipotalámicas. Abreviaturas: PVN=núcleo paraventricular del hipotálamo, dc=dorsal cap, mpd=medial dorsal parvocelular, m=magnocelular, sm=submagnocelular, mpv=medial ventral parvocelular.

2.1. El eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

El PVN puede dividirse en cuatro subdivisiones según su morfología y funcionalidad (Armario 2006a; Aguilera 2012): (1) magnocelular (PVNm), (2) dorsal *cap* (PVNdc), (3) medial parvocelular (PVNmp), que a su vez se subdivide en ventral (PVNmpv) y dorsal (PVNmpd), y (4) submagnocelular (PVNsm). El PVNm contiene neuronas productoras de oxitocina y vasopresina (arginina-vasopresina, AVP, en la mayoría de los mamíferos), que proyectan directamente a la neurohipófisis para liberar estos neuropéptidos a la circulación periférica. El PVNdc, PVNmpv y PVNsm contienen neuronas productoras de hormona liberadora de corticotropina (CRH) que proyectan al tronco del encéfalo y están implicadas en la regulación del sistema autonómico. Por último, el PVNmpd contiene neuronas parvocelulares que proyectan al sistema portal hipofisario donde liberan CRH y en menor medida AVP, y otros péptidos como angiotensina II, colecistoquinina u oxitocina (Antoni 1986; Swanson et al. 1987).

A través del sistema portal hipofisario, la CRH alcanza la adenohipófisis donde estimula a las células corticotropas que sintetizan, y liberan (a partir de la proteína precursora pro-opiomelanocortina; POMC) corticotropina u hormona adenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo (Armario 2006a). A pesar de que otros factores intervienen en la modulación de la liberación de ACTH, el principal estimulador de su síntesis y liberación sería la CRH. No obstante, también es remarcable el papel de la AVP, que actúa junto con la CRH, potenciando la liberación. Una vez en el torrente sanguíneo, la ACTH viaja hasta alcanzar la glándula adrenal, la cual está dividida en médula y corteza. Sobre esta última, actúa la ACTH mediante la unión a receptores de melanocortina tipo 2 de la zona fasciculada, en los que inicia una cascada de acciones que acaba en la liberación de glucocorticoides.

Los glucocorticoides liberados tras la exposición a un estímulo estresante cumplen dos funciones: preparatorias y moduladoras (Sapolsky et al. 2000). Las funciones preparatorias implican cambios previos a la exposición al estímulo estresante. Las funciones moduladoras participan en los cambios producidos por la exposición a un estímulo estresante y pueden ser: permisivas, inhibitorias y estimuladoras. Las acciones permisivas son realizadas por los glucocorticoides circulantes previos a la aparición de un

estímulo estresante, favorecen los mecanismos de defensa iniciales del organismo y se dan independientemente de si hay un pico posterior en la respuesta. Ejemplos de acciones permisivas serían el incremento del ritmo cardíaco o movilización de la energía. Las excitadoras están implicadas en la aparición de cambios funcionales mediados por los glucocorticoides liberados en respuesta al estímulo estresante que potencian las acciones permisivas. Las inhibitoras o supresoras implican procesos que se han puesto en marcha por la exposición y se ven inhibidos por la liberación continuada de los glucocorticoides, como la inhibición del propio eje.

CRH, AVP y sus receptores

La CRH es el miembro más destacado de una familia de neuropéptidos que incluye a las urocortinas 1, 2 y 3 y se activan a través de dos tipos de receptores: CRHR1 y CRHR2 (que tiene dos variantes: CRHR2 α y CRHR2 β) (Bale y Vale 2004). Aparte de su expresión en el PVN, la CRH se expresa en muchas otras áreas del SNC, como la corteza, la amígdala, la formación hipocampal (FH), el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el tálamo y el locus coeruleus, entre otros. El receptor CRHR1 se distribuye a lo largo del SNC en áreas claves en la regulación de la respuesta de estrés como la corteza prefrontal medial (mPFC), el septum lateral (LS), la amígdala, la FH y diferentes núcleos hipotalámicos (Aguilera 2012). La distribución del receptor CRHR2 α en el SNC está más restringida que la del CRHR1, expresándose principalmente en el LS, la amígdala, el BNST, el núcleo ventromedial del hipotálamo y el núcleo del rafe dorsal (DR). Por su parte, el receptor CRHR2 β no se expresa en células neuronales, sino en vasos sanguíneos, corazón, músculo esquelético y otros órganos.

En lo referente a la respuesta del eje, la CRH actúa en las células corticotropas a través del receptor CRHR1 para iniciar la síntesis y liberación de ACTH. Se considera clásicamente que el receptor CRHR1 estaría implicado en la activación del eje HPA en respuesta al estrés, mientras que el CRHR2 α estaría implicado en la reducción de dicha activación (Korosi y Baram 2008), aunque existen muchas pruebas experimentales de que esta simplificación no es cierta. Así, en el LS ventral (LSv) parece tener un papel estimulador de la respuesta del eje HPA (Anthony et al. 2014). No obstante, la CRH no limita sus funciones a la activación del eje HPA, sino que está implicada en la regulación de diferentes procesos asociados a la exposición al estrés (ver revisión en Henckens et al. 2016). En general la activación de receptores CRHR1 en la

mayoría de áreas tiene efectos ansiogénicos, aunque en otras tendría efectos ansiolíticos (v.g. *globus pallidus*) o varía en función de la intensidad del estímulo estresante o del historial previo de estrés pudiendo tener efectos ansiolíticos o ansiogénicos (v.g. amígdala central). El papel del receptor CRH2 α en la regulación de la conducta está menos estudiado, pero también podría tener efectos ansiogénicos y ansiolíticos según el área. Asimismo, la liberación de CRH en la FH podría potenciar la formación de recuerdos especialmente los relacionados con la memoria de miedo. En conjunto los datos indican que el papel de la CRH y sus receptores en la regulación conductual y cognitiva es complejo, y depende del área y el fenotipo celular en el que se expresa el receptor.

La AVP es secretada principalmente por neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y el PVNm. Las del supraóptico proyectan a la neurohipófisis y se encargan de la regulación osmótica, pero las del PVN lo hacen a otras zonas del SNC (Engelmann et al. 2004). Además, hay neuronas AVP+ en otras áreas del SNC (v.g. BNST y amígdala). En menor medida, se expresa en las neuronas parvocelulares del PVNmpd que proyectan a la adenohipófisis, facilitando la acción de la CRH en la liberación de ACTH. Cuando la exposición a estrés se cronifica, el número de neuronas que coexpresan CRH y AVP se incrementa (de Goeij et al. 1992), sin que haya un incremento similar de las neuronas que expresan CRH, lo que sugiere un papel de la AVP en la regulación de la respuesta del eje HPA en situaciones de estrés crónico (Aguilera 2012). La AVP se une a tres tipos de receptores: V1a, V1b y V2. En el SNC encontramos receptores de AVP, V1a y V1b, en el sistema límbico y en áreas hipotalámicas. El V1a está más ampliamente distribuido que el V1b, aunque este último es el que se expresa en las células corticotropas de la adenohipófisis. El receptor V2 se expresa en el riñón, sin que haya evidencias de su presencia en el SNC.

MR y GR

Los glucocorticoides se unen a dos tipos de receptores citoplasmáticos: mineralocorticoide (MR) y glucocorticoide (GR) (Reul y de Kloet 1985; de Kloet et al. 1998; De Kloet 2013). La afinidad de los glucocorticoides por los receptores MR es diez veces superior a su afinidad por los GR, por lo que en condiciones basales los glucocorticoides ocupan principalmente los receptores MR, mientras que los GR son ocupados durante el período de oscuridad (período activo en roedores de laboratorio) y en situaciones de estrés agudo. Los GR se encuentran ampliamente distribuidos por todo el SNC, incluyendo

zonas importantes en el procesamiento de las situaciones estresantes (v.g.: mPFC, FH, amígdala, LS, BNST, y PVN). Los MR se expresan sobre todo en la FH y en menor medida en la mPFC y la amígdala. Cuando los glucocorticoides se unen a estos receptores, se trasladan al núcleo de la célula donde se unen a diferentes promotores que, según si expresan elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) o GRE negativos, activarán o inhibirán la transcripción, respectivamente (Cain y Cidlowski 2015). No obstante, las acciones rápidas de los glucocorticoides parecen estar mediadas por receptores extracelulares de membrana acoplados a proteína G, excitadoras o inhibitoras (en función de la proteína G asociada) (ver revisión en Tasker et al. 2006).

Retroinhibición del eje HPA

La actividad del eje HPA viene regulada por mecanismos de retroinhibición de dos tipos en función de su patrón temporal: rápido y lento (Keller-Wood y Dallman 1984; Armario 2006a). El mecanismo rápido es inmediato y depende de la tasa de incremento de los niveles de glucocorticoides en sangre, mientras que el lento se inicia al menos una hora después de la liberación y su acción depende de los niveles de glucocorticoides circulantes en las horas precedentes. El mecanismo rápido no puede venir mediado por la acción genómica de los glucocorticoides. Aunque no está del todo claro el mecanismo de acción, una de las opciones es la reducción de señales glutamatérgicas al PVNmpd a través de la liberación de endocannabinoides y otra la potenciación de la inervación GABAérgica a través del óxido nítrico (Di et al. 2003; 2009; Evanson et al. 2010). El mecanismo lento viene mediado por mecanismos genómicos iniciados por la unión de glucocorticoides a los receptores MR y GR e incluyen el bloqueo de la transcripción de los genes de CRH, AVP y POMC, que inhibiría la activación del eje (Watts 2005).

2.2. El primer mediador

La activación del eje HPA se inicia en el PVN, pero la procedencia de las señales hacia el PVN varía según la naturaleza del estímulo estresante (Pacák y Palkovits 2001; Kovács et al. 2005). Los estímulos estresantes sistémicos provocan alteraciones homeostáticas que son detectadas por áreas que proyectan directamente al PVN. Estas áreas están situadas principalmente en el tronco encefálico, el hipotálamo y las áreas circunventriculares. En el caso de los estímulos estresantes emocionales que disparan mecanismos anticipatorios, la activación es consecuencia de señales provenientes de áreas

del sistema límbico que carecen de conexiones directas con el PVN, por lo que la respuesta de estrés es modulada a través de áreas intermedias, muchas de las cuales están ejerciendo una inhibición tónica del PVN (Herman et al. 2003; 2016; Ulrich-Lai y Herman 2009). Por este motivo, mientras que el patrón de activación del SNC en respuesta a estímulos estresantes sistémicos es bastante restringido y dependiente de cada estímulo, los estímulos estresantes emocionales, y también los mixtos, provocan una activación generalizada del SNC (Dayas et al. 2001; Kovaks et al. 2005; Armario 2006b).

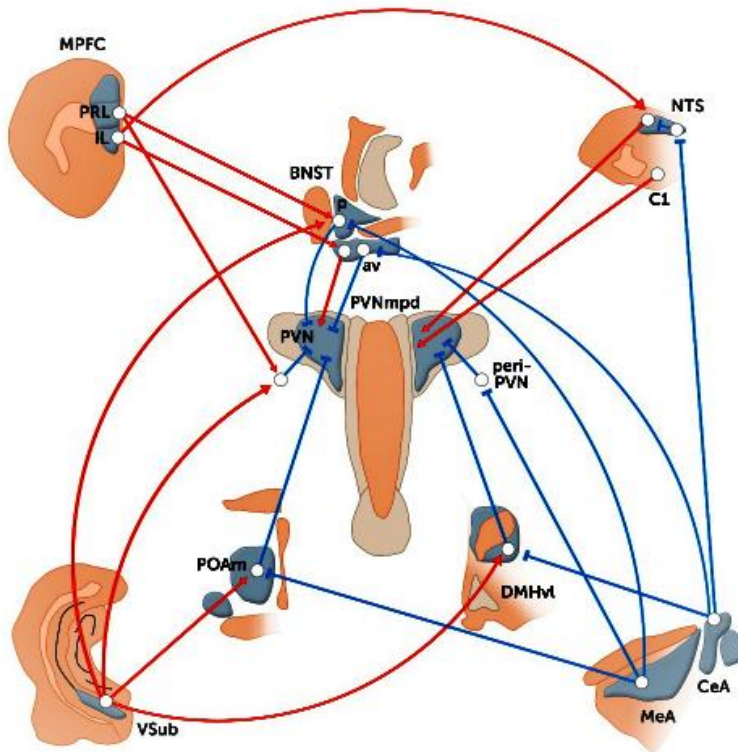


Fig. 2. Vías límbicas de integración del estrés desde la corteza prefrontal medial (mPFC), la amígdala y el hipocampo

La mPFC proyecta desde neuronas de la corteza prelímbica (PrL) e infralímbica (IL), que tienen diferentes acciones sobre la respuesta del eje HPA al estrés. La PrL envía proyecciones excitatorias (líneas rojas) a regiones como la zona peri-PVN (peri-núcleo paraventricular del hipotálamo) y subdivisión posterior (p) del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), las cuales envían proyecciones GABAérgicas (líneas azules) directas hacia la subdivisión medial parvo-celular dorsal del PVN (PVNmpd). En cambio, la IL proyecta a estructuras como el núcleo del tracto solitario (NTS) y la subdivisión anterior-ventral (av) del BNST, desde donde se enviarán proyecciones excitatorias hacia el PVNmpd, implicando una vía de estimulación del PVNmpd desde esta región cortical. La formación hipocámpal envía proyecciones excitatorias a través del subículo ventral (vSUB) a numerosas regiones subcorticales, como el BNSTp, la zona peri-PVN, el área preóptica medial (mPOA) y la región ventrolateral del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMHvl), todos ellos de proyección GABAérgica hacia el PVNmpd. El núcleo de la amígdala medial (MeA) envía sinápsis inhibitorias a estructuras de proyección GABAérgica hacia el PVNmpd, como el BNSTp, el mPOA o la zona peri-PVN, provocando una desinhibición transináptica. De forma similar, el núcleo central de la amígdala (CeA) envía proyecciones GABAérgicas al BNSTav y, en menor medida, al DMHvl. Neuronas GABAérgicas de la CeA también proyectan sobre interneuronas GABAérgicas del NTS, permitiendo que la CeA pueda desinhibir las aferencias desde este núcleo al PVNmpd. (Adaptado de Herman et al. 2016).

Entre los núcleos más relevantes del tronco encefálico respecto a la respuesta de estrés están el núcleo del tracto solitario (NTS), los núcleos del rafe, la sustancia gris periacueductal (PAG) y el locus coeruleus (Ulrich-Lai y Herman 2009; Myers et al. 2017). El NTS recibe información interoceptiva, visceral-sensorial y proyecciones descendentes desde el sistema límbico. Es clave en la respuesta a estímulos sistémicos como el malestar visceral, la hipovolemia o la hipoxia y participa en la respuesta a estímulos mixtos, como la IMO, y puramente emocionales, como los estímulos condicionados (Ulrich-Lai y Herman 2009; Myers et al. 2017). Este núcleo envía proyecciones catecolaminérgicas, especialmente noradrenérgicas, al PVN sobre el que ejercen un efecto excitador. Junto con la liberación de catecolaminas, estas neuronas liberan otros factores neuroactivos, como glutamato o neuropéptido Y, que actúan sinérgicamente con las catecolaminas en el PVN. El NTS envía también proyecciones desde neuronas no catecolaminérgicas que expresan GLP1 y actúan en el PVN de manera independiente.

Los núcleos del rafe envían proyecciones serotoninérgicas al PVN y áreas circundantes (Ulrich-Lai y Herman 2009; Myers et al. 2017). El efecto de estas proyecciones sobre el PVN es predominantemente excitador, pero puede variar según el núcleo del rafe implicado y el tipo de receptor serotoninérgico sobre el que actúan. La PAG está implicada en la regulación de muchas funciones vitales (v.g. respuestas del sistema nervioso autónomo) y en respuestas conductuales a estrés (v.g. respuesta de lucha o huida). Según la subdivisión de la PAG, esta puede incentivar conductas activas (v.g. huida por la PAG dorsal) o pasivas (v.g. petrificación por la PAG ventrolateral) para afrontar el estímulo estresante. Además de regular estas conductas, envía proyecciones, presumiblemente glutamatérgicas, al PVN para activar la respuesta del eje HPA. Por último, el locus coeruleus es la principal fuente de noradrenalina a la corteza y la FH, ejerciendo un papel central en la activación generalizada del SNC. Asimismo, envía proyecciones principalmente noradrenérgicas al PVN que favorecerían la activación del eje HPA en respuesta a estrés.

La información respecto a estímulos estresantes que implican privación alimentaria o desequilibrios en el balance hídrico y energético, provienen de los núcleos circunventriculares e hipotalámicos. Entre los núcleos circunventriculares implicados en la regulación de líquidos y electrolitos es especialmente relevante el órgano subfornical, el cual envía proyecciones

conteniendo angiotensina II directamente al PVN (Herman et al. 2005). Respecto al balance energético, la información llegaría al PVN principalmente a través del núcleo arqueado, sensible a los niveles de glucosa, leptina e insulina. Este núcleo envía proyecciones ricas en α -MSH (que inhibe la ingesta) y neuropéptido Y y AgRP (que estimulan la ingesta) al PVN (Begg y Woods 2013; Woods y Begg 2015).

El PVN recibe un gran número de proyecciones GABAérgicas (inhibidoras) que contactan con las neuronas parvocelulares que expresan CRH (Miklós y Kovács 2002). Estas proyecciones provienen de las áreas peri-PVN, el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), el hipotálamo anterior, el hipotálamo lateral, el área preóptica medial (mPOA) y el BNST (Cullinan et al. 1993; Roland y Sawchenko 1993). Estas áreas, que parecen ejercer una inhibición tónica sobre el PVN, reciben a su vez proyecciones de áreas como la mPFC, la amígdala, el LS y la FH, que no tienen proyecciones directas al PVN y, por lo tanto, modulan la respuesta del eje HPA a través de la activación o inhibición de las áreas mediadoras mencionadas (Cullinan et al. 2008; Myers et al. 2014). El DMH en concreto participa tanto en la respuesta cardiovascular a estímulos estresantes como en la modulación de la respuesta del eje HPA (DiMicco et al. 2002; Fontes et al. 2011). El DMH, además de proyecciones GABAérgicas, también tiene proyecciones glutamatérgicas (estimuladoras) sobre el PVN (Ziegler et al. 2002), por lo que según el balance entre ambos sistemas, el DMH podría no solo permitir la activación del eje HPA al liberarlo de la inhibición tónica, sino que además podría estimularlo directamente. Algo similar también ocurriría en la mPOA y el BNST, el cual tiene efectos activadores e inhibidores en función de la subdivisión activada (Choi et al. 2007).

La mPFC ha sido propuesta como uno de los centros de coordinación de la respuesta de estrés en humanos y roedores (McKlveen et al. 2015). En roedores, esta área se puede dividir de forma diferente según el criterio utilizado. Siguiendo criterios citoarquitectónicos se divide en Fr2, corteza cingulada anterior (Cg1), corteza prelímbica (PrL) y corteza infralímbica (IL). Basándose en la conectividad en mPFC dorsal y ventral. En nuestro caso, utilizaremos la primera terminología y nos centraremos en la PrL y la IL. Ambas estructuras difieren en sus proyecciones (Heidbreder y Groenewegen 2003; Vertes 2004) y en su papel en la regulación de la respuesta a estímulos estresantes emocionales (Radley 2012). Mientras que lesiones en la PrL incrementan la respuesta autonómica y la del eje HPA, las lesiones en la IL las

reducen, indicando un rol opuesto de ambas subdivisiones (Diorio et al. 1993; Figueiredo et al. 2003; Radley et al. 2006; Tavares et al. 2009). El papel de la mPFC en la regulación de la respuesta de estrés parece implicar la actuación a través de otros núcleos con conexiones directas e indirectas al PVN (Jankord y Herman 2008; Ulrich-Lai y Herman 2009; Radley 2012; Herman et al. 2016). La PrL modularía la respuesta de estrés mediante proyecciones a la amígdala basolateral (BLA), el BNST, el núcleo paraventricular del tálamo (PVT), la zona peri-PVN y el DR. La IL lo haría por medio de la amígdala central (CeA), el BNST anterior, el DMH, el hipotálamo lateral y el NTS.

Igual que la mPFC, el papel de la FH en la respuesta de estrés no es homogéneo, variando según la subdivisión implicada. Las principales vías de salida de información de la FH son el subículo dorsal (dSUB) y ventral (vSUB), los cuales proyectan a diferentes zonas del SNC (Naber y Witter 1998), en consonancia con las divergencias entre las subdivisiones de la FH en la regulación del eje HPA. Las lesiones en el vSUB apuntan a un papel relevante en la regulación del eje HPA (Herman et al. 1995), especialmente facilitando la recuperación de los niveles basales tras la finalización de la exposición a un estímulo estresante emocional (Herman et al. 1998), aunque, sorprendentemente, también podría estar facilitando la respuesta inicial a estímulos sistémicos (Mueller et al. 2004). El vSUB, al igual que el mPFC, no tiene proyecciones directas al PVN, sino que proyecta a través de otras áreas (Herman y Mueller 2006; Ulrich-Lai y Herman 2009). El vSUB envía proyecciones (presumiblemente glutamatérgicas) a áreas con conexión directa con el PVN como el BNST, la mPOA, la zona peri-PVN y el DMH; pero también a áreas con conexión indirecta como la mPFC, la amígdala CeA y medial (MeA), el LS y el PVT.

A pesar de las notables diferencias entre los núcleos de la amígdala respecto a la respuesta a estímulos estresantes, el papel de la amígdala en conjunto se considera estimulador. Estos núcleos se diferencian por su citoarquitectura y conectividad con diferentes zonas del SNC, pero están muy interconectados entre ellos (Sah et al. 2003). El patrón de expresión de *c-fos* (marcador de activación neuronal) varía según el núcleo estudiado tras la exposición a estímulos estresantes y en algunos casos (v.g. en la MeA) también existen diferencias antero-posteriormente y dorso-ventralmente (v.g. Úbeda-Contreras et al. 2018). Al igual que la mPFC y la FH, la amígdala no tiene conexiones directas con el PVN (Herman et al. 2003; 2016; Jankord y Herman

2008). La CeA se comunica con el PVN a través de proyecciones GABAérgicas a las subdivisiones anterior y lateral del BNST y al DMH. Asimismo, proyecta al NTS, mediante el cual podría estimular el eje HPA, y al núcleo parabraquial, mediante los cuales podría modular la respuesta autonómica. La MeA se comunica con el PVN por medio de las subdivisiones posterior y medial del BNST, la mPOA, y la zona peri-PVN. La BLA tiene pocas proyecciones hacia estos núcleos intermedios que inervan el PVN, salvo algunas a la parte anterior-dorsal del BNST y a otros núcleos hipotalámicos (entre los que no se incluye el PVN), pero inerva tanto la MeA como la CeA, pudiendo modular la respuesta del eje HPA por mediación de éstas.

2.3. La exposición crónica a estrés

Hasta ahora hemos tratado principalmente del procesamiento y la respuesta a estímulos estresantes que son presentados puntualmente (exposición aguda), pero ¿qué sucede con la exposición de manera repetida (crónica) a estímulos estresantes?

Los modelos animales de estrés crónico se pueden subdividir en tres categorías (ver revisión en Armario 2006a): (1) exposición continuada, (2) exposición repetida intermitente y (3) exposición crónica e impredecible a diferentes estímulos estresantes (“*chronic unpredictable stress*” CUS). Tras un período de exposición repetida al mismo estímulo estresante (homotípico), la respuesta del eje HPA, y la de otros marcadores fisiológicos, se va reduciendo. Esta reducción ha sido explicada por un proceso de habituación, aunque, un análisis detallado indica que no sigue las leyes de la habituación y preferimos llamarlo adaptación (Rabasa et al. 2015). No obstante, si tras la experiencia repetida con un mismo estímulo, el sujeto es expuesto a un estímulo diferente (heterotípico), se observa una respuesta normal o incluso incrementada (sensibilización) (Armario 2006a; Belda et al. 2015). Aparte de los efectos sobre la respuesta a estímulos estresantes agudos, la experiencia repetida con estrés de intensidad moderada-alta provoca una reducción de la ganancia de peso y, de la ingesta, un incremento en el peso relativo de la adrenal y un descenso en el del timo (Armario 2015).

A nivel central, la exposición a CUS, choque eléctrico en las patas e IMO incrementó en el PVN la expresión génica de CRH y AVP (de Goeij et al. 1992) e indujo una regulación a la baja de los GR en la FH (Marquez et al. 2004). Además, tras 21 días de exposición a CUS se ve disminuida la inhibición

GABAérgica sobre las neuronas parvocelulares del PVN (Joëls et al. 2004). El impacto del estrés crónico afecta a otras muchas otras zonas y parámetros del SNC (ver revisión en Ulrich-Lai y Herman 2009). Se observa una reducción en la complejidad dendrítica de las neuronas de la FH, la mPFC y la MeA, y un incremento en las de BLA y la corteza orbitofrontal (ver revisión en McEwen et al. 2016). Otra área que ve afectada su complejidad dendrítica es el estriado, en el que se observa hipertrofia o atrofia según la subdivisión (Dias-Ferreira et al. 2009; Francis et al. 2017), pero los cambios en el estriado serán discutidos con más detenimiento en el apartado 3. Además de los cambios dendríticos, se ha observado mediante resonancia magnética tras 21 días de exposición a CUS una reducción en el volumen en numerosas áreas del SNC, entre las que se encuentran la PrL, la FH el septum, y el BNST (Magalhães et al. 2018).

Los cambios a nivel central se reflejan en la respuesta conductual, aunque, las consecuencias de la exposición a estrés varían entre individuos, cepas y modelos (Armario y Nadal 2013). No obstante, entre los efectos observados tras la exposición a estrés crónico (CUS) podemos destacar una reducción de la actividad exploratoria en ambientes nuevos (García-Marquez y Armario 1987a), un incremento de la inmovilidad en la prueba de natación forzada (FST) (García-Marquez y Armario 1987b), lo que sugiere un afrontamiento pasivo, una menor capacidad para ejercer control y afrontar exitosamente una situación estresante controlable (Murua et al. 1991), anhedonia, evaluada por la preferencia por el consumo de sacarosa (Willner et al. 1987; Papp et al. 1991; D'Aquila y Willner 1994) y un descenso de la agresividad y del comportamiento sexual (D'Aquila y Willner 1994). No obstante, en algunos estudios el impacto no es negativo, habiéndose observado un incremento en la actividad exploratoria en un campo abierto y efecto anhedónico en la ingesta de sacarina tan solo tras un período prolongado de privación de líquidos previo a la prueba, pero no sin esta privación (Harris et al. 1998).

La exposición a estrés agudo provoca alteraciones en diferentes parámetros. Sin embargo, la exposición repetida a un mismo estímulo puede amortiguar o bloquear estas alteraciones. En este sentido, la exposición a IMO aguda reduce la actividad exploratoria en un ambiente nuevo y aumenta la inmovilidad en la FST, pero en animales expuestos repetidamente a IMO estos efectos desaparecen, por lo que la exposición repetida podría proteger frente a las consecuencias de una exposición aguda (Pol et al. 1992). Asimismo, la exposición repetida a IMO protege frente a las consecuencias negativas de una

exposición aguda al mismo estímulo en el crecimiento, la ingesta de comida y la preferencia por sacarina (Pastor-Ciurana et al. 2014). De hecho, la exposición a CUS también protege parcialmente frente al impacto sobre el peso y la ingesta de una exposición aguda a IMO, dando lugar a adaptación cruzada o heterotípica (Pastor-Ciurana et al. 2014).

Por lo tanto, podemos concluir que la exposición a estrés *per se* no implica necesariamente un perjuicio para el organismo. La valencia de las consecuencias de la exposición puede venir mediada por el tipo de estímulo estresante (sistémico o emocional), y por las características intrínsecas al estímulo (v.g. duración, intensidad y controlabilidad) y al sujeto (v.g. especie, edad y factores psicológicos) (Anisman y Matheson 2005).

3. El sistema dopaminérgico

Las neuronas dopaminérgicas (**figura 3**) están ubicadas en nueve grupos celulares (A8-A16), distribuidos en tres sistemas: mesencefálico (A8-A10), diencefálico (A11-A15) y bulbo olfatorio (A16) (Hale y Lowry 2015). El sistema dopaminérgico mesencefálico se compone a su vez de tres sistemas: nigroestriatal, mesolímbico y mesocortical, estos dos últimos englobables bajo el nombre de sistema mesolímbico-cortical. El sistema nigroestriatal proyecta desde la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) al estriado dorsal. El sistema mesolímbico-cortical proyecta desde el área tegmental ventral (VTA) a la corteza prefrontal, al estriado ventral (ocupado principalmente por el núcleo accumbens; NAc), a la amígdala y a la FH. Aunque ésta es la visión clásica, hay evidencias de que las proyecciones del sistema nigroestriatal y mesolímbico-cortical parten tanto desde la SNpc, como del VTA (Björklund y Dunnett 2007). En el diencefalo, las áreas que contienen grupos celulares dopaminérgicos son el hipotálamo posterior (A11), el núcleo arqueado (A12), la zona incierta (A13), el núcleo periventricular (A14) y el hipotálamo lateral y ventral (A15). El núcleo arqueado y el periventricular liberan dopamina (DA) al sistema portal hipofisario para alcanzar a la hipófisis y regular la liberación de prolactina, mientras que la zona incierta podría inervar directamente el PVN (Hale y Lowry 2015).

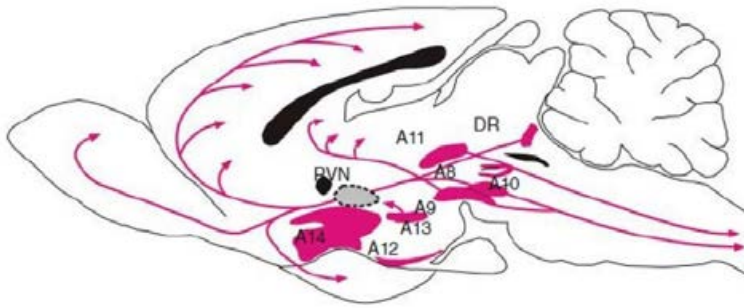


Fig. 3. Sistema Dopaminérgico.

Las neuronas dopaminérgicas están ubicadas en nueve grupos celulares (A8-A16), distribuidos en tres sistemas: mesencefálico (A8-A10), diencefálico (A11-A15) y bulbo olfatorio (A16), a partir de los cuales inervan prácticamente todo el SNC (Hale y Lowry 2015). PVN=paraventricular núcleo del hipotálamo, DR=núcleo del rafe dorsal.

La DA liberada por estos grupos celulares actúa mediante la unión a dos familias de receptores: D1-like (D1 y D5) y D2-like (D2, D3 y D4) (Beaulieu y Gainetdinov 2011). Los receptores D2-like tienen mayor afinidad por la DA que los D1-like. Ambas familias pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, pero los D1-like estimulan la actividad de la adenil ciclasa, en tanto que los D2-like la inhiben. Además, los D1-like se expresan exclusivamente a nivel postsináptico, pero los D2 y D3 se expresan a nivel pre- y postsináptico. Concretamente, los D2 presentan dos isoformas: corta y larga, que actúan a nivel pre- y postsináptico respectivamente. De entre los cinco tipos de receptores dopaminérgicos, los receptores D1 y D2 han sido los más caracterizados en estudios conductuales y bioquímicos, por lo que nos centraremos en los mismos a partir de ahora. Los receptores D1 y D2 se expresan a lo largo del SNC, incluyendo el PVN (Ran et al. 2019), pero la expresión del receptor D1 es más elevada que la del D2, salvo en VTA e hipófisis (ver revisión en Bentivoglio y Morelli 2005). A pesar de las diferencias en densidad a lo largo del SNC, ambos receptores son altamente expresados en el estriado.

El estriado ha sido dividido tradicionalmente en dorsal y ventral. El estriado dorsal, a pesar de ser aparentemente heterogéneo, se puede subdividir en lateral y medial, mientras que el ventral lo ocupa principalmente el núcleo *accumbens* (NAc), el cual se subdivide en *core* (NAcC) y *shell* (NAcSh) (Humphries y Prescott 2010). El 90-97 % de la población celular del estriado, independientemente de la subdivisión, lo componen neuronas GABAérgicas llamadas neuronas medianas espinosas (*medium spiny neurons*; MSN) que

proyectan fuera del estriado. El resto lo constituyen principalmente tres tipos de interneuronas: neuronas colinérgicas gigantes sin espinas, neuronas GABAérgicas medianas sin espinas y neuronas que coexpresan óxido nítrico, somatostatina y neuropéptido Y. Las MSN se distribuyen en dos estructuras que conforman el estriado: los estriosomas y la matriz. Los estriosomas contienen MSN ricas en receptores opioides- μ , sustancia P y en menor medida, marcadores colinérgicos; reciben proyecciones de áreas límbicas y frontales y de un grupo de neuronas ubicadas en la SNpc, y proyectan a neuronas dopaminérgicas del tronco del encéfalo. Las MSN de la matriz reciben proyecciones de la corteza, el tálamo y VTA. La mitad de las neuronas de la matriz proyectan al *globus pallidus* interno, SN *pars reticulata* (SNpr) y VTA, y la otra mitad proyectan al *globus pallidus* externo y al núcleo subtalámico. Las primeras formarían el circuito directo, compuestas por neuronas que expresan receptores D1, sustancia P y prodinorfina, y las segundas el indirecto, compuestas por neuronas que expresan D2 y proencefalina (**figura 4**). La activación del circuito directo se traduciría en una activación tálamo-cortical que favorecería el movimiento, mientras que la activación del indirecto tendría los efectos opuestos (Humphries y Prescott 2010; Soares-Cunha et al. 2016a). Tradicionalmente, las neuronas que expresan los receptores D1 han sido adscritas al circuito directo y las que expresan D2 al indirecto. Este esquema parece ser más complejo en el NAc, donde solo las D1 forman parte del directo, en tanto que ambas poblaciones podrían formar parte del circuito indirecto (Soares-Cunha et al. 2016a).

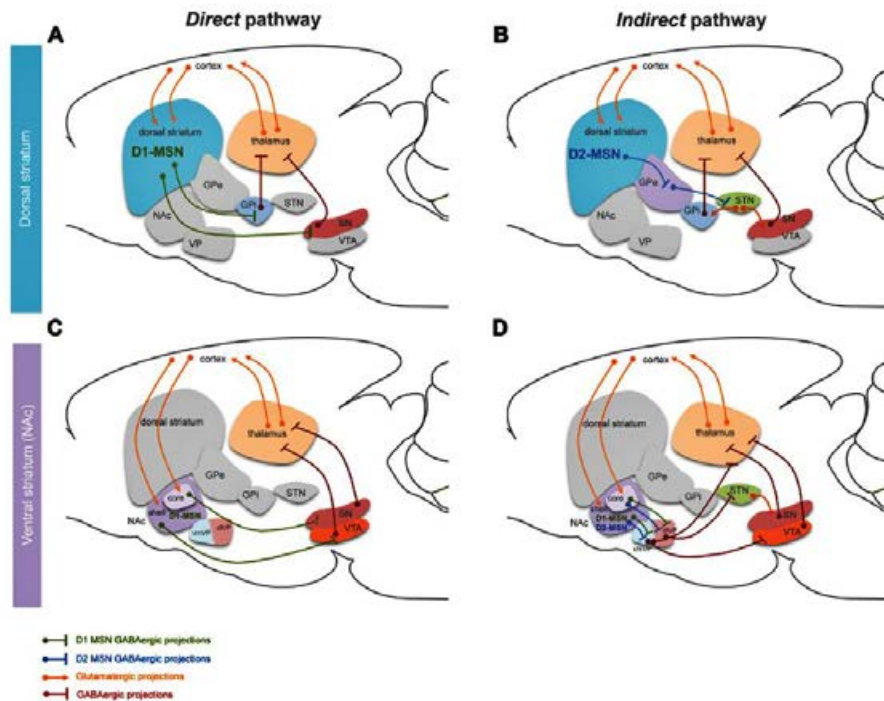


Fig. 2. Circuitos fronto-estriatal directo e indirecto.

La activación de las neuronas GABAérgicas del estriado dorsal (A) que expresan receptores D1 inhibe al globus pallidus interno y la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) que ejercen una inhibición tónica sobre el tálamo. Al inhibir estas áreas, se bloquea la inhibición del tálamo, el cual manda proyecciones glutamatérgicas a la corteza. En el estriado ventral (C) (núcleo accumbens; NAc) el circuito directo actúa a través de neuronas GABAérgicas que expresan D1 a la SNr y el área tegmental ventral (VTA), las cuales ejercen inhibición tónica sobre el tálamo; por lo que al inhibir estas áreas, se activa el tálamo. En el estriado dorsal la activación de neuronas GABAérgicas que expresan D2 (B) forman parte del circuito indirecto. Al activarse estas neuronas inhiben al globus pallidus externo, el cual inhibe de forma tónica mediante proyecciones GABAérgicas el núcleo subtalámico. Al inhibirse el globus pallidus externo, el núcleo subtalámico se activa y en vía proyecciones glutamatérgicas al globus pallidus interno y a la SNpr las cual inhiben la acción del tálamo. En el estriado ventral (D) el circuito indirecto estaría formado tanto por neuronas GABAérgicas D1 como D2, las cuales proyecta al núcleo pálido ventral. Este núcleo ejerce una inhibición tónica sobre el núcleo subtalámico y el VTA. Esta inhibición tónica se interrumpe debido a las proyecciones GABAérgicas del NAc sobre el núcleo pálido ventral. Al interrumpirse esta inhibición, el VTA envía proyecciones GABAérgicas sobre el tálamo y el núcleo subtalámico estimula a la SNpr que también envía proyecciones GABAérgicas sobre el tálamo. En resumen, el circuito directo inhibe directamente a las áreas inhibidoras del tálamo provocando la activación cortical por parte de este, mientras que el indirecto inhibe a las áreas que bloquean la acción de las áreas inhibidoras del tálamo, por lo que elimina la activación cortical por parte del tálamo al inhibirlo de forma indirecta. Figura adapta de Soares-Cunha et al. 2016.

3.1. Sistema dopaminérgico y estrés

Aunque el sistema dopaminérgico se ha relacionado tradicionalmente con el sistema de refuerzo, hay un gran interés en su implicación en la respuesta de estrés (Joseph et al. 2003; Ungless 2004; 2010). Debido a que el sistema dopaminérgico inerva áreas relevantes en la respuesta a estímulos estresantes como la mPFC, la amígdala o el hipotálamo, no es sorprendente que esté implicado en la regulación de ésta, aunque los resultados en la literatura son controvertidos. Las contradicciones podrían deberse a una especificidad del papel de la dopamina en la modulación de la respuesta de estrés en función de las características del estímulo estresante (intensidad y grado de controlabilidad) y del fondo genético del animal (Spencer et al. 2004; Kvetnansky et al. 2009). Algunos autores defienden que la respuesta del sistema dopaminérgico es independiente de la valencia del estímulo y responde en realidad a la saliencia o relevancia de los estímulos (Horvitz 2000), y esta idea podría también explicar las contradicciones en la literatura.

En cualquier caso, los estudios de voltametría y microdiálisis han sido claves para probar la implicación del sistema dopaminérgico en la respuesta de estrés. Gracias a estas técnicas se ha observado, un incremento en la liberación de DA en la mPFC y NAc tras la exposición a choques eléctricos (Abercrombie et al. 1989), inmovilización en tubo (Doherty y Gratton 1996; Pascucci et al. 2007), presión en la cola (Stevenson y Gratton 2003), manipulación manual del animal (*handling*) (Inglis y Moghaddam 1999) y derrota social (Holly et al. 2015); en el NAc tras presión en la cola (King et al. 1997); en la BLA tras *handling* (Inglis y Moghaddam 1999) y en el hipocampo tras inmovilización en tubo (Yamato et al. 2002). Es importante destacar la relación entre mPFC y NAc, dado que la actividad dopaminérgica en la mPFC podría inhibir la liberación de DA en el NAc (Doherty y Gratton 1996; King et al. 1997; Pascucci et al. 2007), mientras que la noradrenérgica podría estimularla (Pascucci et al. 2007). Asimismo, el bloqueo de la actividad dopaminérgica en la BLA podría incrementar la liberación de DA en el NAc, efecto que podría ser ejercido a través de la mPFC (Stevenson y Gratton 2003). En el resto del estriado, más allá del NAc, no se ha observado liberación de DA en respuesta a estrés (Imperato et al. 1991) o la respuesta es muy baja (Abercrombie et al. 1989).

De las subdivisiones del estriado, el NAc ha sido la estructura que más claramente se ha asociado con la respuesta a estímulos estresantes (Salamone 1994; Finlay y Zigmond 1997; Joseph et al. 2003). No obstante, en los estudios

que han utilizado genes de expresión temprana (IEG) (v.g. *c-fos*, *Arc*) como marcadores de activación, se ha demostrado activación del estriado ante diferentes estímulos estresantes como inmovilización en tubo, FST, campo abierto (OF), IMO y olor de predador (Cullinan et al. 1995; Ons et al. 2004; Masini et al. 2005). Esta activación no es igual en todas las subdivisiones del estriado (Úbeda-Contreras et al. 2018), lo cual indica que la respuesta es región-específica y que podría existir una especialización de las diferentes subdivisiones en el procesamiento del estímulo estresante. Por ejemplo, la división dorsal-medial está implicada en el procesamiento de ciertos aspectos de la situación estresante, como en la detección de la controlabilidad en situaciones de estrés (Maier 2015; Maier y Seligman 2016), aspecto que trataremos con más detenimiento en el apartado 4.

Además de activarse tras la exposición a estrés agudo, la exposición crónica a estrés provoca cambios estructurales en el estriado. Tras la exposición a CUS se observa atrofia en la arborización dendrítica en el estriado dorsal-medial e hipertrofia en el dorsal-lateral (Dias-Ferreira et al. 2009), así como una atrofia en las neuronas MSN del NAc que expresan D1 (Francis et al. 2017; Fox et al. 2018). En otro estudio también se ha descrito hipertrofia en las MSN del NAc, aunque sin distinguir el fenotipo neuronal (Bessa et al. 2013). Junto a estos cambios estructurales se han observado cambios funcionales (Chaudhury et al. 2013). La exposición crónica a derrota social provoca un incremento en la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc, mientras que el efecto sobre aquellas que proyectan a la mPFC varía en función de las consecuencias conductuales: éstas disminuyen su actividad en animales con un fenotipo vulnerable (definidos por la tasa de evitación social y el consumo de sacarosa), pero no se ven afectadas en animales con fenotipo resiliente. Además, en los animales con fenotipo vulnerable, la inhibición de las proyecciones VTA-NAc elimina el impacto de la exposición crónica a estrés. En contraste con estos datos, Tye y colaboradores (2013) han observado que la inhibición del VTA da lugar a un fenotipo similar a la depresión mientras que su activación lo revierte, efecto que podría estar mediado por las proyecciones al NAc. No obstante, la activación era menos selectiva que la del estudio anterior, en el que inhibían de forma selectiva las proyecciones VTA-NAc.

Otra explicación a tener en cuenta, aparte de la especificidad de la manipulación, es que el área de destino, el NAc, contiene dos circuitos (D1,

D2) que podrían jugar papeles diferentes. Hikida y colaboradores (2010; 2013) han demostrado que el aprendizaje de condicionamiento apetitivo requiere la participación del circuito directo y el receptor D1, mientras que la adquisición de condicionamiento aversivo requiere del indirecto y el receptor D2. De hecho, tras un paradigma de estrés crónico (derrota social) la activación optogenética del circuito directo (D1) promueve las conductas que indican resiliencia, mientras que la del indirecto (D2) incrementa las que indican vulnerabilidad (Francis et al. 2015). Esta disociación de funciones entre circuitos/receptores no es siempre tan clara. La activación optogenética de ambas poblaciones incrementa la motivación en una tarea apetitiva, y la activación de los receptores D2 en solitario, incrementa la motivación tanto en animales control como en aquellos con un fenotipo anhedónico (inducido por la administración prenatal de glucocorticoides) (Soares-Cunha et al. 2016b).

Más allá de la liberación de DA en respuesta a estrés o la regulación de las consecuencias conductuales, estudios farmacológicos indican que el sistema dopaminérgico podría participar en la regulación del eje HPA. La administración periférica tanto de agonistas D1 y D2 (Borowsky y Kuhn 1992), como de antagonistas D2 (Belda y Armario 2009) puede activar el eje HPA en ausencia de estímulos estresantes. Pero debemos ser prudentes a la hora de extraer conclusiones, porque la activación del eje HPA es muy sensible a la administración de sustancias y fármacos de muy distinta naturaleza y acción neuroquímica (Armario 2006a), por lo que los efectos podrían no estar específicamente ligados al sistema dopaminérgico.

En cuanto a la respuesta a estrés, Belda y Armario (2009) observaron que la administración sistémica de antagonistas D1 y D2 previa a la exposición a IMO aceleraba la recuperación del eje HPA tras la exposición, implicando al sistema dopaminérgico en la regulación de la respuesta de éste. En la misma línea, Spencer y colaboradores (2004) han observado una reducción en la respuesta de ACTH y Fos proteína en el PVN y otras áreas del SNC a interleuquina-1 β (estímulo estresante sistémico) tras la administración de antagonistas D1 y D2 en la mPFC. Sin embargo, no observaron modificaciones en la respuesta de ACTH a soplos de aire en la cabeza, aunque sí una reducción de la expresión de Fos en el BNST y el PVN sólo tras la administración del antagonista D2. Las diferencias en los efectos de los antagonistas podrían venir mediadas no tanto por la naturaleza de los estímulos, sino por las diferencias en intensidad, ya que la liberación de ACTH tras la exposición a interleuquina-1 β es superior y

perdura más en el tiempo que tras la exposición a soplos de aire en la cabeza. En contraposición a estos resultados, Sullivan y Dufresne (2006) han observado un incremento en la respuesta de ACTH a la inmovilización en tubo tras la administración de un antagonista dopaminérgico (no selectivo) en la mPFC.

La actividad dopaminérgica en el SNC es sensible a la acción del CRH y los glucocorticoides. La administración de CRH en el NAcSh incrementa los niveles de acetilcolina y DA en esta subdivisión (Chen et al. 2012). Estos cambios conllevan alteraciones a nivel conductual similares a las producidas por la exposición previa a estrés, como un incremento en la conducta de afrontamiento pasivo en el FST, anhedonia (evaluada por el consumo preferente de sacarosa) y conducta similar a la ansiedad en la prueba del laberinto elevado en cruz (EPM). La actividad dopaminérgica en el NAc también es sensible a la acción del CRH en VTA. La administración de un antagonista del receptor CRHR2, pero no del CRHR1, el VTA bloquea el incremento de DA en el NAcSh observado tras derrota social (Holly et al. 2015).

Respecto a los glucocorticoides, su administración sistémica incrementa la liberación de DA en el NAc en condiciones basales (Piazza et al. 1996a). Más importante aún, su supresión (química o por adrenalectomía) inhibe la liberación de DA en el NAc causada por la administración de morfina (Piazza et al. 1996b), así como la sensibilización de la liberación de DA y de la respuesta locomotora a opiáceos y psicoestimulantes provocada por una exposición previa a estrés crónico (Deroche et al. 1995; Rougé-Pont et al. 1995). La administración local de glucocorticoides en el VTA potencia la acción glutamatérgica sobre las neuronas dopaminérgicas de VTA (Daftary et al. 2009) e incrementa la liberación basal de DA en el NAc (Tye et al. 2009).

3.2. Desarrollo, dopamina y estrés

El sistema dopaminérgico juega un papel relevante en funciones cognitivas, regulación emocional, el refuerzo y el control motor, y está claramente implicado en la sintomatología de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia o la depresión (Rodrigues et al. 2011). Por esta razón es clave entender cómo es afectado por la exposición a estrés durante las etapas en las que aún se encuentra en desarrollo. La exposición a glucocorticoides durante el período de gestación y en los primeros estadios del desarrollo, en los que el

sistema dopaminérgico está en proceso de maduración, puede afectar de forma permanente a su funcionamiento (Rodrigues et al. 2011), dando lugar, a hiperactividad en el sistema mesolímbico (lo que incrementaría la vulnerabilidad a la esquizofrenia) y a hipoactividad del sistema mesolímbico-cortical (lo que provocaría déficits emocionales y de memoria).

El periodo de maduración del sistema dopaminérgico se extiende hasta el final de la adolescencia. Las proyecciones dopaminérgicas del VTA se incrementan de la adolescencia a la edad adulta en áreas como la mPFC o el NAc, lo que sugiere que el sistema dopaminérgico funciona de forma distinta en la adolescencia que en la edad adulta (Yetnikoff et al. 2014). El sistema dopaminérgico sigue un gradiente de desarrollo posterior-anterior, de tal manera que la corteza prefrontal es el área que más tarde madura. En consonancia, las proyecciones dopaminérgicas al mPFC tardan más en alcanzar la madurez, que las de los sistemas nigroestriatal y mesolímbico (Naneix et al. 2012). Los niveles de receptores dopaminérgicos también varían hasta alcanzar la expresión de la edad adulta, siguiendo aproximadamente un patrón en forma de “U” invertida a lo largo de la adolescencia. El momento de máxima expresión de receptores dopaminérgicos durante la adolescencia varía ligeramente entre estudios. Hay datos que muestran un incremento seguido de una caída en los niveles de los receptores dopaminérgicos del estriado (Teicher et al. 1995; Andersen et al. 1997; Dalton y Zavitsanou 2010), pero otros solo lo encuentran en los receptores D1 y no en los D2 (Falco et al. 2014). Naneix y colaboradores (2012) observan un pico en la expresión de receptores dopaminérgicos en el estriado dorsal y la mPFC durante la adolescencia tardía que desaparece en la edad adulta. Este pico aparecería antes en el NAc, donde se alcanzarían más rápido los niveles de la edad adulta. No obstante, los cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos durante la adolescencia podrían variar según el fenotipo neuronal y el sexo (Brenhouse y Andersen 2011). Por ejemplo, Brenhouse y colaboradores (2008) no observaron cambios en los receptores D1 localizados en neuronas GABAérgicas de la mPFC, pero sí en las glutamatérgicas que proyectaban a áreas subcorticales como el NAc. Asimismo, en hembras el incremento y la posterior caída en el número de receptores es menos marcada que en machos (Andersen et al. 1997).

En paralelo a los cambios en el sistema dopaminérgico, se observan, durante la adolescencia, cambios conductuales (sobre este aspecto profundizaremos más en el apartado 5), modificaciones en habilidades dependientes del sistema

dopaminérgico, reflejándose en una menor flexibilidad cognitiva que los adultos (Naneix et al. 2012) y mayor sensibilidad al valor reforzante de sustancias que incrementan la disponibilidad de DA en el terminal sináptico, como la cocaína (Naneix et al. 2013).

El proceso madurativo del sistema dopaminérgico puede verse alterado por manipulaciones farmacológicas o por la exposición a estrés durante este período. Por ejemplo, la estimulación de los receptores D2 de forma crónica durante la adolescencia altera el desarrollo del sistema dopaminérgico, reduciendo la densidad de las fibras dopaminérgicas y el número de receptores dopaminérgicos, especialmente en el sistema mesocortical (Naneix et al. 2013). La exposición a estrés crónico durante la adolescencia puede reducir los niveles dopaminérgicos en la mPFC en condiciones basales (Watt et al. 2009; 2014), junto con un descenso en el número de receptores D2 (Wright et al. 2008). Por el contrario, se observa un incremento moderado de la expresión de receptores D2 en el estriado dorsal-medial en la edad adulta tras la exposición repetida a choque eléctrico en las patas durante la adolescencia en comparación con el grupo sin exposición a estrés (Sanchís-Ollé et al. 2019).

4. Controlabilidad

En una revisión relativamente reciente, Koolhaas y otros investigadores (2011) debaten sobre los problemas para definir estrés remarcando la importancia de la falta de controlabilidad y predictibilidad para que una situación aversiva pueda considerarse como estresante. La importancia de ambos factores en las consecuencias de la exposición a estímulos estresantes fue ya destacada hace 5 décadas por Seligman, Maier y Weiss. De hecho, de los estudios de Seligman, Maier y colaboradores surgió el concepto de indefensión aprendida que se utilizó para describir una serie de déficits o consecuencias de la experiencia previa con estímulos estresantes incontrolables, entre las que se hallaba la dificultad para afrontar con éxito nuevas situaciones estresantes (Seligman 1972).

4.1. Controlabilidad, indefensión aprendida y evitación activa

Para entender qué es la indefensión aprendida, antes debemos aclarar algunos conceptos. Una situación es controlable cuando dar una respuesta incrementa la probabilidad de que ocurra el resultado esperado, es decir, la conducta es contingente con el resultado (Maier y Seligman 2016). Una situación sería

incontrolable si dar una respuesta no incrementa la probabilidad de aparición de un resultado concreto. La indefensión aprendida/percibida aparece cuando, frente a una situación controlable el sujeto la percibe como incontrolable. En los casos en los que se puede ejercer el control de forma objetiva se establece un proceso de condicionamiento operante (Rescorla 1988), de tal manera que la realización de la conducta (v.g. apretar una palanca) apropiada dará lugar a un refuerzo negativo (fin de un estímulo aversivo, como un choque eléctrico), generando una asociación entre conducta y refuerzo negativo.

El paradigma de indefensión aprendida ha sido, y sigue siendo, muy importante en el campo de la Psicología, habiéndose considerado un buen modelo de depresión en el laboratorio. Este paradigma proviene de los estudios realizados en los años sesenta sobre los efectos de la controlabilidad, en los que se utilizaba un diseño triádico que incluía un grupo no expuesto a estrés (NS), un grupo expuesto a estrés controlable (CST), tradicionalmente llamado grupo *master*, y otro expuesto a estrés incontrolable (UST), tradicionalmente denominado grupo *yoked/slave* (Weiss 1972). El estímulo estresante utilizado en este tipo de paradigmas es el choque eléctrico, típicamente en las patas o en la cola. Estudios iniciales con perros, indicaban que haber experimentado previamente choques eléctricos inescapables provocaba que los animales fallaran en una tarea posterior (en un contexto distinto) en la que sí se podía evitar el choque eléctrico o escapar de él (estrés controlable) (Overmier y Seligman 1967). El primer contexto y el segundo diferían significativamente por lo que los efectos observados no parecían deberse al desarrollo de miedo condicionado al contexto. De hecho, el déficit observado en los animales que no podían escapar del choque no se observaba en aquellos animales que el primer día sí podían escapar del choque eléctrico, aunque ambos recibiesen la misma cantidad y tiempo de choque (Seligman y Maier 1967). El estado de pasividad o de indefensión aprendida no se debía a que el animal hubiese adquirido la conducta de inmovilidad como estrategia para afrontar el choque, ya que en tareas en las cuales los animales CST debían mantenerse inmóviles para escapar de él, éstos aprendían una nueva tarea, en el segundo contexto, que requería realizar una conducta activa (Maier 1970). Estos datos llevaron a plantear a estos investigadores que los animales en realidad aprendían que no podían hacer nada para afrontar la situación y habían desarrollado indefensión aprendida.

En paralelo a estos resultados, Weiss y colaboradores observaron, utilizando en este caso ratas, que la capacidad para controlar o predecir un estímulo estresante reducía significativamente las lesiones gástricas causadas por éste (ver revisión en Weiss 1972), destacando la importancia de la controlabilidad. No obstante, ellos proporcionaron una explicación alternativa a los déficits observados en una segunda tarea, ahora controlable diferente de la primera (Weiss et al.1975). Plantearon que el déficit era secundario a un déficit motor causado por el descenso de los niveles de noradrenalina en el SNC tras la exposición previa a una situación estresante incontrolable aguda. De hecho, tras exposición crónica a estrés incontrolable desaparecía el déficit en la adquisición de la segunda tarea y, este hecho, iba en paralelo a un incremento en la capacidad de síntesis del sistema noradrenérgico, lo que evitaba la reducción de los depósitos de noradrenalina, permitiendo efectuar la respuesta motora adecuada en el segundo contexto (Weiss et al. 1975). Sin embargo, esta teoría no explicaría los datos del laboratorio de Seligman y colaboradores (1968), en los que “forzando” al animal en el que se había inducido indefensión aprendida a cruzar al compartimento contrario acabarían aprendiendo la tarea operante. Por lo tanto, la incapacidad para realizar la tarea no estaría mediada por un déficit neuroquímico.

Seligman y Maier continuaron los estudios sobre la controlabilidad en ratas, utilizando el modelo diseñado por Weiss (Weiss et al. 1975). Éste consistía en colocar a la rata en un compartimento restringido con la cabeza orientada hacia una rueda la cual puede girar para escapar del choque eléctrico en la cola. La evaluación de las consecuencias la realizaban en una caja lanzadera o *shuttle-box*. Este tipo de caja consta de dos compartimentos conectados y en ambos, el suelo está compuesto por rejillas a través de las cuales reciben el choque eléctrico en las patas. La conducta operante consiste en cruzar al compartimento contrario al que está recibiendo el choque eléctrico.

Utilizando siempre ratas, el laboratorio de Maier observó que el control ejercía un efecto protector sobre una gran parte de las consecuencias de la exposición a los choques eléctricos en la cola (ver revisión en Maier y Watkins 1998). Entre los efectos descritos en los animales UST que no aparecen en los CST podemos destacar: las dificultades para adquirir una tarea operante apetitiva, la reducción del comportamiento dominante en una situación de competición por comida y el descenso de la interacción social. Asimismo, los UST muestran más miedo y/o ansiedad en ambientes nuevos y en presencia de olor de

predador que los CST. Además, los animales UST muestran mayor adquisición de miedo al contexto y al estímulo condicionado (CS; tono) que los NS, mientras que los CST muestran menos adquisición que los NS (Baratta et al. 2007). Estos resultados esbozan un cuadro representativo de un buen modelo de depresión en animales, pero los efectos no perduran en el tiempo y el propio Maier considera que hay una contribución fundamental de la ansiedad. No obstante, la exposición repetida al contexto donde se llevó a cabo la exposición a los choques incrementa significativamente la persistencia de los efectos en el tiempo (Maier 2001). Éste es un hallazgo muy interesante que no ha sido estudiado posteriormente.

La posibilidad de control, además de reducir las consecuencias de la exposición al estrés, da lugar a un fenómeno de inmunización, reflejado en una protección frente al impacto de la exposición a futuras situaciones estresantes incontrolables (ver revisión en Maier 2015). Este efecto, a diferencia de las consecuencias del UST, es duradero (Kubala et al. 2012) y transituacional, es decir, los efectos protectores se dan en situaciones estresantes diferentes a la de estrés controlable (Amat et al. 2010).

Evitación activa

En aquellos paradigmas en los que el animal aprende a evitar los choques, se han usado modelos de evitación activa, en los que realizar una conducta operante evita la aparición del estímulo aversivo, o modelos de evitación pasiva, en los que no realizar una conducta para la cual los animales tienen predisposición previene la aparición de dicho estímulo aversivo (LeDoux et al. 2017). Nosotros nos centraremos en la tarea de evitación activa. Para este tipo de aprendizaje es necesario el emparejamiento de CS (luz y/o sonido) con un estímulo incondicionado (US), en nuestro caso choques eléctricos como estímulo aversivo. En este tipo de tareas, llevar a cabo una determinada conducta de forma previa a la aparición del estímulo aversivo, durante la aparición del CS, previene su aparición y se habla de evitación. En el caso de que el animal realice la conducta apropiada una vez iniciado el choque se considera como escape. Sin embargo, hay paradigmas en los que el choque no viene anunciado por un CS, sino que aparece siguiendo un régimen temporal regular (choque eléctrico cada X segundos), el cual debe interiorizar el animal para llevar a cabo la conducta apropiada que permita su evitación (evitación tipo Sidman) (Rescorla 1968).

En los estudios de evitación activa se ha utilizado preferentemente la caja lanzadera o *shuttle box* y el choque eléctrico en las patas. La tarea de evitación activa puede ser en un sentido (*one-way*) o dos (*two-way*, TWAA). En el primer caso hay un compartimento seguro, en el que no hay choque ni CS, y otro peligroso, en el que sí. Para evitar/escapar el choque hay que cruzar al compartimento seguro (Cándido et al. 2002; Torres et al. 2005). En el segundo caso (**figura 5**), en ambos se reciben choques y la respuesta operante consiste en cruzar del compartimento en el que se encuentre el animal al contiguo (Lalanza et al. 2015). Esta tarea es más complicada que la anterior ya que ninguno de los dos compartimentos es seguro. Durante los primeros ensayos puede aparecer la conducta de petrificación tras la asociación CS-US que dificulta la conducta de evitación, pero a medida que la sesión va avanzando se incrementan el número de evitaciones (Wilcock y Fulker 1973). La intensidad de la conducta de petrificación durante los primeros ensayos predice el desempeño a lo largo de la sesión de TWAA. Esta conducta correlaciona negativamente con el número total de evitaciones en la sesión y podría venir mediada por altos niveles de ansiedad (Vicens-Costa et al. 2011). De hecho, estudios farmacológicos han demostrado que la administración de ansiolíticos mejora la conducta de evitación, mientras que la de ansiogénicos la empeora (Escorihuela et al. 1993). La relación negativa entre ansiedad y desempeño en la tarea de TWAA viene confirmada por los datos observados en líneas de animales seleccionados genéticamente por su desempeño en esta tarea, denominadas *Roman high/low avoidance* (Escorihuela et al. 1999): seleccionadas por la facilidad (*high*) o dificultad (*low*) con la que adquieren la TWAA. No obstante, en estudios utilizando ratas seleccionadas por su desempeño en la TWAA (*Hatano-high/low avoidance*) pero eliminando sistemáticamente los sujetos que mostraban una marcada conducta de petrificación, la relación con conductas asimilables a la ansiedad es opuesta a las *Roman* (Horii et al. 2012). Estas ratas adquieren diferencialmente una tarea de evitación pasiva, realizándola mejor las *high avoidance*, algo que no ocurre en las *Roman*. Además, a diferencia de las *Roman*, las *Hatano high avoidance* presentan más conductas asimilables a la ansiedad que las *Low avoidance*. Por lo que la relación entre la ansiedad y el desempeño en la TWAA puede ser más compleja de lo que se ha sugerido inicialmente.

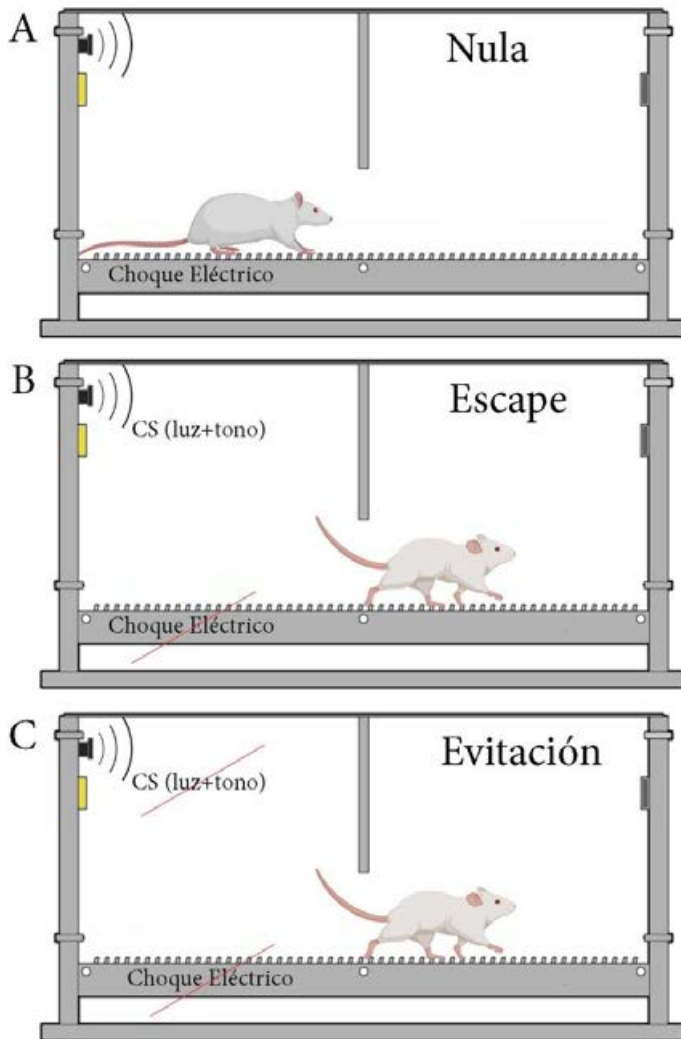


Fig. 5. Tarea de evitación activa en dos sentidos (TWAA).

En la TWAA se dan dos tipos de condicionamiento: clásico y operante. Mediante condicionamiento clásico se asocia un choque eléctrico en las patas (US) con un tono y una luz (CS) los cuales predicen la aparición del choque. Mediante condicionamiento operante se asocia el cruzamiento al compartimento contiguo al que se encuentre el sujeto con el fin del choque o del CS. En este tipo de paradigma se dan tres respuestas: nula (A), escape (B) y evitación (C). La respuesta nula se da cuando el animal no cruza al compartimento contiguo ni durante el CS, ni durante el US. Esta conducta es más probable que aparezca al inicio de la sesión pero que desaparezca a medida que el sujeto aprende la tarea. La tarea de escape se da cuando cruza durante el choque, finalizándolo y escapando por tanto del estímulo aversivo. Cuando la contingencia finalización de choque + cruzamiento es aprendida, el sujeto adquiere la conducta de evitación. Esta conducta se da cuando el sujeto cruza al compartimento contiguo durante el CS y previene así la aparición del US. Figura adaptada de LeDoux et al. 2017.

El laboratorio de Richter-Levin ha estudiado los efectos de la exposición repetida a TWAA como modelo de controlabilidad, obteniendo resultados que van en la misma línea de los obtenidos por el grupo de investigación de Maier (Ilin y Richter-Levin 2009a; Lucas et al. 2014). Ellos establecen el choque recibido por el grupo UST usando el promedio de choques recibido por el CST, en lugar de conectar cada UST a un CST para que reciban exactamente el mismo número de choques. La exposición durante 6 días a este paradigma da lugar a corto plazo a un incremento en el uso de estrategias de afrontamiento activas en los CST y pasivas en los UST cuando son evaluadas en la FST, y potencia la adquisición de una tarea apetitiva en los CST mientras que la dificulta en los UST (Lucas et al. 2014). A largo plazo observan una reducción del miedo al contexto en los CST respecto a los UST (Ilin y Richter-Levin 2009a) y una facilitación de la adquisición de una tarea de estrés controlable parcialmente distinta de la anterior en los CST y mayor dificultad en los UST (Lucas et al. 2014).

Un último aspecto importante que destacar en el estudio de la controlabilidad y la evitación activa es la cepa y el sexo. Sin entrar en una revisión exhaustiva, se han encontrado diferencias en el desempeño en tareas que implican estrés controlable entre diferentes cepas de ratas de laboratorio. Por ejemplo, las ratas de la cepa *Wistar-Kyoto*, usadas como modelo de depresión y ansiedad (Lahmame et al. 1997), adquieren más rápido la tarea de evitación en una caja operante (*lever press*) que las ratas de la cepa *Sprague-Dawley* (Servatius et al. 2008), y son más resistentes a la extinción de la conducta cuando el choque eléctrico es más intenso (Jiao et al. 2011). Las ratas *Holtzman* y las *Long-Evans* muestra una latencia de escape superior a la de las *Sprague-Dawley* (Padilla et al. 2009). De hecho, las ratas *Long-Evans* muestran mayor tasa de petrificación en la reexposición al contexto donde recibieron el choque eléctrico que ratas de la cepa *Sprague-Dawley* (Chang y Maren 2010), indicando mayor condicionamiento de miedo al contexto, y probablemente más susceptibilidad a los efectos del choque eléctrico. Esta cepa tiene una mayor actividad basal del eje HPA y una mayor respuesta al estrés que las *Sprague-Dawley* (Sanchís-Ollé en preparación). En cuanto al sexo, el impacto de la controlabilidad, no se observan en ratas hembra los efectos protectores de la experiencia previa de control frente a una nueva situación estresante incontrolable que típicamente se observan en machos (Baratta et al. 2018; 2019).

4.2. Controlabilidad, eje HPA y procesamiento

Considerando que los niveles de ACTH y, en menor medida, los de corticosterona son sensibles a la intensidad del estímulo estresante (Armario et al. 2012), cabría esperar que los niveles de estas hormonas fuesen más bajos tras la exposición a estímulos estresantes controlables que tras la exposición a estímulos incontrolables. Sin embargo, ni los niveles de ACTH, ni los de corticosterona difieren tras la exposición aguda al estrés controlable respecto al incontrolable utilizando el modelo clásico de choque escapable/inescapable en la cola (Maier et al. 1986), ni en una tarea de escape usando la caja lanzadera en ratones (Prince y Anisman 1990). Tampoco se observan diferencias entre ambas condiciones en la expresión de CRH, ni en la de neuronas que coexpresan CRH y AVP en el PVN (Helmreich et al. 1999). Aunque esto es así en los estudios utilizando la metodología clásica de la indefensión aprendida, sí se han encontrado diferencias en la respuesta del eje HPA tras la exposición a estímulos estresantes controlables utilizando otros procedimientos.

En una situación de la que sólo se puede escapar del choque eléctrico usando un procedimiento similar al seguido en la caja operante (*lever press*), sí se encontró una reducción en la liberación periférica de adrenalina, noradrenalina y corticosterona en el grupo CST respecto al UST (Swenson y Vogel 1983). La influencia del control también se manifiesta cuando la tarea permite la evitación. La experiencia repetida de control en una caja operante (*disk pull*), tras cinco sesiones da lugar a niveles de corticosterona más bajos en los sujetos CST que en los UST, sin diferencias de los CST con los NS (Tsuda y Tanaka 1985). Resultados de nuestro grupo indican que la exposición repetida durante la adolescencia a estrés controlable (escape y evitación) da lugar a una menor respuesta del eje HPA a la prueba de TWAA en comparación con la exposición repetida a estrés incontrolable en la última sesión, aunque no en la primera (Sanchís-Ollé et al. 2019). En la misma línea, Lucas y colaboradores (2014) observaron que 24 h después de finalizar la exposición repetida a TWAA, los niveles de corticosterona en condiciones basales eran más elevados en el grupo UST. No obstante, aunque hay otros autores que no encuentran cambios en la respuesta de corticosterona tras la experiencia repetida en la TWAA (Mormede et al. 1988), la posibilidad de evitar, la experiencia repetida o la complejidad de la tarea podrían ser claves para la sensibilidad del eje en la detección de la controlabilidad.

El procesamiento de los estímulos estresantes emocionales o mixtos en el SNC, es altamente complejo e involucra a muchas áreas. En la respuesta diferencial a choques controlables/incontrolables (**figura 6**) parecen ser especialmente relevantes el DR, la amígdala, el estriado y la mPFC (Maier y Seligman 2016). La activación del DR desencadena la respuesta de miedo caracterizada por la petrificación o activación del sistema simpático (Maier 2015). El DR actúa mediante proyecciones serotoninérgicas que estimulan la actividad de la amígdala, implicada en la respuesta de miedo, e inhiben la parte dorsal de la sustancia gris periacueductal (PAG), encargada de la respuesta de afrontamiento activo. Tras la exposición a choques controlables o incontrolables el DR recibe las mismas señales procedentes de las neuronas liberadoras de CRH del BNST, de las proyecciones glutamatérgicas de la habénula y de las noradrenérgicas del locus coeruleus. Sin embargo, cuando la situación es controlable, se incorpora un nuevo protagonista: la mPFC. La PrL envía proyecciones glutamatérgicas al DR que contactan con neuronas GABAérgicas, que a su vez inhiben las neuronas serotoninérgicas del núcleo, bloqueando así la respuesta del DR al choque eléctrico. La PrL no actúa sola en condiciones de controlabilidad, sino que cuenta con la colaboración del estriado dorsal-medial, implicado en la detección de la contingencia entre la respuesta y el refuerzo. La conexión PrL-DR explica la inmunización tras la experiencia de control pues se vuelve a activar incluso en situaciones en las que el estímulo estresante ya no es controlable (Maier 2015; Maier y Seligman 2016).

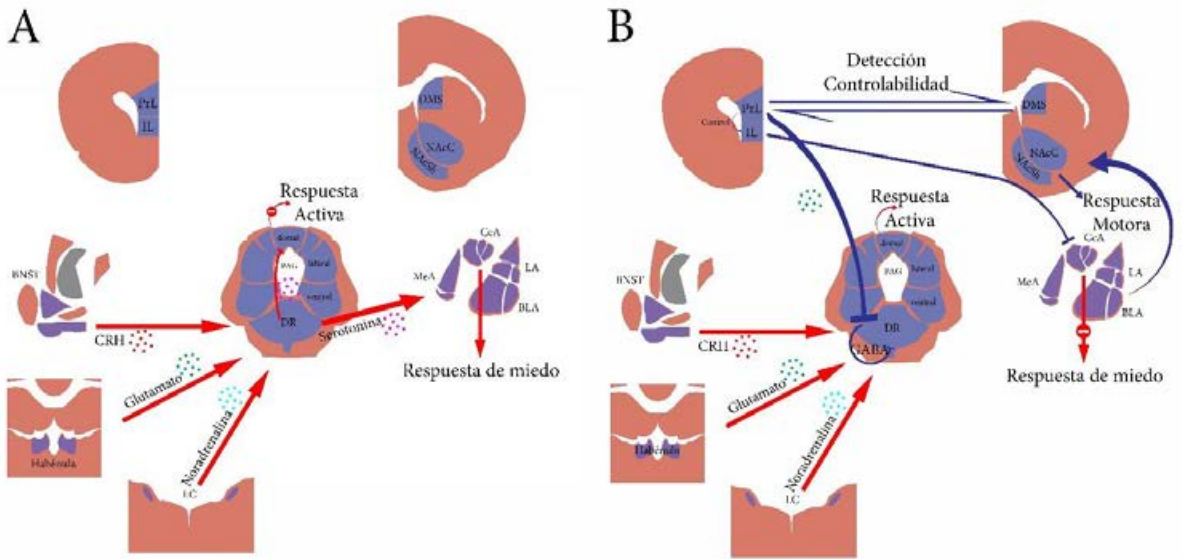


Fig. 6. Circuito implicado en la respuesta a estímulos controlables.

La figura A muestra las vías que provocan la exposición a un estímulo incontrolable. En el núcleo del rafe dorsal (DR) convergen proyección del BNST (CRH), de la habénula (glutamato) y del locus coeruleus (noradrenalina). Estas señales son procesadas en el DR que inhibe por un lado la activación del PAG dorsal y con él, la respuesta de afrontamiento activa, por otro lado, envía proyección serotoninérgica a la amígdala que acaban provocando la respuesta de miedo por la CeA. Sin embargo, cuando la controlabilidad está disponible (figura B) es detectada por el estriado dorsal-medial (DMS) y la PrL. La PrL manda proyecciones glutamatérgicas al DR, donde estimulan neuronas GABAérgicas que inhiben la activación de este. Una vez inhibido el DR, la PAG dorsal puede disparar una respuesta de afrontamiento activa. Asimismo, la IL inhibe la activación de la respuesta del miedo por parte de la CeA. A su vez, la BLA envía proyecciones al NAc que facilitan la respuesta motora y, por tanto, ejercer la controlabilidad.

La mPFC puede modular la actividad de la amígdala de forma indirecta a través del DR y directa a través de las proyecciones desde la IL. Aunque la IL no parece implicada en la detección de la controlabilidad, la IL y la PrL están interconectadas. Maier (2015) plantea que en presencia de control, la IL enviaría señales glutamatérgicas a las células intercaladas de la amígdala, que a su vez envían señales GABAérgicas inhibitorias a la CeA, reduciendo de esta manera la respuesta de miedo. De hecho la inhibición de la CeA por la IL es clave en la respuesta de evitación activa en la caja lanzadera (LeDoux et al. 2017). La inhibición de la CeA por la IL podría ser importante en los efectos protectores de la controlabilidad, ya que reduce la respuesta de miedo condicionado posterior a los choques y facilita los procesos de extinción. Pero no todos los núcleos de la amígdala juegan un papel desencadenante de la respuesta de miedo. En situaciones de estrés controlable (TWAA) la BLA manda señales al NAc que son necesarias para el desempeño en una tarea de

estrés controlable (LeDoux et al. 2017). De hecho, la actividad dopaminérgica y la activación de los receptores D1 en el NAc es clave para la ejecución (*lever press*) de una tarea de evitación activa (McCullough et al. 1993; Wenzel et al. 2018). El papel del sistema dopaminérgico no se circunscribe al NAc, dado que en animales deficientes en DA, que son incapaces de aprender la TWAA, lo consiguen si se reinstaura la actividad dopaminérgica en todo el estriado y en la amígdala, pero no si se hace solo en el NAc (Darvas et al. 2011). La actividad dopaminérgica también es relevante en la mediación del mPFC en la respuesta a estrés controlable (evitación activa en caja de *Skinner*) (Sokolowski y Salamone 1994). La disrupción de la actividad dopaminérgica en la mPFC provoca déficits en la conducta de escape, pero, sorprendentemente, no en la de evitación.

Los circuitos que acabamos de mencionar intervienen en los efectos del control, pero no en los de otras condiciones como la presencia de señales de seguridad. La introducción de señales de seguridad en un protocolo de choques eléctricos inescapables amortigua el impacto negativo sobre la exploración social producido por los choques, pero en este caso parecen ser clave las conexiones entre la ínsula posterior y la amígdala, y no el circuito implicado en la controlabilidad (Christianson et al. 2012; 2014).

4.3. Controlabilidad y sus implicaciones funcionales en humanos

¿Podemos extrapolar las conclusiones obtenidas en el modelo animal al ser humano? El déficit provocado por la experiencia previa con estrés incontrolable en la adquisición de una tarea operante en una nueva situación controlable también fue observado en humanos por Seligman (Maier y Seligman 2016). Pero más allá de la experiencia previa con estímulos estresantes incontrolables, es de gran relevancia la interpretación que el sujeto hace de la situación estresante. En función de si la falta de control se atribuye a causas circunstanciales específicas de la situación o a causas generales, el resultado será diferente. Los individuos que atribuyan la falta de control a causas circunstanciales no desarrollarán indefensión aprendida perdurable, mientras que los que lo atribuyan a causas generales desarrollarán indefensión aprendida generalizada. La percepción de control sobre las situaciones estresantes es lo opuesto a la indefensión y protege frente a los futuros eventos estresantes, favoreciendo la resiliencia del individuo. Fuera de las situaciones de laboratorio, el estatus socioeconómico se ha utilizado como un indicador

de experiencias repetidas con situaciones controlables (estatus socioeconómico alto) o incontrolables (estatus socioeconómico bajo). Aunque es un marcador discutible, las personas con un estatus socioeconómico bajo tienen mayor tendencia a desarrollar trastornos del estado de ánimo relacionados con el estrés y el abuso de sustancias (Moscarello y Hartley 2017). La generalización y/o la experiencia repetida con situaciones sobre las que no es posible ejercer control pueden incrementar la vulnerabilidad del ser humano a sufrir un trastorno mental; por lo tanto, la percepción de controlabilidad sí parece ser a priori importante para el ser humano.

Cuando en el laboratorio se comparan situaciones incontrolables y controlables, las primeras incrementan los sentimientos negativos de rabia, depresión e indefensión (Markus et al. 2000; Müller 2011), tienen efectos negativos sobre las funciones ejecutivas (Henderson et al. 2012) y empeoran la extinción de la memoria de miedo (Hartley et al. 2014). Estudios de neuroimagen han observado que la mPFC, la amígdala y el estriado están implicadas en la respuesta a estímulos estresantes controlables (Moscarello y Hartley 2017), lo que sugiere áreas similares a las implicadas en roedores. La percepción de control reduce la sensación de dolor tras la exposición a un estímulo aversivo, y esto va asociado a cambios en la activación de la mPFC, la ínsula y la PAG (Salomons et al. 2004; 2007). En situaciones en las que no hay posibilidad de ejercer control, el uso de un estilo de afrontamiento centrado en la modificación de la emoción subyacente a la situación también reduce la percepción del dolor, con un incremento paralelo en la activación de la mPFC (Salomons et al. 2007). La corteza prefrontal también es importante en la regulación de la respuesta de miedo en situaciones estresantes controlables, no sólo en sujetos sanos, sino también en pacientes fóbicos (Kerr et al. 2012). La experiencia previa de control en una tarea de evitación activa reduce la respuesta de condicionamiento de miedo durante la exposición posterior a un nuevo estímulo aversivo y esta respuesta va acompañada de una mayor activación del estriado y de la corteza prefrontal ventral-medial en los sujetos CST que en los UST (Boeke et al. 2017).

En humanos, el eje HPA podría ser más sensible a la controlabilidad que en roedores. Müller (2011) observó un incremento en los niveles de cortisol en saliva en el grupo UST, pero no en el CST, tras una experiencia de estrés agudo controlable/incontrolable. De hecho, otros autores han observado una

correlación negativa entre la percepción de control y los niveles de cortisol tras la exposición a un estímulo estresante (Kern et al. 2008; Sugaya et al. 2012).

A pesar de las diferencias en las técnicas y procedimientos utilizados entre animales y humanos, los datos parecen indicar cierto paralelismo en el procesamiento por el SNC de los estímulos estresantes controlables, así como en sus consecuencias. No obstante, es de esperar un mayor impacto en términos biológicos y conductuales, en humanos dada su mayor capacidad de procesamiento cognitivo.

5. La adolescencia

La adolescencia comprende una etapa de profundos cambios biológicos, cognitivos y conductuales que trasladan al individuo de la infancia a la edad adulta (**figura 7**). Aunque hay autores que consideran que es una etapa exclusiva del desarrollo del ser humano, cambios comparables se dan en otras especies, por lo que podemos asumir que la adolescencia no es exclusiva de nuestra especie (Spear 2000). No hay límites claros en el inicio y el fin de la adolescencia, pero actualmente se considera que, en sentido amplio, la etapa adolescente en humanos abarca aproximadamente de los 10 a los 24 años (Sawyer et al. 2018), y en roedores del día postnatal (PND) 21 al 60 (Laviola et al. 2003; Tirelli et al. 2003). En roedores el periodo adolescente puede subdividirse en: adolescencia temprana o preadolescencia (PND 21-34), adolescencia intermedia o periadolescencia (PND 34-46) y adolescencia tardía (PND 46-59) (Lupien et al. 2009). Los estímulos presentados durante la adolescencia son procesados por un organismo inmaduro y el impacto de éstos puede variar la trayectoria madurativa del individuo, dando lugar a un periodo de vulnerabilidad, pero quizás también de oportunidad (Andersen 2003). De hecho, durante el proceso madurativo, una estimulación incorrecta lo es tanto por exceso como por defecto y puede dar lugar a desviaciones respecto al desarrollo óptimo (Andersen 2015).

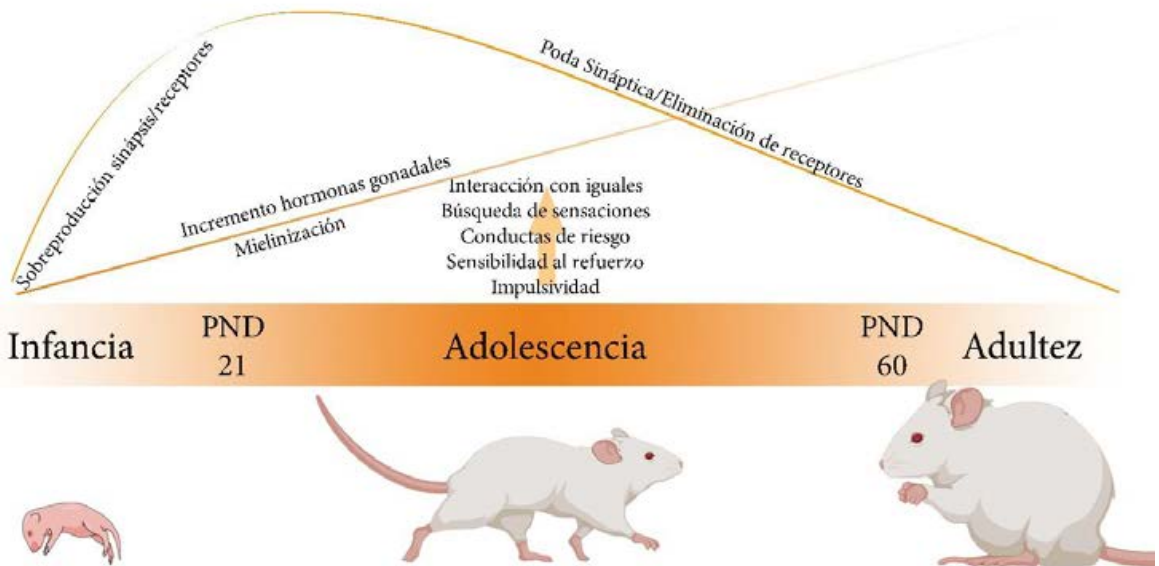


Fig. 7. Cambios durante la adolescencia.

El periodo adolescente en ratas comprende del PND 21 al 60. Durante este período se dan una serie de cambios fisiológicos y conductuales. Entre los cambios fisiológicos se da un incremento progresivo en el número de sinapsis de la infancia a la adolescencia, seguido de una reducción de estas mediante la poda sináptica. Algo similar ocurre con el número de receptores, los cuales sufren un incremento, seguido de un descenso hasta alcanzar los niveles de la edad adulta. Por su parte el proceso de mielinización se incrementa, y con él, el volumen de sustancia blanca, optimizando así las conexiones neuronales. Las hormonas gonadales también se incrementan durante esta etapa hasta la edad adulta. A nivel conductual, se observa durante el período adolescente: un incremento en la interacción con iguales, en la búsqueda de sensaciones, en la adhesión a conductas que implican un riesgo para el individuo, en la sensibilidad al refuerzo y en la impulsividad.

5.1. Pubertad, cambios neuroendocrinos y del eje HPA

El término pubertad se utiliza muchas veces de forma errónea como sinónimo de adolescencia. Aunque la pubertad ocurre durante la adolescencia y suele marcar el inicio de la misma, está más limitada temporalmente y no incluye todos los cambios que ocurren durante la adolescencia (Spear 2000). La pubertad está ligada a la maduración sexual y, por tanto, a la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Este eje viene controlado por neuronas que contienen la hormona liberadora de gonadotropina, situadas principalmente en el área preóptica y en el núcleo arqueado del hipotálamo, las cuales estimulan la liberación de las hormonas luteinizante y foliculoestimulante por

parte de la adenohipófisis. Estas hormonas hipofisarias alcanzan las gónadas vía sanguínea, participando en la formación de gametos y la liberación de hormonas esteroides sexuales (Sisk y Foster 2004). El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal está activo durante las primeras fases de maduración (prenatalmente en humanos), propiciando el dimorfismo sexual corporal y cerebral. Posteriormente reduce su actividad hasta la adolescencia, cuando vuelve a incrementarse dando lugar a la maduración sexual.

De igual modo que ocurre en el ser humano, en roedores las hembras alcanzan la madurez sexual antes que los machos (Schneider 2008). En ratas hembras la maduración es determinada por la apertura vaginal completa y la primera ovulación, que aparecen entre el PND 28 y 40, mientras que en los machos lo es por la separación balano-prepucio y la presencia de espermatozoides maduros en los conductos deferentes, que se dan entre el PND 36 y 60.

Durante la adolescencia, junto al incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (y ligeramente antes de dicho incremento) también se observa un pico en las hormonas adrenales y en la tasa de crecimiento, dando lugar a lo que se conoce popularmente como “el estirón” (Blakemore et al. 2010). El pico en las hormonas adrenales favorece el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y ayuda al proceso de crecimiento. A diferencia del pico en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y en la tasa de crecimiento, que es común a numerosos mamíferos, el pico en las hormonas adrenales podría ser exclusivo del ser humano y otras especies de primates no humanos, dado que no hay evidencias claras de que ocurra en otros mamíferos (Spear 2000). A pesar de no haber evidencias claras de un pico de hormonas adrenales en roedores de laboratorio, sí se ha observado una respuesta diferencial del eje HPA al estrés en adolescentes respecto a adultos (Lupien et al. 2009; Rincón-Cortés et al. 2019).

La respuesta del eje HPA en roedores

Goldman y colaboradores (1973) describieron por primera vez una respuesta más prolongada de corticosterona a estímulos como el choque eléctrico y el éter en ratas adolescentes respecto a adultas, pero no frente a un estímulo de baja intensidad como el OF. Estos cambios iban acompañados por un déficit en los mecanismos de retroinhibición del eje HPA. Tras este estudio pionero, otros autores han mostrado de forma consistente niveles de corticosterona

más elevados durante el periodo de recuperación post-estrés en ratas adolescentes respecto a adultas (Romeo et al. 2004a; 2004b; 2006a; 2006b; 2014; Brunell y Spear 2005; Foilb et al. 2011; Lui et al. 2012). Aunque tiende a hablarse de mayor respuesta del eje HPA, en realidad las diferencias en la respuesta de corticosterona no suelen venir acompañadas de diferencias en la respuesta de ACTH (Armario et al. 1987; Romeo et al. 2004a; 2004b; 2014). Este hecho podría deberse a cambios en la expresión del receptor tipo 2 de melanocortina de la corteza adrenal sobre el que actúa la ACTH, que parece estar más elevada en adolescentes (Romeo et al. 2014), aunque se necesitarían más estudios para confirmar estos datos. Por otro lado, la respuesta hormonal a estrés no está siempre más exacerbada en adolescentes que en adultos. Tras la exposición a un estímulo estresante inmunitario como es la administración de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido), se observa una respuesta más prolongada de la corticosterona en adultos (Goble et al. 2011). Este mismo patrón de mayor respuesta en adultos que en adolescentes se observa también en la respuesta a la administración de distintas sustancias como la nicotina (Cao et al. 2010), la paroxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (Karanges et al. 2016) o el etanol, especialmente en hembras (Willey et al. 2012) sin diferencias en la respuesta a otras sustancias como el tetrahidrocannabinol (Schramm-Sapyta et al. 2007).

A pesar de que la respuesta de ACTH prácticamente no difiere entre adultos y adolescentes, la activación del PVN tras la exposición a estrés, evaluada mediante la expresión Fos, es superior en adolescentes que en adultos (Viau et al. 2005; Romeo et al. 2006a; Lui et al. 2012) y tarda más en desaparecer tras la finalización del estímulo estresante (Hodges et al. 2014). No solo se activa más el PVN, sino en concreto las neuronas CRH+ (Romeo et al. 2006a). Respecto a la activación de la adenohipófisis, no conocemos ningún estudio que haya analizado la respuesta de las células corticotropas a la administración exógena de CRH o AVP, por lo que no sabemos cómo afectan las diferencias en la activación del PVN a la liberación de ACTH por la adenohipófisis.

Puesto que el patrón de activación del eje HPA puede variar en función del estímulo, las diferencias en la respuesta del eje HPA entre adolescentes y adultos no pueden deberse simplemente a cambios en la sensibilidad de las células corticotropas de la adenohipófisis o en la expresión de los receptores tipo 2 de melanocortina en la corteza adrenal, sino que vendría mediada por cambios en el procesamiento de los estímulos en el SNC. De hecho, el patrón

de activación del SNC en respuesta a estímulos estresantes y farmacológicos difiere entre adolescentes y adultos, y este patrón diferencial incluye áreas implicadas en la regulación de la respuesta de estrés (Kellogg et al. 1998; Novak et al. 2007; Varlinskaya et al. 2013a; Karanges et al. 2016).

Los animales adolescentes podrían también diferir de los adultos respecto a la adaptación del eje HPA a estímulos estresantes repetidos. Los estudios que comparan la adaptación homotípica entre adolescentes y adultos y analizan solo la respuesta de la corticosterona observan menores niveles de adaptación en los adolescentes (Doremus-Fitzwater et al. 2009; Lee y Hill 2013). Sin embargo, cuando se incluyen los niveles de ACTH y corticosterona el patrón es más complicado. Gómez y colaboradores (2002) observaron que la adaptación de la respuesta de ACTH a inmovilización en tubo era más pronunciada que la de corticosterona en adolescentes, siendo los niveles de ambas hormonas superiores en adolescentes que en adultos. Sin embargo, en otro estudio utilizando el mismo estímulo (Romeo et al. 2006a), ninguna de las dos hormonas mostraba adaptación tras la finalización de la exposición a estrés en adolescentes, aunque la recuperación post-estrés era más rápida tras la experiencia repetida en ambas hormonas. En cambio, en adultos se observaba adaptación de la respuesta al acabar la exposición a estrés, pero, a los 45 min los valores no habían vuelto aún a los niveles basales, algo que sí había ocurrido en los adolescentes.

Son muy escasos los estudios que comparan la respuesta del eje HPA a estímulos heterotípicos tras una historia de estrés crónico en adultos y adolescentes. Lui y colaboradores (2012) no observaron sensibilización de la respuesta de la ACTH a la inmovilización en tubo (estímulo heterotípico) tras la exposición repetida a una cámara fría (30 min durante 7 días) ni en adultos ni adolescentes, aunque sí una recuperación más lenta de los niveles de corticosterona en los animales adolescentes respecto a los adultos, independientemente de la experiencia previa. Jankord y colaboradores (2011) estudiaron la respuesta de la corticosterona a la FST en animales con una historia previa de 14 días de CUS (sin estar incluido el nado entre los estímulos que componían el CUS). Observaron en los adultos una sensibilización que no era tan evidente en los animales adolescentes. Otros datos tampoco encuentran sensibilización en animales expuestos a CUS durante la adolescencia, aunque la evaluación se realizó 5 semanas después (Cotella et al. 2019). Sin embargo, sí la observaron en adultos expuestos exactamente al mismo protocolo

experimental. Otros estudios en los que no hay comparación directa con animales adultos, sí observan sensibilización en la respuesta hormonal a estímulos heterotípicos tras estrés crónico en la adolescencia (Eiland et al. 2012). En conjunto es difícil extraer conclusiones de las posibles diferencias en la sensibilización heterotípica entre adolescentes y adultos.

En cuanto a las diferencias entre adolescentes y adultos en otras consecuencias de estrés crónico, como la pérdida de peso, hipertrofia adrenal o atrofia del tiempo, los resultados no son siempre fáciles de interpretar. Durante la adolescencia, el crecimiento es muy superior al de la adultez en la que el crecimiento se va estabilizando progresivamente, por lo que el incremento de peso (en ausencia de estrés) es muy superior en los adolescentes, lo que dificulta la comparación de datos entre ambas etapas si se presentan los resultados solo en términos relativos. Así en adolescentes suele observarse una reducción en la ganancia de peso, mientras que en adultos puede verse una pérdida de peso (Doremus-Fitzwater et al. 2009; Jankord et al. 2011; Sadler y Bailey 2016). En cualquier caso, cuando se dan datos sobre los cambios en el peso absoluto, las diferencias entre el grupo control y el grupo estrés son similares en ambas edades (McCormick et al. 2005; Jankord et al. 2011). Respecto a los cambios en el peso de las adrenales y del timo los resultados no son claros, observándose cambios similares (Jankord et al. 2011; Sadler y Bailey 2016) o superiores (Hetzl y Rosenkranz 2014; Duarte et al. 2015) en adolescentes, quizás dependientes del modelo animal y el paradigma de estrés utilizado.

En conjunto, los datos durante la adolescencia parecen indicar mayor reactividad al estrés del eje HPA (al menos a ciertos niveles), una alteración en los mecanismos de retroinhibición del eje HPA y una menor adaptación a la exposición repetida al mismo estímulo estresante, pero hay excepciones en este patrón. Además, los cambios en el eje HPA no parecen asociados a diferencias claras en los efectos somáticos más característicos de la exposición a estrés. Son necesarios más estudios incluyendo más variables fisiológicas sensibles al estrés para definir las diferencias entre adultos y adolescentes en la respuesta del eje HPA y las consecuencias de la exposición a estrés.

5.2. Adolescencia y SNC

Se considera que durante la adolescencia terminan los procesos madurativos del SNC en humanos y otros mamíferos. Estudios en humanos y animales

indican que durante esta etapa la materia gris y la materia blanca siguen una trayectoria madurativa diferente. La materia gris en conjunto muestra un aumento progresivo en volumen durante la infancia (sinaptogénesis), pero se reduce durante la adolescencia debido a la poda sináptica, mientras que la materia blanca sigue una progresión lineal ascendente (Lenroot et al. 2007; Brenhouse y Andersen 2011). La poda sináptica y el incremento en la materia blanca del cerebro (debido a la mielinización) tienen el mismo objetivo: la optimización del funcionamiento del SNC (Spear 2013). La sinaptogénesis inicial da lugar a una sobreproducción de sinapsis que son eliminadas por la poda sináptica, que representa un proceso de refinamiento de la arborización dendrítica y sus conexiones (Brenhouse y Andersen 2011). El proceso de maduración es región-dependiente y cambia en magnitud según la subdivisión estudiada y el sexo. La poda sináptica acaba al final de la adolescencia/inicio de la edad adulta con la maduración de las áreas implicadas en el procesamiento de funciones ejecutivas más elevadas, como es el caso de la corteza prefrontal (Gogtay et al. 2004).

Como el proceso madurativo es región-específico, durante la adolescencia puede desregularse el balance entre diferentes circuitos, lo cual conlleva la aparición de un fenotipo conductual característico. Ernst y Fudge (2009) plantearon que la aparición de este fenotipo se debe a un desequilibrio en la regulación que ejerce la mPFC sobre el estriado y la amígdala (modelo triádico) provocado por las diferencias temporales en los procesos madurativos de cada área. Si este circuito se decanta por la activación del estriado da lugar a conductas de aproximación, mientras que si lo hace por la amígdala da lugar a conductas de evitación. Durante la adolescencia se produce una desregulación que favorece las conductas de aproximación, así como una mayor sensibilidad a los estímulos reforzantes y a una menor sensibilidad a las posibles consecuencias aversivas. Sin embargo, en los adolescentes la amígdala es más reactiva a los estímulos sociales con carga negativa que los adultos (Spear 2013), por lo que el sesgo hacia conductas de aproximación podría no ser universal, sino depender del contexto y de las características específicas del estímulo. En este sistema triádico habría de incluirse a la FH, la cual provee de claves contextuales a la mPFC, y al sistema dopaminérgico mesolímbico-cortical que informa sobre la relevancia del estímulo (Casey 2015).

El proceso de maduración de la amígdala es lineal, incrementando su volumen de la infancia a la adolescencia (Uematsu et al. 2012). Las conexiones mPFC-amígdala también se encuentran en desarrollo durante la adolescencia (Ernst y Fudge 2009; Brenhouse y Andersen 2011). En el estriado el sistema dopaminérgico cambia durante la adolescencia a nivel pre-, intra- y postsináptico (Ernst et al. 2009). La expresión del transportador de DA (DAT) sigue una “U” invertida durante este periodo (Moll et al. 2000) y por tanto los niveles de DA en el espacio extracelular deberían ser más bajos que durante la edad adulta. Sin embargo, aunque los niveles extracelulares de DA son más bajos en PND 35 podría haber un pico sobre el PND 45 (Badanich et al. 2006). Respecto a la expresión de receptores dopaminérgicos estos también siguen una “U” invertida en el proceso de maduración (Ernst et al. 2009). Los datos parecen indicar que el grosor de la mPFC sigue una “U” invertida de la infancia a la edad adulta, aunque varía según la capa y el sexo del individuo (Brenhouse y Andersen 2011). La mPFC también presenta un incremento en la expresión de los receptores dopaminérgicos y, en el caso de los D1, este incremento es mayor en las neuronas glutamatérgicas que proyectan al NAc (Brenhouse et al. 2008; Ernst et al. 2009). En conjunto, todos estos cambios propician que durante la adolescencia la balanza se incline hacia las conductas reguladas por el estriado y, por tanto, las conductas de aproximación, dificultando durante este periodo la inhibición de la conducta desencadenada por, o en busca de, estímulos apetitivos.

El hecho de que el proceso madurativo siga trayectorias y cronologías heterogéneas en cada área implica que las posibles consecuencias de la exposición a estímulos estresantes varíen según la edad y el tipo de estímulo al que se exponga el individuo (Andersen y Teicher 2008; 2009). Por ejemplo, cuando la exposición a estrés ocurre durante la infancia se observa una pérdida en el volumen de la FH, en la preadolescencia afecta al desarrollo del sistema dopaminérgico mesolímbico y su actividad en el NAc, y durante la adolescencia reduce el volumen de la mPFC. Es importante, además, tener en cuenta el sexo del sujeto, la duración de la exposición y el momento en que se la evalúa el impacto de la exposición, ya que es necesario alcanzar un cierto nivel de maduración para que algunas de las posibles consecuencias latentes se pongan de manifiesto (Andersen 2015).

5.3. Adolescencia y cambios conductuales

No es sorprendente que los cambios a nivel endocrino y del SNC conlleven en paralelo cambios conductuales durante el período adolescente. Estos cambios conductuales, aunque pueden tener consecuencias negativas y parecer aberrantes en algunas situaciones, podrían ser necesarios para optimizar el desarrollo y la adaptación del individuo al ambiente (Casey et al. 2010).

Interacción social con iguales

Durante la adolescencia se incrementa notablemente la interacción social con iguales respecto a la interacción con adultos. Este cambio en los patrones de interacción social se da en humanos y en otras especies como primates no humanos y roedores y estaría implicado en el desarrollo de las habilidades sociales del sujeto dentro de un grupo (Spear 2000). Durante esta etapa es normal que se incrementen los conflictos entre padres e hijos y se inicien conductas antinormativas incluso en niños no especialmente problemáticos. Sin embargo, esta conducta en la adolescencia no implica que se conviertan en adultos marginales (Harris 1995).

También en roedores se observa un incremento en la interacción social con iguales durante la adolescencia (Spear 2000). En una prueba de preferencia de lugar (CPP), los animales jóvenes muestran mayor CPP por el compartimento en el que han interactuado con otros animales adolescentes, mientras que en adultos es necesario un período de aislamiento previo para que se dé este fenómeno (Douglas et al. 2004). Animales adolescentes previamente aislados (durante 10 días) muestran una interacción social muy activa, por encima de la media de los animales adolescentes no aislados. Esta conducta activa da lugar a que cuando se realiza el CPP usando animales adolescentes aislados y no aislados, los últimos muestren menos preferencia. Lo que indica que la interacción con iguales durante la adolescencia puede servir para desarrollar las habilidades sociales en roedores. En la regulación de la conducta social y su valor reforzante están implicados el sistema dopaminérgico y el NAc (Vanderschuren et al. 2016), ambos envueltos en un proceso madurativo durante la adolescencia.

Conductas de riesgo

Los adolescentes son física y mentalmente superiores a los niños y aun así la mortalidad en la adolescencia es un 200 % superior que en la infancia (Casey et al. 2010). Este incremento de la mortalidad no es consecuencia de un

incremento en la susceptibilidad a las enfermedades, sino que un 85 % de las muertes se deben a homicidios, suicidios y accidentes (Spear 2000). Durante la adolescencia se incrementan las conductas que conllevan un riesgo considerable, dado que el adolescente es más temerario, busca más sensaciones y toma más riesgos en diferentes escenarios. En esta etapa se incrementan el número contagios de enfermedades de transmisión sexual y de embarazos no deseados, así como el uso de sustancias recreativas. La adopción de conductas de riesgo o peligrosas, a pesar de sus posibles consecuencias negativas, son parte del desarrollo del individuo y pueden tener un valor adaptativo, ya que permiten explorar conductas características de la edad adulta y sus privilegios (Spear 2000). Los adolescentes son más sensibles al refuerzo positivo, especialmente en un contexto social, lo cual favorece las conductas de aproximación, a pesar del riesgo que puedan implicar (Casey 2015).

Las conductas de riesgo no son exclusivas del ser humano (Spear 2000; Casey 2015). En primates no humanos, encontramos conductas similares durante la adolescencia. Es común la migración a otros grupos durante la adolescencia, lo cual implica adentrarse en terreno desconocido y probar fuentes de alimentación novedosas. Estas conductas de riesgo permiten expandir el círculo social, adquirir experiencia en el rol de adulto, sobrevivir en un contexto nuevo alejado del ambiente familiar y aumentan las posibilidades de encontrar una pareja sexual, por lo que estas conductas tendrían un valor evolutivo para la supervivencia de la especie y el desarrollo del individuo. En animales de laboratorio se observa un incremento en la exploración de contextos/objetos nuevos (Adriani et al. 1998; Douglas et al. 2003; Stansfield y Kirstein 2006), y de los brazos abiertos (peligrosos) del EPM (Laviola et al. 2003), una mayor sensibilidad a los estímulos apetitivos tanto naturales (Friemel et al. 2010) como farmacológicos, incluyendo una menor sensibilidad a las consecuencias negativas del consumo de drogas, especialmente en presencia de iguales (Doremus-Fitzwater y Spear 2016).

Desarrollo cognitivo y autocontrol

Los adolescentes tienen problemas para autocontrolarse cuando hay posibilidades de obtener un refuerzo inmediato (impulsividad), respecto a la posibilidad de obtener un refuerzo superior pero demorado en el tiempo (Casey et al. 2010). Para la capacidad de autocontrol son importantes las funciones ejecutivas implicadas en la resolución de problemas y consecución de objetivos (Luciana 2013). Las funciones ejecutivas son dependientes de la

corteza prefrontal y se pueden agrupar en tres: control inhibitorio (suprimir acciones inadecuadas), flexibilidad cognitiva (cambio conductual según la demanda ambiental) y memoria de trabajo (procesamiento y manipulación de la información para lidiar con las demandas ambientales).

Durante la adolescencia, tanto en roedores como en humanos, la capacidad para tomar decisiones es más vulnerable que durante la edad adulta, especialmente en situaciones que impliquen un alto contenido emocional (Spear 2000; Luciana 2013) o en presencia de iguales (Casey 2015). La capacidad para autorregular la conducta se incrementa desde la infancia a la adultez. Cuando autorregular la conducta significa suprimir un refuerzo para conseguir un objetivo más a largo plazo, el control es frágil, especialmente durante la adolescencia (Casey et al. 2010). Sin embargo, al menos en humanos, no hay diferencias entre adolescentes y adultos en la capacidad de autorregulación cuando no hay contenido emocional en la tarea (Casey y Caudle 2013).

En tareas apetitivas, las ratas adolescentes presentan una conducta orientada a objetivos y están dispuestas a realizar un esfuerzo mayor que las adultas si eso conlleva conseguir un refuerzo mayor (Doremus-Fitzwater y Spear 2016). Al estar orientados a objetivos son más sensibles a los cambios en la contingencia que los animales adultos, que forman más rápido hábitos y tienen más dificultades para modificar la conducta (Doremus-Fitzwater y Spear 2016). También en humanos, cuando el refuerzo es suficientemente motivador, los adolescentes son capaces de regularse y realizar la tarea incluso mejor que los adultos (Casey 2015).

Por último, en el ser humano se observa a lo largo de la adolescencia un cambio cualitativo en la forma de procesar la información hacia el pensamiento abstracto, lógico e idealista (Baird y Fugelsang 2004). Este cambio implica mayor autoconsciencia sobre nuestros pensamientos y sus consecuencias, lo que favorece la autorregulación del sujeto adolescente a medida que desarrolla este tipo de pensamiento, siendo más hábiles en la autorregulación en aquellas tareas en las que son más expertos.

Regulación emocional

Las emociones son centrales para el funcionamiento del individuo, ya que influyen en la atención, la implicación y el aprendizaje de una tarea. Durante la adolescencia se incrementa la intensidad, la frecuencia y la volatilidad de las

emociones, sobre todo en un contexto social, junto a una mayor dificultad para regularlas y reevaluarlas cognitivamente. En esta etapa nos enfrentamos a situaciones en las que se experimentan emociones novedosas y en contextos nuevos, lo cual incrementa la dificultad para regular la respuesta emocional y afectiva (Guyer et al. 2016). Si tenemos presente la confluencia de factores como la alta sensibilidad al entorno social, el incremento de conductas de riesgo y la falta de autorregulación, no es de extrañar que durante esta etapa se incremente el número de individuos que sufren un trastorno psicopatológico (Monahan et al. 2016).

El miedo es una de las respuestas emocionales básicas y activa la respuesta de estrés (Rodrigues et al. 2009). La respuesta de miedo se dispara ante estímulos amenazantes aprendidos o no aprendidos. A pesar de ayudarnos a sobrevivir, una mala regulación del miedo puede provocar la aparición de diferentes psicopatologías como ansiedad, fobia o trastorno de estrés postraumático (LeDoux 1995). Sobre cómo es adquirida, expresada, consolidada y extinguida la memoria del miedo se han llevado a cabo numerosos estudios en adultos, y más recientemente en infantes (Pattwell y Bath 2017). A pesar del pico de psicopatológicas asociadas al miedo durante la adolescencia los estudios sobre la memoria del miedo en esta etapa son menos numerosos que los realizados en la edad adulta y la infancia.

Los resultados acerca de la respuesta del miedo durante la adolescencia varían según el modelo animal. En ratones no se han observado diferencias en la adquisición de miedo condicionado al contexto en adolescentes respecto a adultos (Pattwell et al. 2011). No obstante, sí que se ha observado una reducción de su expresión al día siguiente, diferencia que desaparece si la evaluamos trece días más tarde. Sin embargo, Arakawa (2019) no encontró diferencias entre ratones adolescentes y adultos en la expresión de miedo al contexto a las 24 h. Estudios en rata reflejan un incremento en las respuesta de miedo al contexto en adolescentes respecto a infantes (Rudy y Morledge 1994; Robinson-Drummer y Stanton 2014), sin diferencias respecto a los adultos (Land y Spear 2004). Respecto al miedo condicionado al tono, se observa un incremento respecto a adultos e infantes cuando se usa un condicionamiento de traza en lugar de uno demorado (Hunt et al. 2006; Den y Richardson 2013). De los distintos componentes del proceso de miedo condicionado, la extinción es el periodo en el que más consistentemente se han observado alteraciones durante la adolescencia. Tanto en modelos animales (Hefner y Holmes 2007;

Kim et al. 2011; Pattwell et al. 2012), como en humanos (Pattwell et al. 2012; Drysdale et al. 2014; Johnson y Casey 2015), se ha observado mayor resistencia a la extinción respecto a los adultos. Esta resistencia a la extinción, se ve potenciada si exponemos a los animales adolescentes a estrés agudo inmediatamente antes de la sesión de condicionamiento de miedo (Barbayannis et al. 2017). Una última diferencia en la respuesta de miedo la encontramos en la generalización del miedo al CS (tono), que es mayor en ratones adolescentes que en adultos (Ito et al. 2009). Esta mayor generalización al tono también se observa en ratas, pero sólo si han sido expuestas a estrés crónico (inmovilización en tubo) antes de la sesión de adquisición de miedo condicionado (Padival et al. 2015).

6. Modelos de estrés adolescente

Para el estudio de las consecuencias de la exposición a estrés durante la adolescencia se han utilizado distintos modelos. Las diferencias entre modelos se basan en el momento de la exposición, el programa de estrés, la cualidad e intensidad de los estímulos, la especie, la cepa, el sexo de los animales y el periodo de la evaluación de las consecuencias. De cara a nuestro trabajo debemos hacernos varias preguntas. ¿Qué influye en la valencia (efectos positivos *vs* negativos) de las consecuencias de la exposición a estrés? ¿Los efectos son volátiles o perduran en el tiempo? ¿Se expresan de forma inmediata o necesitan un tiempo de incubación para aparecer?

Respecto a los diferentes modelos de estrés adolescente en ratas (modelo en el que nos centraremos a partir de ahora), no existe un criterio claro para desarrollar la discusión, por lo que cualquier agrupación puede estar sujeta a críticas. En nuestro caso los clasificaremos en varios bloques. En el primero de ellos repasaremos los escasos estudios que exploran la controlabilidad. En el segundo discutiremos los modelos que utilizan un mismo estímulo estresante de forma repetida, generalmente inmovilización en tubo o choque eléctrico en las patas. Estos modelos permiten estudiar no solo los efectos de la exposición a estrés adolescente, sino también fenómenos como adaptación y sensibilización. El tercero incluye los modelos de CUS, en sus versiones largas y cortas. El cuarto comprende los modelos de estrés social con sus diferentes variantes. De igual forma que otros modelos animales en biología, los estudios sobre los efectos del estrés durante la adolescencia se han llevado a cabo principalmente en machos (Rincón-Cortés et al. 2019), por lo que, salvo que

se especifique lo contrario, los resultados que comentaremos harán referencia a ese sexo.

6.1. Controlabilidad durante la adolescencia

Dado que durante la adolescencia están en proceso de maduración áreas claves en la detección del control en situaciones estresantes, como el estriado dorsal-medial y la PrL, los adolescentes podrían no ser capaces de detectar y ejercer control sobre este tipo de situaciones. La exposición al modelo de la triada durante la adolescencia indica que tanto machos como hembras son sensibles a la controlabilidad, ya que ésta les protege de desarrollar indefensión aprendida (Leussis y Andersen 2008). En machos, los animales adolescentes del grupo UST muestran a corto plazo una reducción de la interacción social, indicando efectos ansiogénicos o anhedónicos, mientras que los del grupo CST muestran tasas de interacción social superior a las del grupo NS (Kubala et al. 2012). Los efectos observados en el grupo CST, pero no los del UST, perduran hasta 35 días después de la exposición. Los CST, son además resilientes a una exposición a estrés incontrolable durante la edad adulta. En este mismo estudio los autores demostraron que la detección de la controlabilidad durante la adolescencia parece implicar las mismas vías del SNC (explicadas en el apartado 4) que, en la edad adulta, a pesar de la falta de maduración de algunas de las estructuras implicadas.

Los estudios antes mencionados utilizaban exposiciones agudas. ¿Qué ocurre tras la experiencia repetida de estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia? Datos de nuestro grupo indican que las consecuencias de la exposición repetida a estrés controlable/incontrolable utilizando la TWAA en el grupo CST, podrían diferir de los efectos antes comentados (Sanchís-Ollé 2018) aunque se ha de recalcar que esta tarea implica la posibilidad de evitar y no solo de escapar. La respuesta del eje HPA a la caja lanzadera se ve más amortiguada con la experiencia repetida de estrés (8 sesiones) cuando la situación es controlable (CST) que cuando es incontrolable (UST).

En nuestro estudio previo, se observó que a corto plazo la experiencia previa de estrés daba lugar a una reducción en la conducta exploratoria en un OF, siendo este efecto ligeramente amortiguado por la controlabilidad. En los animales CST, pero no en los NS o los UST, se observó un ligero incremento en la latencia a adquirir inmovilidad en la FST, pero no otros cambios conductuales en la prueba. La exposición a este paradigma no tuvo ningún

efecto a corto plazo sobre el consumo de sacarina (anhedonia) o la conducta en el EPM (asumible a la ansiedad). Sin embargo, a largo plazo los animales CST pasaron más tiempo en los brazos abiertos del EPM que los NS, lo que podría indicar un efecto ansiolítico de la experiencia previa con estrés controlable. En cambio, también a largo plazo se observó un descenso en la conducta de interacción social activa en los animales UST respecto a los otros dos grupos. Tras la exposición repetida a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia se observó, a nivel cognitivo, que los animales UST tenían preferencia por las recompensas más pequeñas pero con mayor tiempo de espera y más impulsividad motora (Sanchís-Ollé et al. 2019).

Finalmente, tras la reexposición al contexto a largo plazo se observó condicionamiento del miedo en los animales expuestos a estrés adolescente, pero éste fue más reducido en los CST (Sanchís-Ollé 2018). Como era de esperar, la experiencia repetida durante la adolescencia con la TWAA facilitó su desempeño en la edad adulta. Sin embargo, mejoró el desempeño en los animales UST respecto a los NS, aunque en menor medida que en los CST. Los datos del grupo UST son sorprendentes ya que van en contra de lo postulado por la indefensión aprendida (v.g. Maier y Seligman 2016) en la que se propone que experiencia previa con un estímulo incontrolable dificultaría la realización de una tarea posterior donde sí se puede ejercer control. No obstante, hay profundas diferencias metodológicas entre estudios. La exposición en los estudios de Maier es aguda, mientras que en nuestro caso es crónica; el choque es escapable, pero no evitable como es nuestro caso; y, por último, ellos evalúan el impacto de la falta de control en una tarea diferente a la tarea inductora.

6.2. Modelos de estrés repetido

En los modelos de estrés repetido durante la adolescencia se han utilizado principalmente la inmovilización en tubo y el choque eléctrico en las patas. En ratas adulto macho, la inmovilización en tubo es un estímulo estresante de intensidad intermedia en comparación con la IMO, dado que ésta supone una inmovilización total del sujeto y constituye un estímulo de intensidad alta (Armario et al. 1990; Campmany et al. 1996). En el caso del choque eléctrico en las patas, su intensidad como estímulo estresante y sus consecuencias dependerán en gran medida de la intensidad y duración (Rabasa et al. 2011). En cualquier caso, serán importantes la duración y el número de días de exposición, el momento de la adolescencia en el que se inicia y finaliza la exposición y cuándo se evalúan las consecuencias de éstas.

La mayoría de los estudios en rata que han utilizado la exposición a inmovilización en tubo analizan los efectos solo a corto plazo, generalmente al día o los días siguiente/s. El número de días de exposición varía de 5 a 28 días, la duración de 5 minutos a 6 horas y la edad de inicio del PND 24 al 42. La exposición repetida a inmovilización en tubo altera el patrón de interacción social (Klein et al. 2010; Varlinskaya et al. 2013a; 2018), dando lugar a un incremento en la conducta de “pelea de juego” si la exposición se limita a la adolescencia temprana (Varlinskaya et al. 2013b; 2018), mientras que si abarca la adolescencia temprana y/o a la intermedia, da lugar a una reducción de la interacción social (Klein et al. 2010; Varlinskaya et al. 2013a; 2018). La conducta exploratoria en un ambiente nuevo se ve reducida (Cruz et al. 2012), lo que podría deberse a un incremento en la ansiedad, ya que en el EPM las conductas similares a la ansiedad se ven potenciadas (Zhang y Rosenkranz 2013). Este tipo de estrés también podría resultar en un fenotipo anhedónico, evaluado por el consumo de sacarosa (Eiland et al. 2012) y es capaz de potenciar el condicionamiento de miedo a un tono, incrementando tanto la generalización del miedo (Padival et al. 2015), como la resistencia a la extinción (Zhang y Rosenkranz 2013). Pero las consecuencias no son siempre negativas. La exposición repetida a este paradigma podría incrementar el uso de estrategias de afrontamiento activo (conducta de escape) evaluadas durante la segunda exposición a un FST (Eiland et al. 2012; Suo et al. 2013).

Los efectos pueden variar si la evaluación de la conducta se hace en la edad adulta, ya que pueden observarse efectos protectores sobre la ansiedad, evaluada mediante la prueba de neofobia alimentaria y el EPM, y no generar anhedonia, así como proteger frente a algunas de las consecuencias de la exposición a CUS en la edad adulta (Suo et al. 2013).

A diferencia de la mayoría de los estudios con inmovilización en tubo, los de exposición repetida a choque eléctrico en las patas observan las consecuencias semanas después de realizar la exposición, revelando efectos duraderos. El tiempo de exposición varía entre 5 y 14 días, la edad de inicio oscila del PND 21 hasta el 35 y el de finalización desde el PND 25 al 49. La intensidad del choque fluctúa de los 0,5 mA a 1 mA. Independientemente de la edad de inicio y del protocolo utilizado, la exposición a choque eléctrico en las patas reduce la exploración en un OF (Aga-Mizrachi et al. 2014; Li et al. 2015; Lyttle et al. 2015; Kumamoto et al. 2018) y el tiempo en los brazos abiertos del EPM (Li et al. 2015; Gomes y Grace 2017), e incrementa la inmovilidad (afrontamiento

pasivo) en la segunda exposición a la FST (Aga-Mizrachi et al. 2014; Lyttle et al. 2015). Otros efectos son un incremento en la respuesta de sobresalto, empeoramiento de la inhibición prepulso, anhedonia evaluada por el consumo de sacarosa y descenso en la interacción social (Aga-Mizrachi et al. 2014). Sin embargo, otros autores han observado un incremento en la interacción social (Kumamoto et al. 2018).

A nivel cognitivo observamos déficits de memoria en un laberinto en Y (Li et al. 2015) y en la prueba de reconocimiento de objetos (Gomes y Grace 2017). Muchos de estos efectos son revertidos por la administración de fármacos (metilfenidato, fluoxetina, desipramina o una combinación del primero con los otros dos) (Aga-Mizrachi et al. 2014) o la posibilidad de realizar actividad física (Li et al. 2015) en una fase posterior a las sesiones de choque eléctrico. Al menos parte de los efectos de la exposición repetida a choque eléctrico en las patas pueden venir mediados por condicionamiento del miedo y su generalización a otros ambientes, pero no hay estudios que hayan intentado separar los efectos condicionados de los incondicionados.

6.3. Estrés crónico impredecible

Los paradigmas de estrés adolescente que usan CUS como modelo de estrés varían en número de días, edad de inicio y estímulos estresantes que componen el CUS. Todo ello, junto con posibles diferencias mediadas por el sexo o la cepa de las ratas, dificulta sacar conclusiones globales de este paradigma. Más aún si se incluye el choque eléctrico entre los estímulos que componen el paradigma de CUS, porque se suma la posibilidad de generalización del miedo inducida por éste a los posibles efectos globales de la exposición repetida a estrés.

En unos estudios pioneros de Maslova y colaboradores (2002a; 2002b) se utilizaron ratas de las cepas Wistar e ISIAH (ratas con hipertensión arterial), que fueron expuestas del PND 21 al 32 a un protocolo de CUS que combinaba estímulos estresantes emocionales y físicos. La exposición a CUS incrementó, pero sólo en las ratas ISIAH, la respuesta de sobresalto a corto plazo y redujo la inhibición prepulso a largo plazo. A corto plazo se redujo el número de entradas en los brazos abiertos en un EPM en ambas cepas. No obstante, sólo en las ratas ISIAH redujo a corto y largo plazo el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. Por tanto, el impacto en las ratas *Wistar* es menor que en las

ISIAH, lo que confirma la importancia de la cepa en las consecuencias de la exposición a CUS durante la adolescencia.

En general, los modelos de CUS suelen combinar estímulos estresantes, emocionales y físicos. Kabbaj y colaboradores (2002) utilizaron dos modelos de CUS, uno con estímulos de carácter social y otro que combinaba estímulos sistémicos y emocionales. Ambos protocolos tenían una duración de 28 días, empezando en el PND 28. El CUS social, pero no el otro, redujo parcialmente la actividad en un ambiente nuevo un día después de finalizar la exposición. Ambos protocolos mejoraron el desempeño en el primer bloque de ensayos en el laberinto acuático a corto plazo (24 h después), y sólo el CUS físico empeoró el desempeño en el laberinto acuático a largo plazo (3 semanas después) (Isgor et al. 2004). No es sorprendente que el CUS social tuviese efectos menos duraderos, ya que éste era de menor intensidad en función de los cambios observados en el peso corporal, de las adrenales y del timo.

Muchos modelos de CUS reducen la ganancia de peso corporal en machos y hembras (Jankord et al. 2011; Taylor et al. 2013; Rainecki et al. 2016; Wulsin et al. 2016), aunque los efectos sobre el peso corporal no perduran en el tiempo (Rainecki et al. 2016). Incluso se ha observado un mayor incremento de peso en machos días después de finalizar la exposición (Smith et al. 2018). La exposición a CUS puede incrementar la actividad basal del eje HPA a corto plazo en ambos sexos valorada por los niveles de corticosterona (Jankord et al. 2011; Rainecki et al. 2016; Wulsin et al. 2016), pero el efecto es transitorio (Smith et al. 2018).

Las consecuencias conductuales de la exposición a CUS varían a corto y largo plazo. A corto plazo se observa un incremento de la actividad en un ambiente nuevo en machos (Rainecki et al. 2016), pero no se observan cambios en la respuesta conductual a la FST ni en machos ni en hembras, aunque una reducción en la respuesta del eje HPA a la FST (Jankord et al. 2011; Wulsin et al. 2016). A largo plazo se han observado resultados contradictorios en el EPM: incremento de la actividad en ambos sexos (Pohl et al. 2007), un descenso en la actividad en machos (Cotella et al. 2019) o un incremento en la actividad en hembras, pero no en machos (Taylor et al. 2013). En el OF se observa una reducción en la actividad en machos y hembras (Smith et al. 2018). Respecto a la FST se ha observado un incremento en el tiempo de inmovilidad en hembras, pero no en machos (Smith et al. 2018), aunque en otro estudio utilizando una cepa diferente de ratas sí encuentran incremento

de la inmovilidad en machos (Cotella et al. 2019). En conjunto, se observan tanto efectos positivos, como negativos, aunque los datos no son consistentes entre experimentos, lo que puede deberse a la diversidad de estímulos estresantes, a la edad de inicio y a la cepa.

En contraposición a los modelos de CUS descritos en los últimos párrafos que eran de larga duración, los grupos de investigación de Richter-Levin y de Sandi han utilizado modelos de CUS que incluyen menos exposiciones. Aunque pueden variar de un experimento a otro, estos estudios utilizan estímulos emocionales (o mixtos): plataforma elevada, FST, inmovilización en tubo, choque eléctrico o trimetiltiazolina (TMT). El TMT es un compuesto presente en las heces del zorro, utilizado tradicionalmente como olor de predador, aunque algunos autores consideran que en realidad es un olor aversivo (Staples et al. 2008).

El grupo de investigación de Richter-Levin expone a los animales entre el PND 27 y 29 a FST, plataforma elevada y choque eléctrico en las patas o inmovilización en tubo como tercer estímulo. Utilizando tanto el choque eléctrico en las patas como la inmovilización en tubo se reduce a largo plazo la actividad exploratoria en un ambiente nuevo y las evitaciones en el TWAA, con un incremento del número de respuestas nulas en esta tarea (Tsoory y Richter-Levin 2006; Tsoory et al. 2007; 2008). Otros efectos a largo plazo de este paradigma (usando la inmovilización en tubo como tercer estímulo) son un descenso en la actividad en los brazos abiertos del EPM y en el centro de un OF (Ilin y Richter-Levin 2009b), lo que sugiere niveles mayores de ansiedad. Los efectos de este modelo de CUS varían entre machos y hembras (Horovitz et al. 2014). En las hembras también se reduce la actividad exploratoria en un OF, pero la reducción es superior en los machos. Solo las hembras desarrollan un fenotipo anhedónico, evaluado por el consumo de sacarina, mientras que los machos solo lo muestran si al estrés adolescente le sumamos la exposición a la TWAA durante la edad adulta. A diferencia de los machos, las hembras no ven afectado su desempeño en la TWAA por la exposición previa a CUS.

El laboratorio de Sandi utiliza un protocolo de CUS que incluye OF, plataforma elevada y TMT. Realiza entre cinco y siete exposiciones a estrés durante la adolescencia. A corto plazo, se observa en machos y hembras mayor latencia para entrar en el centro de un OF, pero menor latencia para aproximarse y mayor tiempo de exploración de un objeto nuevo en el OF (Toledo-Rodriguez y Sandi 2011). También muestran más tiempo en los

brazos abiertos y más distancia recorrida en el EPM, así como un incremento en la ingesta de pellets sabrosos en una jaula de estabulación sin material de cama. A largo plazo, se observa en machos un descenso en la distancia recorrida y el tiempo en los brazos abiertos del EPM, un descenso en la preferencia por un estímulo social (Veenit et al. 2013; Tzanoulinou et al. 2014a; 2014b) y un incremento en el uso de un estilo de afrontamiento pasivo en el FST (Veenit et al. 2014). En ambos sexos se observa un incremento en la agresividad (Cordero et al. 2013; Márquez et al. 2013; Cordero et al. 2016). Respecto al condicionamiento del miedo hay diferencias entre sexos. En machos se observa a corto plazo un incremento en el miedo condicionado al tono, y a largo mayor resistencia a la extinción de la respuesta condicionada (Toledo-Rodríguez y Sandi 2007). En hembras se observa a corto plazo un descenso en la respuesta de miedo condicionado al contexto (Toledo-Rodríguez y Sandi 2007) y menos conducta de miedo durante la fase de extinción (Toledo-Rodríguez et al. 2012), sin efectos a largo plazo.

Un último modelo de paradigma de CUS incluye estudios que extienden el tiempo de exposición más allá del período adolescente (Toth et al. 2008). Estos autores utilizan una exposición de ratas macho a CUS (que incluía privación alimentaria, plataforma elevada y FST) desde el PND 30 al PND 90. La exposición causó un descenso en la exploración de la parte central de un OF y el tiempo de interacción social, sin afectar a la conducta en la tarea de TWAA. Chaby y colaboradores (2013) utilizan un paradigma que abarcaba del PND 30 al 70 e incluye caja de estabulación más reducida, mojada o inclinada, olor de predadores, aislamiento, sobrepoblación y estabulación en la caja de otros animales adultos. A largo plazo la exposición dio lugar a un incremento en conductas asimilables a ansiedad (la latencia de aproximación a comida familiar en un ambiente nuevo) (Chaby et al. 2015b), mayor sensibilidad a la devaluación de un estímulo reforzante (Chaby et al. 2013) y mayor vulnerabilidad a interrupciones (exposición a un OF en mitad de la prueba) de una tarea que requiere el uso de la memoria de trabajo (Chaby et al. 2015a), sin impacto sobre la memoria espacial (Chaby et al. 2015c).

6.4. Estrés social

Los modelos de estrés social pueden agruparse en aquellos que implican aislamiento social, inestabilidad social o derrota social (McCormick et al. 2017a). Cada modelo tiene sus propias características y problemáticas. Por ejemplo, el modelo de derrota social no es aplicable a ratas o ratones hembras,

ya que son muy poco agresivas. Por otro lado, los modelos de inestabilidad y de derrota social son, presumiblemente, mucho más estresante en ratones que en ratas, ya que estos son más territoriales y agresivos.

Aislamiento social

Un problema que emerge cuando se quiere investigar los efectos de este paradigma en la adolescencia es que en muchos estudios mantienen el aislamiento social una vez pasada esta etapa, razón por la cual no podemos conocer los posibles efectos del aislamiento restringido a la adolescencia. Los efectos del aislamiento social pueden deberse en principio a dos factores: la privación de estímulos claves para el desarrollo y el posible estrés crónico provocado por el aislamiento (Hall 1998). Su valor como modelo de estrés adolescente no está claro ya que no se han observado cambios consistentes en los parámetros clásicos de evaluación de estrés crónico (McCormick et al. 2017a). En cualquier caso, el aislamiento social durante la adolescencia en roedores provoca una serie de déficits en habilidades sociales, emocionales y cognitivas (Burke et al. 2017).

En el aislamiento restringido a la etapa adolescente es crítico si la posterior estabulación se realiza con ratas que también habían estado aisladas o con aquellas que habían permanecido estabuladas en grupo (Hol et al. 1999). Si en el aislamiento se realiza del PND 22 al 35 los efectos no son sensibles a la historia previa del nuevo compañero de caja y en ambos casos se reduce el tiempo de interacción social. Sin embargo, si el aislamiento se hace del PND 22 al 28, la posterior estabulación con animales que habían permanecido en grupo bloquea el impacto negativo sobre la interacción social. No solo es importante el momento de inicio del aislamiento, sino también el momento de evaluación. Arakawa (2003) observó una reducción en la actividad en un OF cuando la evaluación se hacía en PND 40 o PND 65, pero los efectos desaparecían hacia el PND 130. Otros investigadores no encuentran efectos sobre la conducta exploratoria en un ambiente nuevo a corto plazo (3 días después de acabar), salvo cuando el campo abierto se vuelve más ansiogénico (incremento iluminación), en cuyo caso se reduce la actividad exploratoria (Lukkes et al. 2009). Tampoco se encuentran cambios a corto plazo en el EPM (14 días de aislamiento) (Van Den Berg et al. 1999a), salvo si el aislamiento social es muy prolongado (30 días), en cuyo caso se reduce el tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos (Da Silva et al. 1996; Serra et al.

2000). A nivel cognitivo, se ha observado una conducta más perseverante durante la fase de extinción de una tarea operante (Morgan et al. 1977).

Pero, sin duda, las pruebas en las que los animales aislados presentan más déficits son las que evalúan la interacción social. Presentan menos interacción y exploración del congénere (Van Den Berg et al. 1999a; Van Den Berg et al. 1999b), mayor conducta de petrificación durante una prueba de interacción social (Lukkes et al. 2009) y reducción de la CPP a estímulos sociales (Van Den Berg et al. 1999c), sin cambios en la eficacia copulativa (Van Den Berg et al. 1999a). En una prueba de derrota social (residente-intruso), muestran mayor resistencia a la subordinación (Van Den Berg et al. 1999a). Este cambio va asociado a una recuperación más lenta de la respuesta del eje HPA (corticosterona) y una mayor respuesta del eje SMA (adrenalina y noradrenalina) a la situación. En cambio, posteriormente muestran mayor miedo condicionado al contexto donde se realizó la prueba. No está claro si este efecto sobre el condicionamiento es específico o más generalizado, dado que también muestran más miedo condicionado al tono cuando se utiliza el choque como estímulo aversivo (Lukkes et al. 2009).

Inestabilidad social

Este modelo ha sido sobre todo desarrollado y utilizado por McCormick y colaboradores (2004) y es importante destacar que utilizan ratas *Long-Evans*. El modelo implica una hora diaria de aislamiento social durante 15 días, tras la cual los animales vuelven a ser estabulados por pares, pero con una pareja nueva en cada sesión. Tras la última sesión vuelven a estar con el compañero que tenían antes de empezar los 15 días de inestabilidad social. El programa de inestabilidad social lo aplican entre el PND 30 y 45.

La exposición a este paradigma de estrés social tiene efectos claramente diferentes entre machos y hembras, observándose reducción de la ganancia de peso en machos, pero no en hembras (McCormick et al. 2004; 2005), aunque esta reducción parece deberse principalmente al impacto de la hora de aislamiento, y no al cambio de compañero de la caja de estabulación (McCormick et al. 2007). En hembras este paradigma tiene efectos ansiolíticos que son dependientes de la fase del ciclo menstrual en la que sea evaluada la conducta, mientras que en machos podría tener efectos ansiogénicos (McCormick et al. 2008), que son más evidentes en la prueba de interacción social, si la interpretamos en términos de ansiedad social (Green et al. 2013).

El impacto de este modelo sobre la respuesta del eje HPA, valorada por los niveles plasmáticos de corticosterona, varía entre sexos. En machos tras la primera hora de aislamiento la respuesta del eje recupera más rápido los niveles basales si al acabar vuelven con el compañero que tenían previamente, mientras que en hembras es independiente de si vuelven con la pareja previa o con una nueva (McCormick et al. 2007). En el último día de inestabilidad social la respuesta del eje HPA a la hora de aislamiento está amortiguada en machos y en hembras (McCormick et al. 2007). Respecto a la respuesta de la corticosterona a estímulos heterotípicos los resultados son contradictorios (McCormick et al. 2008; Mathews et al. 2008a). Machos y hembras divergen en las consecuencias sobre el uso de estrategias de afrontamiento en la FST. En hembras favorece a corto plazo el uso de estrategias de afrontamiento pasivas, pero el efecto no perdura en el tiempo; mientras que en machos no se observan efectos a corto plazo, pero a largo plazo favorece las estrategias de afrontamiento activas (Mathews et al. 2008a).

Además de la interacción social, otros aspectos de la conducta social se ven alterados por este paradigma. En una tarea de competición por la adquisición de una comida sabrosa, las ratas macho que han sufrido el paradigma de inestabilidad social son más agresivas (Cumming et al. 2014). Además, muestran menos eficiencia copulativa (McCormick et al. 2013a), aunque existen diferencias en función del fenotipo. Si clasificamos las ratas que han sufrido el estrés social y las ratas control en dominantes y sumisas el patrón cambia. En las ratas dominantes que han pasado por el estrés social durante la adolescencia la eficiencia copulativa es superior a las controles también dominantes y son preferidas por las hembras, mientras que entre las sumisas es justo al contrario (McCormick et al. 2017b).

El modelo induce cambios conductuales en memoria y aprendizaje. Los machos expuestos al estrés muestran menos miedo condicionado y menos generalización del miedo que los animales del grupo control (Morrissey et al. 2011), mientras que las hembras estresadas muestran mayor resistencia a la extinción (McCormick et al. 2013b). En tareas que evalúan otras funciones cognitivas, los animales expuestos a inestabilidad social durante la adolescencia tienen déficits en la adultez en memoria espacial (McCormick et al. 2010; 2012). Por último, la exposición a este paradigma de estrés incrementa el consumo de etanol en machos tanto a corto como a largo plazo (Marcolin et al. 2019).

Derrota social

El modelo de derrota social en adolescentes y adultos implica la exposición a derrota y subordinación ante un congénere. Típicamente en el modelo de residente-intruso, en la que el animal experimental es introducido en la caja de estabulación de un animal dominante, se suelen usar animales adultos de la misma cepa como dominantes, aunque hay laboratorios que utilizan animales de otras cepas más agresivas (v.g. Vidal et al. 2011). Sin embargo, el modelo estándar no es adecuado para estudiar la tarea en hembras debido a que son poco agresivas. Una opción es utilizar como animal residente (agresor) a una hembra lactante, que durante esta fase desarrollan altos niveles de agresividad (Ver Hoeve et al. 2013). La duración de la exposición a derrota social repetida durante la adolescencia varía de 5 a 10 días, exposición que empieza en el PND 28 en los estudios que la inician más pronto y finaliza en torno al 46 en los que acaban más tarde.

Los efectos sobre la actividad exploratoria en un OF y la ansiedad en el EPM varían según la cepa y/o los días de exposición. Algunos estudios indican que no afecta a la conducta exploratoria pero sí incrementa la ansiedad en el EPM (Weathington et al. 2012). Sin embargo, en otros se observa un incremento de la conducta exploratoria en un OF y un EPM, así como del tiempo en los brazos abiertos del EPM (Watt et al. 2009). En este último estudio, los autores observan que la exposición a derrota social tiene efectos a largo plazo en la conducta exploratoria cuando son expuestos al mismo ambiente donde sufrieron la derrota social, lo que podría deberse a un condicionamiento de miedo al contexto (Watt et al. 2009). A pesar de presentar, presumiblemente, miedo condicionado al mismo contexto donde se llevó a cabo la derrota social, los animales derrotados muestran menos miedo condicionado a un tono y un contexto asociados a choque eléctrico en las patas que los animales del grupo control (Novick et al. 2016), lo que sugiere un efecto protector. En conjunto, no parece que la exposición de animales jóvenes a un adulto agresivo tenga un gran impacto en la respuesta emocional.

La experiencia de derrota social durante la adolescencia incrementa la sensibilidad, evaluada por la actividad locomotora, a fármacos, como la Anfetamina (Burke et al. 2013) y la cocaína (Burke y Miczek 2015), que actúan sobre el sistema dopaminérgico. Es de interés que mientras se incrementa el CPP a la Anfetamina (Burke et al. 2011), no hay diferencias en el CPP ante un estímulo reforzante natural como comida sabrosa (Novick et al. 2013), por lo

que parece incrementarse la capacidad reforzante de los psicoestimulantes en particular, pero no la de los refuerzos naturales. A nivel cognitivo, la exposición a este paradigma de estrés adolescente provoca déficits en tareas de aprendizaje que conllevan un refuerzo demorado, pero no si el refuerzo es inmediato (Novick et al. 2013). Los efectos a nivel cognitivo varían si separamos a los individuos según su conducta durante la tarea de derrota social. Los animales, tanto machos como hembras, que realizan conductas de subordinación más rápidas realizan peor las pruebas cognitivas que implican flexibilidad cognitiva que aquellos que muestran más resistencia a la subordinación (Snyder et al 2015a; 2015b), aunque las hembras subordinadas realizan mejor las tareas que implican cambios en la estrategia a utilizar (Snyder et al. 2015b), sugiriendo mayor flexibilidad cognitiva.

6.5. Conclusiones generales de los modelos de estrés adolescente

Extraer una conclusión global del impacto de los diferentes modelos de estrés adolescente es una tarea realmente compleja. Cada modelo cambia en la intensidad y la cualidad de los estímulos, dentro de cada modelo el período de exposición varía a lo largo de los 40 días de la adolescencia en roedores y varían las cepas utilizadas. Por otro lado, es evidente la existencia de diferencias entre sexos. Los modelos de estrés repetido reducen la actividad exploratoria, incrementan las conductas similares a la ansiedad, provocan anhedonia, incrementan la susceptibilidad al miedo y afectan a la memoria espacial y de reconocimiento. Los modelos CUS difieren según los estímulos que lo componen. Otros efectos frecuentes de estos modelos son los déficits en las habilidades sociales e incremento de la vulnerabilidad a las respuestas de miedo condicionado. Por último, los modelos de estrés social adolescente tienden a proteger frente al miedo condicionado al contexto, pero incrementan la susceptibilidad al consumo de sustancias y empeoran las habilidades sociales de los sujetos.

Hipótesis y objetivos

La adolescencia es un periodo de profundos cambios que implican un proceso de maduración del individuo y el inicio de la adultez. Durante esta etapa evolutiva el SNC es maleable y sensible a la estimulación externa, abriéndose así una ventana de oportunidad, pero también de vulnerabilidad. Puestos que los sujetos adultos han demostrado ser sensibles a la controlabilidad sobre el estrés, incrementándose la vulnerabilidad a sus consecuencias negativas cuando éste es incontrolable y la resiliencia cuando es controlable, sugerimos que:

1. La exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia incrementará las conductas asimilables a la ansiedad y la depresión y las estrategias de afrontamiento pasivo, mientras que la exposición a estrés controlable protegerá frente a estos posibles efectos.
2. La exposición a estrés incontrolable podría sensibilizar en mayor medida que el estrés controlable la reactividad del eje HPA a nuevas situaciones de estrés.
3. La exposición a estrés controlable versus incontrolable inducirá un patrón diferencial de activación del SNC durante la fase de exposición, que se reflejará en los niveles de Δ FosB y redundará en cambios en la actividad sináptica evaluada por la expresión constitutiva de *Arc*. Asimismo podría también sensibilizar a corto plazo la respuesta del SNC a un estímulo heterotípico evaluada por la expresión de *c-fos* y *Arc*.
4. La exposición a estrés favorece la activación del circuito directo de los ganglios basales en animales resilientes y del indirecto en susceptibles. Por ello planteamos que la exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia favorecerá el balance del sistema dopaminérgico hacia la activación del circuito indirecto estriatal, mientras que la exposición a estrés controlable lo hará hacia el directo.
5. Las diferencias individuales son un factor importante para determinar las consecuencias de la exposición a estrés. Para estudiar si también son relevantes para las consecuencias de este modelo aplicamos en ratas *Long-Evans* el mismo paradigma de estrés usado en experimentos anteriores en ratas *Sprague-Dawley*. Ambas cepas difieren en la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes y en otros aspectos relevantes, incluyendo el condicionamiento del miedo.

Objetivos:

1. Estudiar las consecuencias de la exposición a estrés controlable o incontrolable en pruebas que evalúan fenotipos conductuales similares a la ansiedad o la depresión, y estilos de afrontamiento.
2. Estudiar las consecuencias de la exposición a estrés controlable o incontrolable sobre la actividad del eje HPA durante la exposición, evaluada por la corticosterona acumulada en pelo, y tras la exposición evaluando su actividad basal y su reactividad frente a estímulos estresantes heterotípicos de baja y alta intensidad.
3. Caracterizar el patrón de activación del SNC tras el periodo de exposición a estrés, en condiciones basales y en respuesta a un estímulo estresante heterotípico (FST). Utilizaremos como marcadores la expresión de Δ FosB y *Arc* en condiciones basales y *c-fos* y *Arc* en la respuesta a estrés heterotípico.
4. Estudiar cambios en el funcionamiento del sistema dopaminérgico producidos por la exposición a estrés controlable o incontrolable durante la adolescencia en respuesta a un estímulo estresante que permite valorar estrategias de afrontamiento. Se llevará a cabo mediante el análisis del patrón de *c-fos* en los dos tipos principales de neuronas estriatales (D1 y D2) y de los cambios conductuales resultantes de la administración sistémica de antagonistas selectivos para los receptores D1 o D2.
5. Caracterizar las consecuencias de la exposición a estrés crónico controlable o incontrolable en la cepa *Long-Evans*. Se evaluará la respuesta endocrina y conductual durante la tarea y en respuesta a estímulos estresantes posteriores, con el objetivo de constatar si el patrón resultante difiere del observado previamente en las *Sprague-Dawley*.

Material y Métodos

1. Sujetos y procedimientos generales

En los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* procedentes del *Servei Estabulari* de la Universidad Aut3noma de Barcelona y ratas macho de la cepa *Long-Evans* procedentes de *Janvier Labs* (Francia). La edad promedio de inicio en los experimentos llevados a cabo durante la adolescencia fue el PND 30 y los llevados a cabo en la edad adulta el PND 65, los detalles de la edad de inicio de cada procedimiento se especificar3n en el apartado de resultados. Los animales fueron estabulados por pares, salvo si el procedimiento experimental exigía la individualizaci3n de los animales, en cajas de estabulaci3n con unas dimensiones de 42,5 x 26,5 x 18 cm cerradas por arriba por un techo de rejilla met3lico. El lecho de la caja estaba compuesto por viruta absorbente (Lignocel, Panlab-Harvard). Se mantuvieron condiciones est3ndar de luz (fotoperiodo de 12 h, luces encendidas a las 8:00 am), temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (40-60 %). Los animales dispusieron de agua y comida (dieta para cría #2018S y de mantenimiento #2014S, Harlan) *ad libitum*. En ning3n experimento se enriqueci3 el ambiente en la caja de estabulaci3n. Los sujetos fueron asignados al azar a los distintos grupos experimentales, aunque se comprob3 que no difirieran en las variables medidas previamente. Todos los procedimientos experimentales fueron previamente aprobados por el Comit3 de 3tica para la Experimentaci3n Animal y Humana de la Universidad Aut3noma de Barcelona y de la Generalitat de Catalunya, de acuerdo con las Directivas de la Uni3n Europea (2010/63/EU) y de Espa3a (RD53/2013).

Previo al inicio de las sesiones experimentales, los animales fueron aclimatados a la sala de estabulaci3n y se realizaron entre 3 y 4 sesiones de manipulaci3n manual del animal (*handling*). El procedimiento de manipulaci3n consistía en colocar el animal en el interior de un trapo, realizar un suave masaje por la espalda y la cola durante 10 s, y luego levantar el animal durante unos 10 s. En los procedimientos experimentales que lo requerían, los animales fueron previamente habituados a la toma de muestra por incisi3n en la cola, que consistía en realizar una peque3a incisi3n en la cola y realizar diez masajes de extracci3n; y al proceso de administraci3n de f3rmacos en los casos que fuera necesario. Estos m3todos simulan las manipulaciones que sufrir3n los animales los días experimentales, reduciendo así el posible impacto sobre la respuesta de estr3s que puedan tener para que no afecten a las variables a estudiar.

2. Métodos de grabación y análisis de las pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se grabaron utilizando cámaras en posición frontal o cenital, conectadas a un grabador digital. En el caso de las jaulas operantes, dos cámaras grababan la conducta (una en cada compartimento de la caja lanzadera) en posición frontal. La instalación de las cámaras en las jaulas operantes nos permitió, no solo analizar la conducta, sino también detectar cualquier problema durante la realización de la prueba.

Para el análisis de la conducta utilizamos dos softwares. Por un lado, el programa SMART (versión 2.5.19-21, Panlab-Harvard) detecta los píxeles que ocupa un animal mediante su centro de gravedad, y permite analizar, entre otras variables, el recorrido de los sujetos durante la realización de las pruebas. Por otro lado, The Observer XT 11 (Noldus Information Technology) permite analizar múltiples conductas (continuas y/o puntuales) de manera simultánea y analizar tanto el tiempo como la frecuencia de éstas, durante toda la prueba o por bloques temporales. En el caso de que no fuese posible usar ninguno de ellos, la conducta se analizó utilizando un cronómetro digital para evaluar el tiempo durante el cual los sujetos realizaban una conducta concreta. En todos los casos, los análisis se hicieron a ciegas.

3. Tarea de evitación activa en dos sentidos

El grupo CST fue expuesto a una tarea de TWAA, que se lleva a cabo en una caja lanzadera con dos compartimentos en la cual se introduce el animal y debe cruzar al compartimento contrario al que se encuentre el animal para evitar un FS (US) que se presenta precedido por un estímulo neutro inicialmente (auditivo y luminoso). Este paradigma implica dos tipos de aprendizajes asociativos: condicionamiento clásico y operante. Mediante el condicionamiento clásico, los estímulos inicialmente neutros pasan a ser CS al asociarse con el US. Asimismo, el contexto también pasa a asociarse con el US. A través del condicionamiento operante, se refuerza negativamente la conducta instrumental, es decir, cruzar al compartimento contiguo, con la finalización del estímulo aversivo. Este tipo de tarea conlleva tres tipos posibles de respuesta, las dos primeras implicando un estilo de afrontamiento activo y la última, un estilo de afrontamiento pasivo. La primera respuesta posible sería la evitación, que supone cruzar al compartimento contrario en presencia del CS para prevenir la aparición del choque. La segunda es la de escape, que

supone realizar la conducta operante en presencia del FS para finalizarlo. La tercera es una respuesta nula, que consiste en permanecer en el compartimento que se está dando el choque, sin huir/escapar de él, en estado de petrificación debido a la respuesta de miedo. La tarea de TWAA implica que ambos compartimentos son peligrosos y que la conducta operante a realizar es cruzar de un compartimento a otro, lo cual implica más complejidad que la evitación activa en un sentido en la que hay un compartimento seguro. A pesar de la complejidad de la tarea, es poco frecuente que los animales adopten la estrategia pasiva en condiciones habituales, debido a que la respuesta de escape se adquiere con relativa facilidad.

Se utilizaron 4 cajas lanzaderas individuales con aislamiento acústico. Cada caja (LE 1005, Panlab-Harvard) está constituida de plexiglás negro (pared posterior, laterales y superior) y transparente (puerta frontal) y está dividida en 2 compartimentos (25 x 25 x 25 cm), conectados por una abertura (8 x 10 cm). El suelo es rejilla de metal removible de 19 barras (0,3 cm de diámetro separadas por 1 cm cada una) vinculadas a un generador de choques eléctricos (LE100-26, Panlab-Harvard). Cada compartimento de la caja tiene una luz (4 cm de diámetro, 2,4 W, 24 V) en la pared posterior a 19,5 cm de la base, un altavoz y una puerta por donde se introducen los animales. Cada caja está aislada por otra caja de metal insonorizada (66 x 50 x 55 cm) que genera un ruido de fondo de 60 dB. El programa informático utilizado para controlar el funcionamiento de la caja operante fue el Packwin v2.0.07 (Panlab-Harvard).

Los animales del grupo CST fueron expuestos 8 veces a la tarea de TWAA a lo largo de un promedio de 22 días. Cada sesión estaba compuesta de:

- Habitación. Los primeros 5 min de la sesión el animal era expuesto a la caja lanzadera libre de cualquier estímulo, permitiéndole explorarla en su totalidad.
- Ensayos. El número de ensayos era 50 y cada ensayo se componía de:
 - o Tiempo entre ensayos (ITI). Entre cada ensayo había un período libre estímulos de entre 5 y 55 s de duración, con una duración promedio de 30 s.
 - o Estímulo condicionado (CS). El estímulo condicionado estaba compuesto por un tono (2400 Hz 80 dB) y una luz (7 W). Ambos estímulos aparecen simultáneamente y están presentes de forma continua durante 10 s, si el animal no realiza una evitación. La luz aparece en el compartimento donde se halla

el sujeto y el sonido en el medio de ambos compartimentos. El CS precede a la aparición del US, el cual aparece de forma inmediata a la finalización del CS (condicionamiento de demora).

- Estímulo incondicionado (US). El estímulo incondicionado era un FS de 0,7 mA de intensidad y 10 s de duración máxima.
- Ratio de respuesta: 1 cruzamiento.
- Duración de la sesión: 35-40 min.

Los animales del grupo UST fueron expuestos al mismo número de sesiones y en el mismo periodo de tiempo que el grupo CST. Cada rata UST estaba asociada a un sujeto CST y ambos eran siempre expuestos de manera simultánea en cajas diferentes. Las cajas lanzadera de ambos estaban ligadas, y el animal del grupo UST recibía exactamente la misma cantidad de choque que el sujeto del grupo UST, pero sin posibilidad de evitar o escapar del choque. La luz del CS aparecía en el compartimento en el que se encontraba la rata CST en su respectiva caja, independientemente del compartimento en el que se encontrará el animal UST, pero siempre precediendo al US. Por lo que ambos grupos podían predecir la aparición del choque por el CS, pero solo los del CST podían evitar/escapar de él. Los sujetos del grupo S-E fueron expuestos al mismo protocolo que las anteriores, pero sin la exposición al FS. La sesión en la caja lanzadera de las ratas S-E tenía una duración de aproximadamente 35 min y una duración media del CS de 5 s.

Las dos ratas de la misma caja de estabulación pertenecían al mismo grupo experimental. El transporte de la sala de estabulación a las cajas lanzaderas, se hacía en unas cajas de metacrilato blancas. Las cajas de transporte se limpiaban entre un sujeto y otro con etanol al 70 % v/v, igual que las cajas lanzaderas. Entre las variables a analizar de la tarea en la caja lanzadera, hay algunas específicas del grupo CST, siendo estas: evitaciones, escapes, latencia de respuesta que hace referencia al periodo entre el inicio del CS y el momento en el que el animal cruza al compartimento continuo cuando el estímulo aversivo (CS+US) está presente, respuestas nulas y cruzamientos de un compartimento al otro durante el ITI. El resto de las conductas a analizar son comunes a los tres grupos y son: cruzamientos durante la habituación, petrificación y *rearings*/alzamientos (conducta exploratoria) durante la habituación. La conducta durante la habituación nos sirve como medida de la actividad basal

de los sujetos en la primera sesión y del miedo condicionado al contexto en el resto de las sesiones.

4. Pruebas conductuales

4.1. Nado forzado (FST)

La prueba de nado forzado (FST) ha sido ampliamente utilizada en la validación de fármacos antidepresivos (Porsolt et al. 1977; Armario et al. 1988; Cryan et al. 2005) y para evaluar el uso de estrategias de afrontamiento activas vs pasivas en situaciones estresantes (Martí y Armario 1993; Armario et al. 1988). Actualmente hay autores que abogan por reducir la interpretación de la FST a la evaluación de las estrategias de afrontamiento, debido a que la inmovilidad en esta prueba podría ser considerada como adaptativa (Molendijk y de Kloet 2015). En cualquier caso, en nuestro caso, utilizaremos la FST como indicador del estilo de afrontamiento. Asimismo, la exposición de los animales a nado forzado supone una experiencia estresante de tipo mixto, aunque predominantemente emocional, de intensidad media (Dal-Zotto et al. 2000; Armario et al. 2012).

Para la realización de la prueba se utilizaron cilindros 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, agua que se renovaba entre un animal y otro de tal forma que los animales siempre realizaban la tarea en un tanque con agua limpia. La iluminación de la sala provenía de los fluorescentes de la sala y los animales eran expuestos de 4 en 4 en cilindros separados entre sí por paredes negras para evitar que los animales se viesan. La prueba tenía una duración de 30 min, tras la que los sujetos eran secados con toallas de algodón antes de obtener una muestra de sangre por incisión en la cola. En esta prueba la conducta fue grabada frontalmente para su análisis posterior. Se analizaron tres bloques de 5 min que correspondían a los minutos iniciales (0-5 min), intermedios (12,5-17,5 min) y finales (25-30 min). Las conductas analizadas se agrupan en:

- Tiempo de escape (*struggling*), que implica una conducta activa en la cual el animal mueve enérgicamente las cuatro patas, rompiendo la superficie del agua. Dentro de la conducta de escape también se incluyen las inmersiones y los saltos.

- Tiempo de inmovilidad, que implica una conducta pasiva caracterizada por la inmovilidad total del animal, salvo movimientos leves que le permitan mantener la cabeza fuera del agua.
- Nado suave, que resulta del tiempo en que no hacen ni escape, ni inmovilidad. El nado suave consiste en movimientos leves, más allá de los necesarios para mantenerse a flote, pero de menos intensidad que los que indican escape (p.ej. nadar en círculos por el tanque).

4.2. Campo Abierto (OF)

La exposición de roedores a campos abiertos nos permite analizar la actividad y la conducta exploratoria en un ambiente nuevo, y, por tanto, potencialmente peligroso. La conducta en un OF es sensible a la experiencia previa con estímulos estresantes y puede dar lugar a hipoactividad y descenso de la actividad exploratoria (Armario et al. 1991; Pol et al. 1992).

En nuestro caso utilizamos un campo circular. El campo circular es blanco (80 cm de diámetro y 34 cm de alto) con una base lisa negra. Las paredes son de madera blanca y el suelo de PVC negro. La sala tenía las paredes negras y estaba iluminada con una bombilla de 25 W. Dos OF fueron situados por sala y se expusieron a los dos sujetos de la misma caja de estabulación en la misma sala. Los grupos experimentales eran contrabalanceados por sala, para que todos ellos fueran expuestos las mismas veces a cada una. El campo se limpiaba con agua y jabón entre una rata y otra. Para el análisis de la conducta dividimos el área en dos círculos concéntricos para dividir centro y periferia. El círculo interior (centro) tenía un diámetro de 30 cm. El tiempo de duración de la prueba fue de 10 min y fue grabada en posición cenital. El análisis de la conducta se dividió en dos bloques de 5 min y se analizó: la distancia recorrida en la periferia y centro (cm) con el software SMART, descrito anteriormente. También se analizaron el número de alzamientos o *rearings* utilizando el software Observer.

4.3. Interacción Social (IS)

La prueba de IS nos permite observar el patrón de conductas sociales no agresivas entre dos sujetos adultos del mismo sexo que interaccionan por primera vez. Esta prueba ha sido utilizada para observar comportamientos similares a la ansiedad en un contexto etológico (File y Seth 2003). El desempeño en la IS es susceptible a la experiencia previa con estímulos estresantes. Haber sido expuesto previamente a derrota social, olor de

predador, estímulos estresantes físicos o choques eléctricos incontrolables disminuyen la interacción social activa (Short y Maier 1993; Oztan et al. 2011).

La interacción social es favorecida en circunstancias de familiaridad con el aparato y con el congénere a interactuar, así como en situaciones ambientales poco estresantes (por su nivel de luminosidad y/o ruido), mientras que ocurre lo contrario cuando no es un contexto familiar o es altamente estresante. Para evitar la conducta agresiva y dominante, los dos sujetos deben de tener la misma experiencia previa con el contexto de la prueba y no haber una gran diferencia de peso entre ambos animales. En nuestro caso la prueba se realizó en el mismo contexto del OF (con o sin experiencia previa con este según especifique el diseño experimental). Los animales se expusieron a interacción social con un congénere del mismo grupo experimental, que no fuese hermano ni estuviese estabulado en la misma caja y que no difiriese más de 20 g en el peso corporal. Veinticuatro horas antes de la exposición se pintó a uno de los miembros de la pareja con un rotulador permanente negro (tinta no tóxica) en la cabeza o el lomo para poder diferenciarlos y analizar la conducta individualmente si fuese necesario. Dos parejas se expusieron al mismo tiempo en distintas salas. Entre tandas los dos aparatos se limpiaron con agua y jabón. La duración de la prueba fue de 15 min y fue grabada de forma cenital para su posterior análisis. El análisis conductual se dividió en bloques de 5 min. Las conductas a analizar se agrupan en grupos conductuales que representan aspectos muy distintos (Koolhaas et al. 1980):

- Conducta social activa. Incluye el *grooming* social, saltar por encima o pasar por debajo (*pass and jump*), perseguir u oler al otro sujeto.
- Conducta social pasiva. Implica contacto entre los dos sujetos, ya sea corporal o solo las colas, pero sin realizar ningún tipo de conducta activa.
- Conducta no social. Conductas que no implican interacción con el compañero y que puede implicar exploración del contexto o inmovilidad/petrificación.

4.4. Hiponeofagia Alimentaria

En un ambiente nuevo potencialmente peligroso los roedores tardan en consumir alimentos y esta conducta se ha utilizado como una conducta asumible a la depresión y a la ansiedad (Blasco-Serra et al. 2017). Este tipo de conductas se ha utilizado para validar el componente ansiolítico de fármacos

antidepresivos (Bodnoff et al. 1988; 1989) y de ansiolíticos (Merali et al. 2003). En el procedimiento clásico se priva de alimentos para incrementar la motivación a aproximarse a los pellets (Bodnoff et al. 1989), aunque también se pueden utilizar pellets sabrosos distintos a los utilizados en la jaula de estabulación (Merali et al. 2003). En esta última aproximación hay que considerar la neofobia alimentaria y habría que hacer una habituación previa a los pellets. En nuestro caso realizamos una privación alimentaria de 24 h previa a la exposición a un campo abierto, similar al que se usó para el OF, pero con una placa de Petri con los mismos pellets que tienen en la caja de estabulación para evitar la neofobia alimentaria. Se evaluó la latencia a alimentarse y el número de entradas a la placa, además de los marcadores clásicos de exploración en un OF. La latencia para ingerir alimentos en un ambiente nuevo puede verse incrementada por la exposición previa a estrés (Chaby et al. 2015b). La duración de la prueba fue de 10 min y fue grabada cenitalmente.

4.5. Consumo de sacarina

Cuando a los roedores se les da a escoger entre agua y una solución azucarada, suelen preferir el consumo de las soluciones dulces que contienen sacarina o sacarosa, ya que ambos compuestos tienen un sabor dulce y propiedades hedónicas. La disminución del consumo de soluciones dulces se considera un buen indicador de un estado anhedónico, una conducta asociada con la depresión. El consumo de sacarosa se ve disminuido tras la exposición a estímulos estresantes crónicos de intensidad media y severa, efecto que en muchos casos se ve revertido por la administración crónica de antidepresivos (Willner 2017). Sin embargo, los resultados con sacarina son menos consistentes (Ayensu et al. 1995; Harris et al. 1998), y cuando se han comparado directamente, la exposición a CUS reduce el consumo de sacarosa pero no de sacarina (Grønli et al. 2005). Las diferencias entre la preferencia por sacarina y sacarosa dan lugar a una importante discusión metodológica, dado que algunos autores consideran que podría haber una relación entre la reducción de la ingesta de comida y el consumo de sacarosa, la cual tiene valor calórico, no así la sacarina (Weiss 1997). Por este motivo, parece más aconsejable el uso de la sacarina para valorar la anhedonia con independencia de la anorexia.

La evaluación del consumo preferente de sacarina se realizó siguiendo una adaptación del procedimiento utilizado por Pastor-Ciurana y colaboradores (2014). Dicho procedimiento requiere la individualización de los sujetos para

evaluar el consumo individual. Se utilizaron botellas antigoteo de 250 ml para calcular la cantidad de agua o solución de sacarina consumida. La solución de sacarina (*saccharim sodium salt*, Sigma) al 0,1 % (w/v en agua del grifo) se preparaba todos los días. Otra botella similar se rellenaba con agua. Ambas se colocaban en las jaulas de estabulación, al lado de la comida sólida, cada día en una posición diferente (izquierda o derecha) para evitar la preferencia por lugar. Los sujetos siempre dispusieron de bebida y comida *ad libitum* durante todo el día.

El primer día de evaluación las botellas eran colocadas de manera alterna, de tal manera que la mitad de los individuos de cada grupo tenían situada una botella con sacarina en el sitio donde generalmente estaba el agua y la otra mitad en el otro lugar para que el consumo inicial no se debiese al consumo basado en hábitos. A las 4 h se evaluó el consumo de sacarina para observar si había neofobia alimentaria. Tras esta evaluación se realizó una línea base durante 7 días para valorar el consumo y la preferencia. Cada día a la misma hora se retiraban las botellas y se pesaban para calcular el consumo. Al acabar los 7 días de evaluación del consumo, los animales fueron estabulados de nuevo con la pareja que habían estado estabulados previamente y con una botella de agua normal.

5. Fármacos

Se utilizó SCH23390 (generosamente suministrado por Schering Corporation, Kenilworth) y Eticlopride (Sigma-Aldrich). Ambos fármacos se disolvieron en solución salina estéril (0,9 % cloruro sódico) y administrado 15 min antes de la prueba. Se administró subcutáneamente. La dosis utilizada para ambos fármacos fue 0,025 mg/kg respecto la base. Los grupos control recibieron una dosis comparable de solución salina estéril (0,9 % cloruro sódico).

Administramos ACTH sintética (Nuvacthén Depot, Sigma-Tau). La administración se realizó vía subcutánea 30 min antes de realizar una extracción de sangre. La dosis utilizada fue 0,01 mg/kg.

6. Toma de muestras

6.1. Sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por el método de incisión en la cola, ampliamente validado en nuestro laboratorio y en otros, el cual permite, en

condiciones adecuadas, obtener niveles hormonales realmente basales (Belda et al. 2004; Vahl et al. 2005). El procedimiento consiste en realizar una pequeña incisión de unos 2 mm en una de las dos venas laterales de la cola, en la parte más distal de ésta, y realizar un masaje suave para estimular el flujo sanguíneo. La sangre se recoge con un capilar que contiene EDTA (Microvette CB 300 µl, Starstedt) el cual tiene una capacidad de extracción máxima de 300 µl/capilar. Este método permite extraer sangre de forma repetida en el mismo día sin realizar nuevas incisiones. Todo el procedimiento debe realizarse en un máximo de 2 min para evitar que se alteren los parámetros hormonales. Al finalizar la extracción, las muestras se conservan a 4 °C hasta su centrifugación (25 min, 7100 rpm) para la obtención del plasma. El plasma obtenido se dividió en dos alícuotas y se congeló a -20 °C hasta su análisis mediante radioinmunoanálisis (RIA) o Elisa (apartados 8.1 y 8.2). El objetivo de la extracción sanguínea fue el análisis de los niveles plasmáticos de las hormonas del eje HPA (ACTH y CORT) y los niveles de glucosa, como marcador indirecto de la actividad del eje SMA (apartados 8.1 y 8.2).

6.2. Pelo

La extracción de pelo nos permite evaluar la acumulación de CORT durante un periodo de tiempo prolongado, por lo que nos sirve de marcador crónico de activación del eje HPA, a diferencia de los valores plasmáticos que sirven como marcador agudo. Para poder evaluar los niveles de CORT en pelo durante el periodo de interés se debe rasurar la zona para la posterior extracción y análisis de pelo nuevo (crecido durante el periodo de estudio). La zona de extracción de pelo se encuentra delimitada cranealmente por la octava vértebra lumbar, caudalmente por la tuberosidad isquiática, y lateralmente por las extremidades posteriores (Scorrano et al. 2015). La muestra de pelo se obtendrá de esta zona, teniendo el máximo cuidado para no coger pelo “viejo” de regiones adyacentes. La cantidad necesaria de pelo para llevar a cabo los análisis es de 105 ± 5 mg. La extracción de pelo se realizó inmovilizando al animal en un trazo y utilizando una maquinilla eléctrica estándar.

Posteriormente a la obtención del pelo, se pasó a la extracción de la CORT de este. Se añadió 1 ml de 2-propanol (Sigma) por cada 10 mg de pelo, tras una incubación de 3 min en agitador orbital (Mini-Labrorrell, Labnet) se decantó el 2-propanol, y se repitió el proceso anterior. Una vez acabada la segunda incubación, se eliminó el exceso de 2-propanol en papel absorbente y se dejó secar el pelo durante la noche (O/N) a 37 °C. Una vez secado se hicieron dos

extracciones seriales con metanol (Sigma; 1,6 ml en 40 g de pelo). Para realizar cada extracción se incubó en agitador orbital a temperatura ambiente O/N. Después de cada incubación, el metanol extraído se secaba con corriente de nitrógeno, previo calentamiento de los tubos a 40-45 °C. El precipitado resultante de ambas extracciones se resuspendió en 200 µl de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH7,4 disuelto en agua MilliQ y se analizó mediante RIA (apartado 8.1).

6.3. Encéfalo

Inmediatamente después del protocolo de estrés o en condiciones basales, se procedió a la extracción del encéfalo, que se realizó siguiendo el protocolo utilizado previamente en nuestro grupo (Marín-Blasco et al. 2018; Úbeda-Contreras et al. 2018). Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria utilizando una cámara saturada con isoflurano (Laboratorios Esteve). Una vez alcanzado un estado profundo de anestesia se les mantuvo durante el inicio de la perfusión con un recipiente provisto de algodón impregnado de isoflurano, donde se introdujo la cabeza del animal. La perfusión se realizó transcardíacamente, primero con solución salina (0,9 %) durante 2 min y posteriormente con una solución al 4 % de paraformaldehído (PFA) y 3,8 % de tetraborato sódico (bórax) durante 12 min. Una vez terminada la perfusión se extrajeron los encéfalos y se sumergieron en PFA/bórax para completar la fijación durante 16/18 h a 4 °C. Después de este periodo se cambió el PFA/bórax por una solución crioprotectora al 30 % de sacarosa en tampón de fosfato de potasio-cloruro de sodio (KPBS; 0,2 M NaCl; 43 mM fosfato de potasio), mantenidos a 4 °C hasta quedar completamente embebidos en la solución durante 2-3 días. Posteriormente se congelaron con isopentano enfriado con nieve carbónica y fueron conservados a -80 °C hasta ser cortados serialmente en secciones coronales de 14 µm con un criostato CM3050-S (Leica Microsystems). Las secciones se conservaron en una solución anticongelante (fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,3; 30 % etilenglicol; 20 % glicerol) a -20 °C hasta su análisis histológico, bien hibridación *in situ* (apartado 8.3) para medir los niveles de *Arc*, *c-fos*, D2R, o viene mediante inmunohistoquímica para los niveles de Δ FosB (apartado 8.4). Con la excepción de D2R que nos sirvió para identificar el fenotipo neuronal, el resto de los marcadores pertenecen a la familia de los IEG o su proteína derivadas como es el caso del Δ FosB, los cuales sirven para evaluar la activación encefálica en respuesta a diferentes estímulos (ver revisión en Armario 2006b).

Cada marcador tiene sus propias peculiaridades. *Arc* tiene actividad constitutiva, a diferencia de *c-fos* que su actividad constitutiva es muy baja, por lo que el primero nos permite evaluar las consecuencias en el funcionamiento basal de la exposición a estrés crónico, aunque solo se encuentran en áreas telencefálicas. En el caso de la exposición a estrés, cada marcador tiene sus propias peculiaridades que permiten completar la información obtenida con el otro. El doble marcaje de *c-fos* y D2R nos permitirá evaluar el impacto sobre la activación del sistema dopaminérgico estriatal en respuesta a un estímulo estresante agudo, tras la exposición a estrés crónico controlable/incontrolable durante la adolescencia. Por último, el marcaje con Δ FosB nos permite cuantificar el número de neuronas que se han activado durante el procedimiento de estrés adolescente, debido a que los niveles de proteína perduran en el tiempo (ver revisión en Nestler 2015).

7. Análisis bioquímico

7.1. Radioinmunoanálisis (RIA)

Para determinar la concentración de ACTH en plasma utilizamos el protocolo de RIA de doble anticuerpo en no-equilibrio descrito por el Dr. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, EEUU) y posteriormente modificado en nuestro laboratorio (García et al. 2000). Todo el procedimiento se realizó a 4 °C para evitar la posible degradación de la hormona. Se usó un tampón fosfato disódico 50 mM (pH 7,4) conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico 25 mM, Tritón X-100 al 0,1 % y albúmina bovina al 0,25 % en agua MilliQ. Se utilizó ACTH 1-39 de rata (Sigma) como estándar (rango de calibración 2,5-640 pg/ml), 3-[¹²⁵I]iodiotirosil²³-ACTH₁₋₃₉ (actividad específica de 2000 Ci/mmol, PerkinElmer) como trazador y un anticuerpo contra ACTH de rata (Ab Rb 7), generosamente suministrado por el Dr. Engeland. La fracción libre se separó tras la incubación con un segundo anticuerpo (*donkey anti-rabbit* IgG, Serotec) diluido 1:32, conteniendo suero normal de conejo al 0,15 % y polietilenglicol al 9 %. Tras la incubación, se procedió a 30 min de centrifugación a 4700 rpm y 4 °C (Sigma-Laboratory Centrifuges 6K15). El coeficiente de variación intraensayo fue de un 4 % y el interensayo de un 7 %. La sensibilidad del método fue 12,5 pg/ml para un volumen de muestra de 10 μ l.

Los niveles de CORT en plasma y en pelo se determinaron por un RIA de doble anticuerpo en equilibrio según el protocolo del Dr. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungría). Se usó un tampón fosfato sódico 0,2M, pH 7,4 disuelto en agua MilliQ. Las muestras fueron incubadas previamente durante 2 h en ácido cítrico 0,1 M para liberar a la CORT de su proteína transportadora (este paso no es necesario en la determinación en pelo ya que no se encuentra ligado a la proteína transportadora en pelo). Se utilizó CORT sintética (Sigma) como estándar (rango de calibración: 0,15-80 ng/ml), ¹²⁵I-corticosteronecarboxi-methyloxime-tyrosine-methyl ester con una actividad específica de 1500-2000 uCi/ug (ICN-Biolink 2000) como trazador y un anticuerpo contra CORT donado amablemente por el Dr. Makara en tampón de ensayo con 0,25 % de NSR. La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo (*donkey anti-rabbit* IgG, Serotec) diluido 1:48 en tampón de ensayo, conteniendo polietilenglicol al 7,5 % en agua MilliQ con 10 µl/tubo de suero de vaca. Tras la incubación, se procedió a 30 min de centrifugación a 4700 rpm a 4 °C (SIGMA-Laboratory Centrifuges 6K15). El coeficiente de variación intraensayo fue de un 7 % y el interensayo de un 9 %. La sensibilidad del método fue de 2 ng/ml para un volumen de muestra de 1 µl.

La radiactividad en los pellets se midió durante 10/15 min con un contador gamma (Wallac 1272, Clinigamma) y los cálculos para la determinación de la concentración de ACTH y CORT se llevaron a cabo mediante la transformación log-B/Bo.

7.2. Valoración enzimática de la glucemia

Los niveles plasmáticos de glucosa fueron medidos mediante un método espectrofotométrico de oxidación de la glucosa, utilizando un kit comercial (Glucose-RTU, Biomerieux). La sensibilidad de la técnica fue de 32 mg/dl y el coeficiente de variación intraensayo fue del 2,5 %.

7.3. Hibridación *in situ* (ISH)

Obtención ribosondas

Las ribosondas radioactivas antisentido, para el mRNA de *Arc*, *c-fos* y D2R, fueron generadas mediante el kit de transcripción *in vitro* a partir de fragmentos de cDNA de rata (SP6/T7 Transcription Kit, Roche) de sus respectivos plásmidos. Los plásmidos de *Arc*, *c-fos* y D2R fueron amablemente donados por los Dres. Worley (John Hopkins University, Baltimore, MD, USA), Verma (The Salk Institute, CA, USA) y Moratalla (CSIC, Madrid,

España), respectivamente. Los fragmentos de cDNA fueron subclonados en un plásmido pBluescriptII SK+ (Stratagene), pBluescript SK-1 (Stratagene) y pGEM blue (Promega) para *Arc*, *c-fos* y D2R, respectivamente. En cada transcripción se utilizó 1 µg de plásmido digerido como DNA molde y ³⁵S-UTP como nucleótido marcado radiactivamente (actividad específica 1250 Ci/mmol) para *Arc*, y digoxigenina y fluoresceína (DIG/Fluorescein RNA Labeling Mix 10X conc, Roche) para *c-fos* y D2R respectivamente. Una vez finalizada la transcripción, se procedió a digerir con DNAsa (T7 Transcription Kit, Roche) los restos de cDNA molde. Posteriormente, se añadieron 40 µl de tampón STE (0,1 NaCl, 10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA, pH 8,0) y se realizó una incubación de 5 min 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* radiactiva, cromógena (CISH) o doble-fluorescente (dFISH). La ISH radiactiva nos permite comparar la intensidad de la activación, mientras que la CISH y dFISH permiten comparar el número de neuronas positivas para cada marcador, pero no son tan sensibles a la intensidad de la activación. La ventaja de la dFISH sobre la CISH es que permite identificar el fenotipo de la neurona activada.

Hibridación in situ

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 O/N 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 utilizado fue adaptado de Simmons y colaboradores (1989) y ha sido ampliamente utilizado en nuestro grupo de investigación (Ons et al. 2004; Marín-Blasco et al. 2018; Úbeda-Contreras et al. 2018). Todas las soluciones fueron pretratadas con dietilpirocarbonato y esterilizadas mediante autoclavado antes de su utilización. Las secciones se postfijaron en un baño de PFA/bórax durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron 4 lavados en KPBS para eliminar los restos de fijador. Seguidamente se realizó una digestión proteica durante 15 min a 37 °C mediante proteinasa K (Roche) a una concentración de 0,01 mg/ml en una solución adecuada (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0). La digestión se detuvo mediante un lavado con agua MilliQ tratada con DEPC. Posteriormente, las secciones

fueron acondicionadas en una solución de trietanolamina (TEA 0,1 M, pH 8,0), e incubadas durante 10 min en una solución de anhídrido acético al 0,25 % en TEA 0,1 M, pH 8,0. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado en una solución salina conteniendo citrato de sodio (2x SSC: 0,3 M NaCl; 0,03 M citrato sódico tribásico) y por último las secciones se deshidrataron mediante baños sucesivos en concentraciones crecientes de etanol (50 %, 75 %, 95 %, 2 x 100 %) dejándolas secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se añadió sobre cada portaobjetos 100 µl de solución de hibridación (formamida 50 %; 0,3 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1X solución Denhardt; sulfato de dextrano 10 %; tRNA de levadura 500 g/l; Ditioneitol (DTT) 10 mM) conteniendo la sonda radioactiva (10^6 dpm/100 µl) en el caso de *Arc* y la sonda no radioactiva en el caso de *c-fos* (1:2000) y D2R (1:1000). Posteriormente, se cubrieron con cubreobjetos y fueron incubadas durante 16-18 h a 60 °C para permitir la hibridación. Tras este tiempo, las secciones se lavaron en 4 baños sucesivos de SSC 4X a 37 °C y se sometieron a una digestión con RNasa A (Roche) a 0,02 mg/ml en una solución adecuada (NaCl 0,5 M; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) durante 30 min a 37 °C. Después de la digestión se realizaron lavados sucesivos a temperatura ambiente en concentraciones decrecientes de SSC (2X→0,5X) incluyendo un lavado astringente en SSC 0,1X a una temperatura de 60 °C durante 30 min y un enjuague posterior en SSC 0,1X a temperatura ambiente. Los tres últimos lavados en SSC 4X y el resto de los lavados en SSC llevaban DTT 1 mM en el caso de la ISH radiactiva. Después del último lavado en SSC 0,1X cada tipo de ISH sigue su propio procedimiento.

En el caso de la ISH radiactiva las secciones se deshidrataron mediante baños sucesivos en concentraciones crecientes de etanol. Tras dejar secar las secciones a temperatura ambiente, éstas fueron expuestas a una película XAR-5 Kodak Biomax MR (Amersham) durante el tiempo necesario para detectar la señal. Según la condición experimental y la sonda el tiempo de exposición fue de 24 h tras la exposición a estrés y 48 h en condiciones basales para *Arc*. Posteriormente, se capturaron las imágenes necesarias de la película utilizando un microscopio de campo claro (NIKON Eclipse E400).

En el caso de la CISH, las secciones pasaron 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). Seguidamente se incubaron con solución de bloqueo (2 % sero-albúmina bovina (BSA); 3 % suero fetal de ternero (FCS) en T-TBS) durante 1 h a

temperatura ambiente. Tras este tiempo, se retiró el exceso de solución de bloqueo y se añadieron 150 µl del anticuerpo contra digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-alkaline phosphatase, Roche) a una concentración de 1:500 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 min en T-TBS para retirar el exceso de solución de anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo fue revelado incubándolo con *5-bromo-4-cloro-3-indolilo-fosfato/nitroblue tetrazolium Color Development substrate* (NBT/BCIP, *Ready to Use Tablets*, Roche) durante 18 h a temperatura ambiente. Por último, se lavaron en agua MilliQ, se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron cubiertas utilizando un medio de montaje acuoso (Fluoromount, Sigma-Aldrich) y selladas con esmalte (Entellan, Merck). Una vez sellados, se capturaron las imágenes necesarias para el análisis con un microscopio de campo claro (Posteriormente, se capturaron las imágenes necesarias de la película utilizando un microscopio de campo claro (NIKON Eclipse E400).

En el caso de la dFISH, las secciones se pasaron a T-TBS. 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 min a temperatura ambiente en agitación suave. Una vez finalizado el bloqueo de la peroxidasa, se procedió a bloquear la unión inespecífica durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo. 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 O/N a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las secciones 4 veces 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 min 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 h a temperatura ambiente. Tras

retirar el exceso de solución de bloqueo, se añadieron 150 μ l 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 min 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 μ l a cada portaobjetos con TSA-Fl a una concentración de 1:50 en solución de amplificación y se dejó actuar durante 9 min. Tras la última amplificación, se realizó un lavado durante 5 min en T-TBS y se hizo la tinción nuclear con Hoechst 33258 penthydrate (Invitrogen) a 1:10000 en TBS durante 5 min. Una vez finalizada, se lavaron las secciones en TBS durante 5 min para retirar el exceso de Hoescht y se transfirieron a agua MilliQ 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 selladas con esmalte (Entellan, Merck). Una vez secado el esmalte, los portaobjetos se conservaron a 4 °C hasta la captura de imágenes mediante microscopia confocal (Olympus Fluoview 1000).

7.4. Inmunohistoquímica (IHC)

La IHC para Δ FosB fue realizada en flotación en TBS. Todo el procedimiento se realizó en agitación suave. La POD endógena se bloqueó en una solución con H₂O₂ (Sigma) al 3 %, metanol al 70 % y TBS al 27 % durante 10 min a temperatura ambiente. La unión inespecífica se redujo mediante una incubación de 1,5 h a temperatura ambiente en una solución de bloqueo compuesta por 0,4 % Triton X-100, 2 % BSA y 3 % FCS en TBS. Tras el bloqueo de la unión inespecífica se incubaron en 1,5 ml de anticuerpo que reconoce Δ FosB (sc-7203, Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1:500 en tampón de anticuerpo (0,4 % Triton X-100, 2 % BSA y TBS) O/N a 4 °C. Tras la incubación, el tejido se lavó 3 veces en TBS para eliminar los restos de anticuerpo. Posteriormente, el tejido se incubó en 1,5 ml de anticuerpo *anti-rabbit IgG* marcado con biotina (Southern Biotechnology Assoc.) a una concentración de 1:500 en tampón de anticuerpo durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó el exceso de anticuerpo en tres lavados sucesivos de TBS, tras los que se pasó a una incubación en 1,5 ml de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology

Assoc.) a una concentración de 1:1000 en tampón de anticuerpo durante 1,5 h a temperatura ambiente. A continuación, el complejo Δ FosB anticuerpo-peroxidasa se reveló usando 0,5 mg/ml diaminobenzidina (Sigma), 0,7 mg/ml $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) y 0,5 $\mu\text{l/ml}$ H_2O_2 (Sigma) en TBS. Las secciones se montaron sobre portaobjetos (Superfrost Plus Slides, Thermo Scientific), secadas en concentraciones crecientes de etanol y cubiertas mediante DPX (Sigma). Una vez cubiertas, se capturaron las imágenes necesarias para el análisis con un microscopio de campo claro (NIKON Eclipse E400).

7.5. Captura y análisis de imágenes

Para delimitar las coordenadas de análisis en cada ensayo se utilizó el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2014). Las imágenes se capturaron mediante un microscopio NIKON Eclipse E400 equipado con una cámara DMX 1200 en el caso de la ISH radiactiva, la CISH y la IHC y las de la dFISH con un microscopio confocal Olympus Fluoview 1000. Un ejemplo de cada tinción lo podemos observar en la **Figura 8**.

En el caso de la ISH radiactiva, para comprobar que el tiempo de exposición a las películas había sido el necesario para su correcto análisis densimétrico, se realizaron y cuantificaron en cada caso fotografías de exposiciones de secciones que mostraban una intensidad alta, media y baja. Las unidades arbitrarias obtenidas se interpolaron en gráficas de saturación realizadas mediante una microescala autorradiográfica de ^{14}C que se fotografió y cuantificó en las mismas condiciones, comprobando que los distintos valores se situaran en la parte lineal de la gráfica, ideal para su cuantificación. Para determinar los niveles de mRNA de *Arc* se capturaron entre 4 y 8 secciones por área y animal sin diferenciar entre hemisferios, utilizando 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. Los valores de densidad óptica integrada resultantes fueron expresados en unidades arbitrarias.

Para la CISH y la IHC se captaron entre 2 y 6 imágenes por animal y área. Las condiciones de captura se mantuvieron estables para cada área, en las condiciones óptimas. Para el procesamiento y 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 analizar la CISH se cuantificaron de manera

manual mediante el uso de la herramienta “círculo”, mientras que la IHC se midió de manera automática utilizando una “macro” generada, y cedida amablemente, por J. Pastor-Ciurana (miembro de nuestro grupo de investigación). Se consideraron neuronas positivas a partir de 3 desviaciones estándar por encima del fondo.

Por último, para el análisis de la dFISH se capturaron entre 2 y 6 imágenes por animal y área. Las condiciones de la captura para el mRNA (potencia de láser, “gain”, “digital offset” y zoom) fueron siempre las mismas para todos los animales, pero optimizadas para cada área. Para el procesamiento y 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 la cuantificación de las imágenes se procedió de la siguiente manera: i) se separó cada imagen en sus tres canales (tinción nuclear, fenotipo y *c-fos*) y, de manera manual, mediante el uso de la herramienta “círculo”, se contaron primero las neuronas positivas correspondientes al mRNA del fenotipo (D2R⁺); 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*⁺); iii) en el canal de *c-fos*, se seleccionaron las neuronas *c-fos*⁺: suma de “*c-fos*⁺/D2R⁺” + “*c-fos*⁺/D2R⁻”. Se consideraron neuronas positivas a partir de 3 desviaciones estándar por encima del fondo.

7.6. Áreas estudiadas

Las coordenadas del estudio (**figura 9**) fueron seleccionadas basadas en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2014). La cuantificación de la Cg1, PrL e IL se realizó de Bregma 3,72 a 2,76 mm, el estriado de Bregma 2,28 a 1,56 mm, el LSv de Bregma 1,28 a 0,36 y el PVNmpd de Bregma -1,80 a -1,92. La cuantificación del estriado (excluyendo el NAc) se realizó dibujando un eje que lo dividió en cuatro cuadrantes nominados: estriado dorsal-medial (DMS), estriado dorsal-lateral (DLS), estriado ventral-medial (VMS) y estriado ventral-lateral (VMS). Esta división se realizó porque a pesar de que el estriado es aparentemente homogéneo, podría no serlo a nivel funcional (Voorn et al. 2004). El NAc se dividió en: NAcC, NAcSh y NAcSh Vertex. En los casos en los que el NAcSh se subdividió en dos fue porque se observó un patrón de expresión distinto. Cuantificamos la mPFC por su papel central en la regulación de la respuesta de estrés, el estriado por su papel en el procesamiento de estímulos aversivos y ambas por tener el sistema

dopaminérgico en desarrollo durante la adolescencia, y por tanto ser vulnerables a las alteraciones producidas por la exposición a estrés (ver puntos 2.1, 3.2 y 3.3 de la introducción, respectivamente). Por último, el LSv y el PVNmpd se estudiaron por ser dos áreas sensibles a la intensidad del estímulo estresante y correlacionar positivamente con la respuesta de ACTH (Úbeda-Contreras et al. 2018).

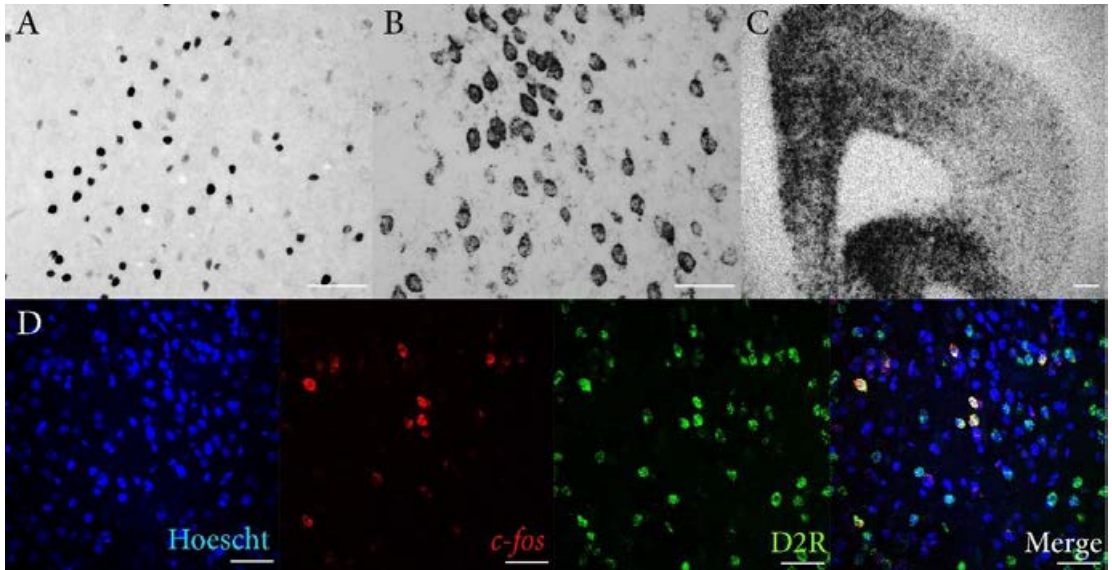


Figura 8. Ejemplos de tinción.

Cada figura muestra un ejemplo de cada tinción. La figura A corresponde a la IHC para Δ FosB (LSv), la B ISH cromógena para c-fos (LSv), la C ISH radioactiva para Arc (mPFC), y la D doble FISH para c-fos y D2R (NAc). La barra blanca indica la escala: 50 μ m en las figuras A, B y D, y 500 μ m en la C.

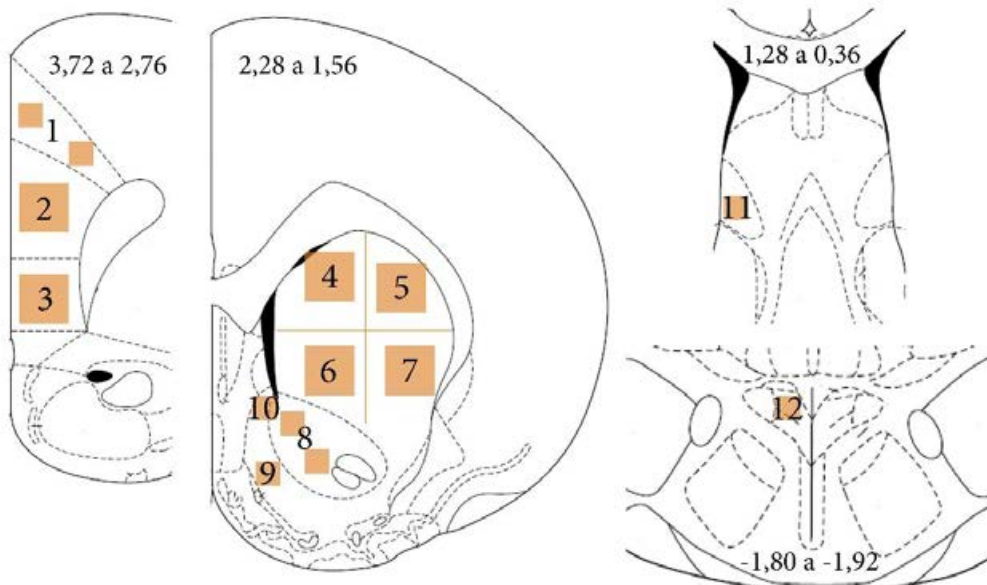


Figura 9. Áreas estudiadas.

La figura muestra las áreas estudiadas en los análisis histológicos. Los números colindantes a los cuadrados naranjas significan: 1: Corteza Cingulada (Cg1), 2: Corteza Prelímbica (PrL), 3: Corteza Infralímbica (IL), 4: Estriado dorso-medial (DMS), 5: Estriado dorso-lateral (DLS), 6: Estriado ventro-medial (VMS), 7: Estriado ventro-lateral (VLS), 8: Núcleo Accumbens Core (NAcC), 9: Núcleo Accumbens Shell (NAcSh), 10: NAcSh Vertex, 11: Septum Lateral ventral (LSv) y 12: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo división parvocelular dorso-medial (PVNmpd). Los números fuera de los recuadros indican la altura de Bregma (mm).

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Science, 205. IBM SPSS Statistics para Windows, versión 23.0. IBM Corp.). El factor entre sujetos fue el GRUPO, con 3 niveles: S-E, CST y UST. En el caso de los estudios con fármacos se añadió el factor FÁRMACO: Vehículo (VEH), SCH23390 (antagonista D1; Anta-D1) y (antagonista D2; Anta-D2). Cuando fue necesario se introdujo un factor intrasujeto que varió en función de la variable dependiente.

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 incorporaron 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 (X^2) usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida. En el caso de encontrar interacciones estadísticamente significativas, se realizó la descomposición por pares pertinente. En todos los casos se realizaron contrastes *a posteriori* comparando todos los grupos entre sí mediante la corrección de Bonferroni secuencial. El criterio de significación en todos los casos se estableció en $p < 0.05$, aunque las tendencias a la significación entre $p > 0,05$ y $p < 0,1$ también se mencionaron.

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

Resultados

Experimento 1. Consecuencias endocrinas, conductuales y sobre el SNC de la exposición a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia

1. Planteamientos y objetivos

El interés por los efectos de la exposición a estrés durante la adolescencia ha crecido en los últimos años. Como revisamos en el apartado 6 de la introducción se han utilizado diferentes modelos para abordar esta temática. Sin embargo, a pesar de los efectos protectores de la exposición a estrés controlable frente a una incontrolable observados en adultos (ver revisiones en Maier y Watkins 1998; Maier y Seligman 2016), el interés por los efectos de este paradigma durante la adolescencia ha sido escaso. Los datos disponibles, aunque limitados, indican que la adolescencia es sensible a la controlabilidad (Leussis y Andersen 2008; Kubala et al. 2012; Sanchís-Ollé et al. 2019). En el presente trabajo se utiliza la TWAA como modelo de estrés controlable para comparar el impacto del mismo estímulo aversivo y en las mismas condiciones, pero en ausencia de controlabilidad. Los objetivos del presente capítulo son: (i) evaluar los parámetros de adquisición de la tarea y su impacto sobre la conducta en dicha tarea (cruzamientos durante la habituación y el ITI), (ii) valorar los cambios endocrinos y conductuales producidos por la exposición a este paradigma a corto y largo plazo, (iii) estudiar los cambios en la actividad del SNC durante la exposición a estrés adolescente y su actividad constitutiva, a corto y largo plazo, así como la respuesta a un nuevo estímulo estresante heterotípico debido a la exposición adolescente a corto plazo; y (iv) analizar los cambios generados por el estrés adolescente en el patrón de activación de las neuronas D2 del estriado tras la exposición a un estímulo estresante heterotípico a corto plazo. En el presente trabajo no se evaluaron diferencias en la respuesta de petrificación durante la habituación, ni cambios en la respuesta del eje HPA durante la exposición, así como tampoco se valoraron modificaciones en los marcadores somáticos de estrés al finalizar la exposición, debido a que ya se habían estudiado previamente en experimentos previos de nuestro laboratorio utilizando el mismo procedimiento (Sanchís-Ollé 2018). En estos estudios no se observaron diferencias mediadas por la controlabilidad en la tasa de petrificación, pero sí en la respuesta del eje HPA

en la última sesión, la cual estaba amortiguada respecto a la respuesta en la sesión 1. En esta última sesión la respuesta del eje HPA fue más reducida en el grupo CST que en el UST, aunque estos cambios no repercutieron en los marcadores somáticos (peso, tamaño de la adrenal y timo).

2. Diseño experimental

Se utilizaron un total de 90 animales. Estos se distribuyeron al azar de forma equitativa (n=30) entre los tres grupos de estrés adolescente: grupo NS, grupo CST y grupo UST. Diez sujetos de cada grupo de estrés adolescente fueron perfundidos a corto plazo en condiciones basales (CP), o bien tras una exposición a estrés heterotípico o a largo plazo en condiciones basales (LP). Un resumen del procedimiento y los grupos experimentales se puede ver en la **Tabla 1**. Todos los sujetos fueron expuestos a 8 sesiones no consecutivas de estrés (o expuestos a la caja lanzadera en el caso del NS) desde el PND 27±1 al 48±1.

Por un lado, se evaluó el impacto sobre la respuesta del eje HPA tras la exposición a estrés de intensidad moderada-alta (FST), baja (OF) y en condiciones basales. Además de la respuesta hormonal, se evaluó la conducta en la FST y el OF. Por otro lado, una vez transcurridos cuatro días de la última sesión de estrés adolescente, 60 animales fueron, o bien perfundidos en condiciones basales (CP, n=30) o bien perfundidos tras la exposición a 30 min de FST y el resto (grupo LP, n=30), 30 días después de la última sesión de estrés adolescente en condiciones basales.

Tabla 1. Grupos experimentales y diseño Capítulo 1

Grupo				PND 27-48 (±1)	PND 52 (±1)	PND 53 (±1)	PND 56 (±1)	PND 78 (±1)
CP Basal	NS (9)	CST (10)	UST (10)	Exposición a caja lanzadera	Perfusión			
LP Basal	NS (10)	CST (10)	UST (10)	Exposición a caja lanzadera		OF + TM	TM	Perfusión
CP FST	NS (10)	CST (10)	UST (10)	Exposición a caja lanzadera	FST + TM+ Perfusión			

*Del PND 27 al 48 se realizó la exposición a estrés adolescente. El PND 52 los animales del grupo Corto Plazo Basal y Estrés fueron perfundidos, estos últimos tras la exposición a 30 min de FST y toma de muestra de sangre (TM) al acabar. El PND 53 los sujetos del grupo LP fueron expuestos a un OF y TM y el 56 a una TM en condiciones basales. El PND 78 los sujetos del grupo Largo Plazo basal fueron perfundidos. El número entre paréntesis indica la **n**. PND: día postnatal, CP: corto plazo, LP: largo plazo, FST: prueba de natación forzada, NS: sin estrés, CST: estrés controlable, UST: estrés incontrolable, TM: toma de muestra (sangre), OF: campo abierto.*

3. Resultados

3.1. Caja lanzadera y TWAA

La **figura 10** representa el número promedio de evitaciones, escapes y respuestas nulas durante las 8 sesiones de TWAA del grupo CST. Se realizó un análisis de medidas repetidas (GEE) para cada parámetro. Los datos del GEE muestran un efecto significativo del factor SESIÓN en el número de evitaciones ($X^2(7) = 64,9$; $p < 0,001$), escapes ($X^2(7) = 39,8$; $p < 0,001$) y respuestas nulas ($X^2(7) = 19,3$; $p = 0,007$). La comparación por pares se realizó utilizando la corrección secuencial de Bonferroni y mostró un incremento significativo en el número de evitaciones a lo largo de las sesiones y un descenso en el número de escapes. El número de respuestas nulas fue muy bajo y la comparación por parejas no reveló efectos entre sesiones. El número de evitaciones incrementó de forma significativa en la sesión 3 respecto a la sesión 1, y a partir de ésta siguió una progresión menos marcada (que no dio lugar a diferencias significativas en la comparación por parejas entre las distintas sesiones), alcanzando un promedio de 29 evitaciones en la última sesión. En paralelo se observó, lógicamente, un descenso en el número de escapes en las dos primeras sesiones respecto a la sesión 1 que se estabilizó posteriormente con un promedio de 20 escapes en la última sesión.

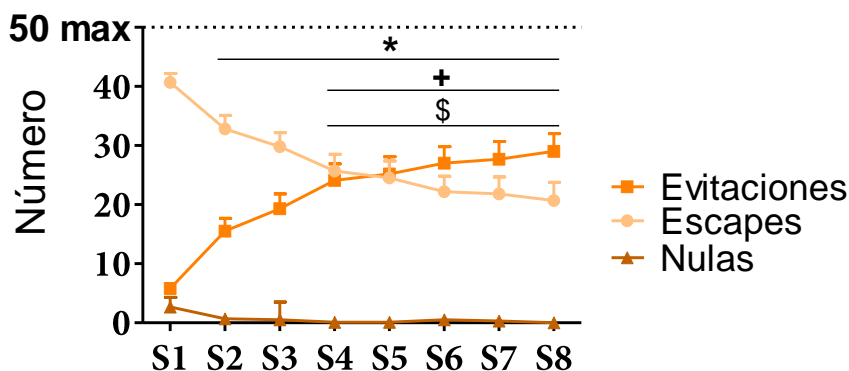


Figura 10. Curva de adquisición de la TWAA durante la adolescencia: Experimento 1.

Se grafican el número de evitaciones, escapes y respuestas nulas de los sujetos CST ($n=30$) por cada sesión. Los puntos representan la media y el error estándar de la media (SEM). Los símbolos indican: * $p \leq 0,001$ vs la S1 en el número de evitaciones y escapes; + $p \leq 0,001$ en el número de evitaciones y de $p \leq 0,01$ en el número de escapes vs la S2; y \$ $p \leq 0,05$ en el número de evitaciones vs la S3.

El tiempo total de choque eléctrico recibido (**figura 11.A.**) se analizó con un GEE de un factor (SESIÓN), siendo este significativo ($X^2(7) = 34,4$; $p < 0,001$). En concreto, el tiempo de choque se redujo significativamente de la sesión 1 a la 2ª. La latencia de respuesta (**figura 11.B.**), que representa el tiempo desde que inicia el CS hasta que el animal cruza al compartimento contrario durante el CS o el US. Se analizó también utilizando un GEE de un factor (SESIÓN), observándose un efecto significativo ($X^2(7) = 84,5$; $p < 0,001$). El análisis por parejas mostró un descenso significativo de la latencia de respuesta entre la sesión 1 y las demás.

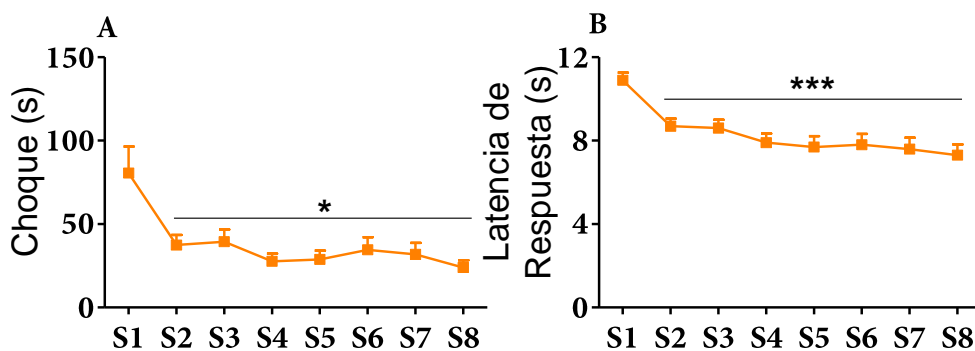


Figura 11. Tiempo de choque y latencia de respuesta: Experimento 1.

Para cada sesión, la figura A marca el tiempo de choque y la B la latencia de respuesta en el grupo CST ($n=30$). Los puntos representan la media y el SEM. En la figura A el símbolo * indica $p \leq 0,05$ diferencias vs la S1. En la figura B *** indica $p \leq 0,001$ vs la S1.

Se cuantificó el número de cruzamientos durante el periodo de habituación como medida de actividad motora en la primera sesión y como medida del miedo al contexto en las siguientes sesiones. Asimismo, se evaluó el número de cruzamientos durante el ITI. Esta medida es un marcador de la adquisición del miedo condicionado en el grupo UST y en el CST en la primera sesión. En las siguientes sesiones, el número de cruzamientos durante el ITI correlaciona con el número de evitaciones. Este último parámetro sólo fue evaluado en los animales del grupo CST (n=30) y la mitad de los UST (n=15) por razones técnicas.

El número de cruzamientos durante la habituación (**figura 12**) se analizó mediante un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). Tanto el factor SESIÓN ($X^2(7) = 427$; $p < 0,001$), como el factor GRUPO ($X^2(2) = 191$; $p < 0,001$) fueron significativos, así como la interacción entre ambos factores ($X^2(14) = 124$; $p < 0,001$). La descomposición de la interacción indicó un descenso en el número de cruzamientos durante la fase de habituación en los grupos CST y UST respecto a la sesión 1 y niveles inferiores, respecto al grupo NS en las sesiones de la 2 a la 8, sin diferencias entre los grupos CST y UST.

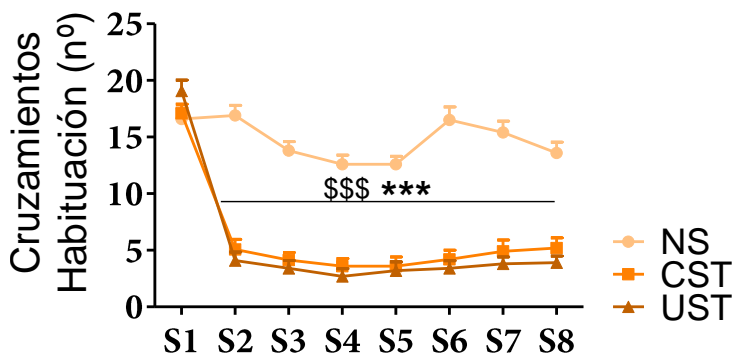


Figura 12. Número de cruzamientos durante la fase de habituación: Experimento 1.

Número de cruzamientos durante la fase de habituación para cada sesión en los grupos NS (n=30), CST (n=30) y UST (n=30). Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos \$\$\$ indican $p \leq 0,001$ diferencias vs la S1; *** $p \leq 0,001$ vs el grupo NS en la misma sesión.

El número de cruzamientos durante el ITI (**figura 13**) se analizó con un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). Ni el factor SESIÓN, ni el factor GRUPO fueron significativos, pero sí la interacción entre ambos factores ($X^2(7) = 36,7$; $p < 0,001$). La descomposición de la interacción mostró que el patrón a lo largo de las sesiones difería entre grupos. Mientras que en el grupo CST se observó

un incremento progresivo (aunque no significativo, salvo una tendencia a la significación entre la sesión 1 y 8; $p=0,054$), en el UST se observa un descenso respecto a la primera sesión (estadísticamente significativo vs la S3 ($p<0,001$) y la S8 ($p=0,01$) y marginal en la S4 ($p=0,06$) y la S7 ($p=0,09$)). Pero más allá de la progresión temporal de ambos grupos, en la sesión 1 el número de cruzamientos fue superior en el grupo UST respecto al CST, mientras que en la última sesión fue al revés. El número de cruzamientos durante el ITI en el grupo CST correlaciona positivamente con el número de evitaciones sobre todo a partir de la segunda sesión (Tabla 2).

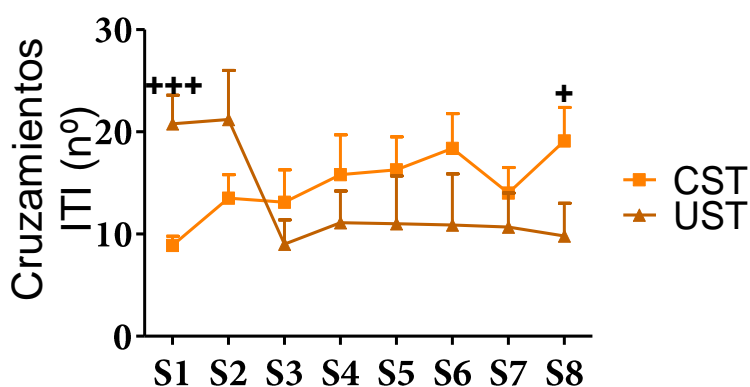


Figura 13. Número de cruzamientos durante el ITI: Experimento 1.

Se grafican el número de cruzamientos por cada sesión en los grupos CST ($n=30$) y UST ($n=15$). En el grupo UST solo se pudieron evaluar los cruzamientos en la mitad de los sujetos por motivos técnicos. Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican $+++ p \leq 0,001$ y $+ \leq 0,05$ indican diferencias vs el grupo CST en la misma sesión. El grupo CST en la S1 tendió a la significación vs la S8 ($p=0,054$). En el grupo UST la S1 difirió significativamente de la S3 ($p<0,001$) y la S8 ($p=0,01$) y marginalmente de la S4 ($p=0,06$) y la S7 ($p=0,09$).

Tabla 2. Correlaciones

Sesión	r
S1	0,39*
S2	0,84***
S3	0,70***
S4	0,61***
S5	0,72***
S6	0,62***

S7	0,75***
S8	0,67***

*Experimento 1. La tabla muestra la correlación entre el número de evitaciones y el número de cruzamientos durante el ITI en cada sesión (en el grupo CST). *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$.*

3.2. Consecuencias endocrinas a corto plazo

Estudiamos el impacto del estrés crónico previo sobre la actividad basal del eje HPA, así como la respuesta a estímulos estresantes heterotípicos de intensidad baja o moderada-alta. En todos los casos se realizó un GzLM de un factor (GRUPO) para analizar los resultados.

Los niveles basales se evaluaron el PND 56 en aquellos animales destinados a ser perfundidos a LP. Los niveles de ACTH (**figura 14.A.**) tendían a la significación ($X^2(2) = 5,6$; $p = 0,06$), mientras que en los de corticosterona (**figura 14.B.**) no se observaba efecto del factor GRUPO. El contraste por parejas con correcciones secuenciales de Bonferroni indicó una tendencia ($p = 0,09$) a niveles más bajos en el grupo NS que en el UST. La respuesta hormonal tras la exposición a un estímulo estresante de baja intensidad (OF) se estudió el PND 53. Tras 10 min de OF, el efecto grupo fue estadísticamente significativo para ACTH ($X^2(2) = 7,9$; $p = 0,01$; **figura 14.C.**), pero para corticosterona (**figura 14.D.**) el efecto estadístico fue marginal ($X^2(2) = 4,8$; $p = 0,08$). El contraste por parejas con corrección secuencial de Bonferroni nos permitió observar niveles superiores de ACTH en el grupo UST respecto al NS, sin diferencias con el CST. El PND 52 se evaluó los niveles hormonales tras la exposición a un estímulo estresante de intensidad moderada-alta (FST; 30 min). El factor GRUPO no resultó estadísticamente significativo para ACTH (**figura 14.E.**), pero sí para corticosterona ($X^2(2) = 7,8$; $p = 0,01$; **figura 14.F.**). El contraste por parejas con correcciones secuenciales de Bonferroni reveló que los niveles de corticosterona fueron superiores en el grupo UST respecto a NS, sin diferencias con el CST.

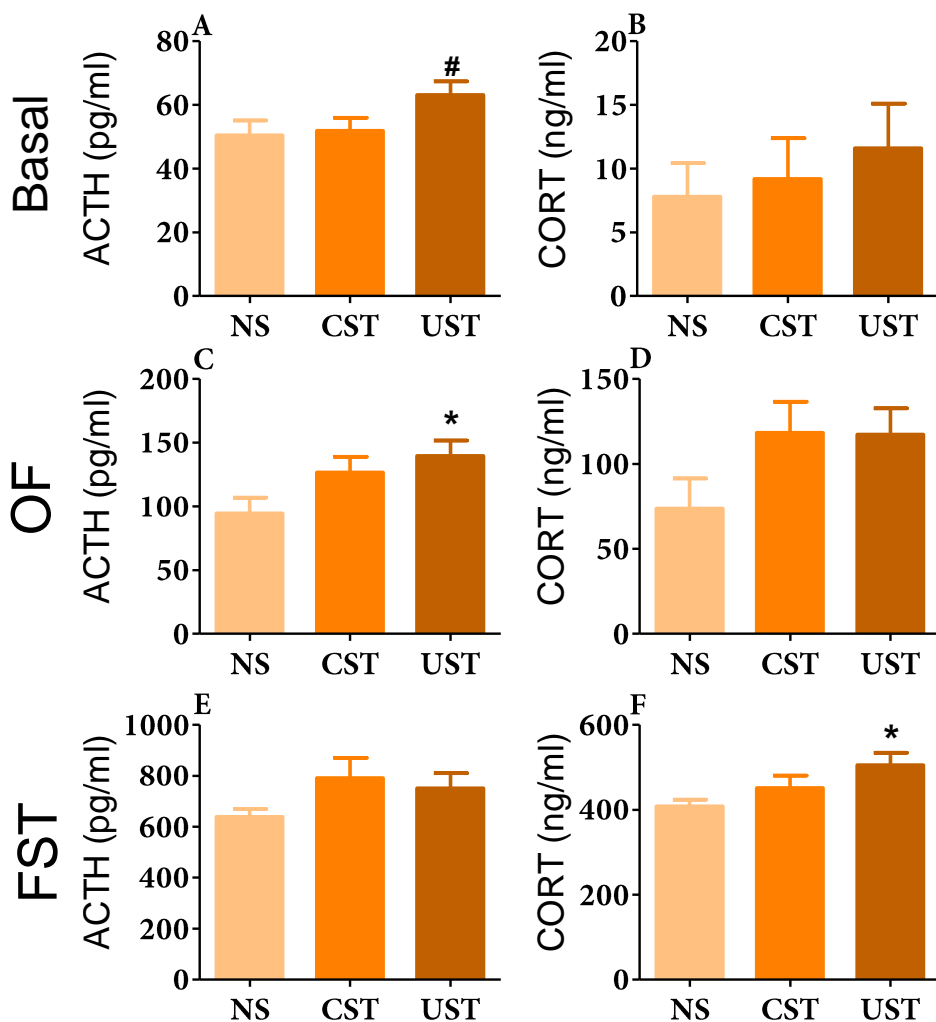


Figura 14. Consecuencias fisiológicas de la exposición a estrés adolescente.

La figura A y B indican los valores de ACTH y corticosterona a nivel basal. La C y D grafican la respuesta de ACTH y corticosterona en respuesta a un OF. Grupo LP: NS (n=10), CST (n=10) y UST (n=10). La E y F muestran los niveles basales de ACTH y corticosterona. Grupo FST: NS (n=10), CST (n=10) y UST (n=10).

Las escalas de cada gráfica (eje Y) se adaptan a los valores que marcan para facilitar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. # Diferencia marginal ($p=0,09$) vs NS; * diferencias $p \leq 0,05$ vs NS.

3.3. Consecuencias conductuales a corto plazo

Efectos sobre la actividad exploratoria

La actividad exploratoria se evaluó en un OF 5 días después de finalizar la última exposición a la tarea en la caja lanzadera. El análisis se efectuó mediante un GEE de dos factores (GRUPO y BLOQUE). El factor BLOQUE hace

referencia a los bloques temporales en los que se dividió la sesión para el análisis conductual y estaba compuesto por dos niveles (0-5 min y 5-10 min). Se midió el tiempo en el centro, la distancia recorrida en el centro, en la periferia y en total y el número de alzamientos (**figura 15**). El factor GRUPO no fue estadísticamente significativo para el tiempo en el centro (**Figura 15.A.**) pero lo fue marginalmente en el factor BLOQUE ($X^2(1) = 3,2$; $p=0,07$) y significativo para la interacción entre ambos factores ($X^2(2) = 8,7$; $p=0,01$). La descomposición de la interacción indicó que el tiempo en el centro descendió en los grupos CST (marginalmente) y UST en los últimos 5 min, respecto a los 5 primeros. El factor GRUPO no fue estadísticamente significativo, pero sí el factor BLOQUE ($X^2(1) = 11,3$; $p=0,001$) en la distancia recorrida en el centro (**figura 15.B.**), que indicó un descenso en la distancia recorrida en los últimos 5 min respecto a los primeros. No hubo efectos estadísticos de la interacción entre factores en esta variable. De nuevo, el factor GRUPO no fue significativo para la distancia recorrida en la periferia (**figura 15.C.**), pero sí el factor BLOQUE ($X^2(1) = 49,2$; $p<0,001$) y la interacción de BLOQUE*GRUPO ($X^2(2) = 41,8$; $p<0,001$). La descomposición de la interacción indicó que los animales expuestos a estrés adolescente recorrieron menos distancia en la periferia que los del grupo NS, y que los tres grupos (marginal en el CST) redujeron la distancia recorrida en la periferia en los últimos 5 min respecto a los primeros. En la distancia recorrida en todo el campo (**figura 15.D.**), no hubo un efecto estadísticamente significativo para el factor GRUPO, pero sí para el factor BLOQUE ($X^2(1) = 54,1$; $p<0,001$) y para la interacción BLOQUE*GRUPO ($X^2(2) = 24,2$; $p<0,001$). La descomposición de la interacción reveló que los animales de los grupos CST (marginalmente) y UST recorrieron menos distancia que los del NS. Para el número de alzamientos (**figura 15.E.**) sólo se observó un efecto estadísticamente significativo del factor BLOQUE ($X^2(1) = 21,8$; $p<0,001$) que indicó un descenso en el número de alzamientos en los 5 min finales.

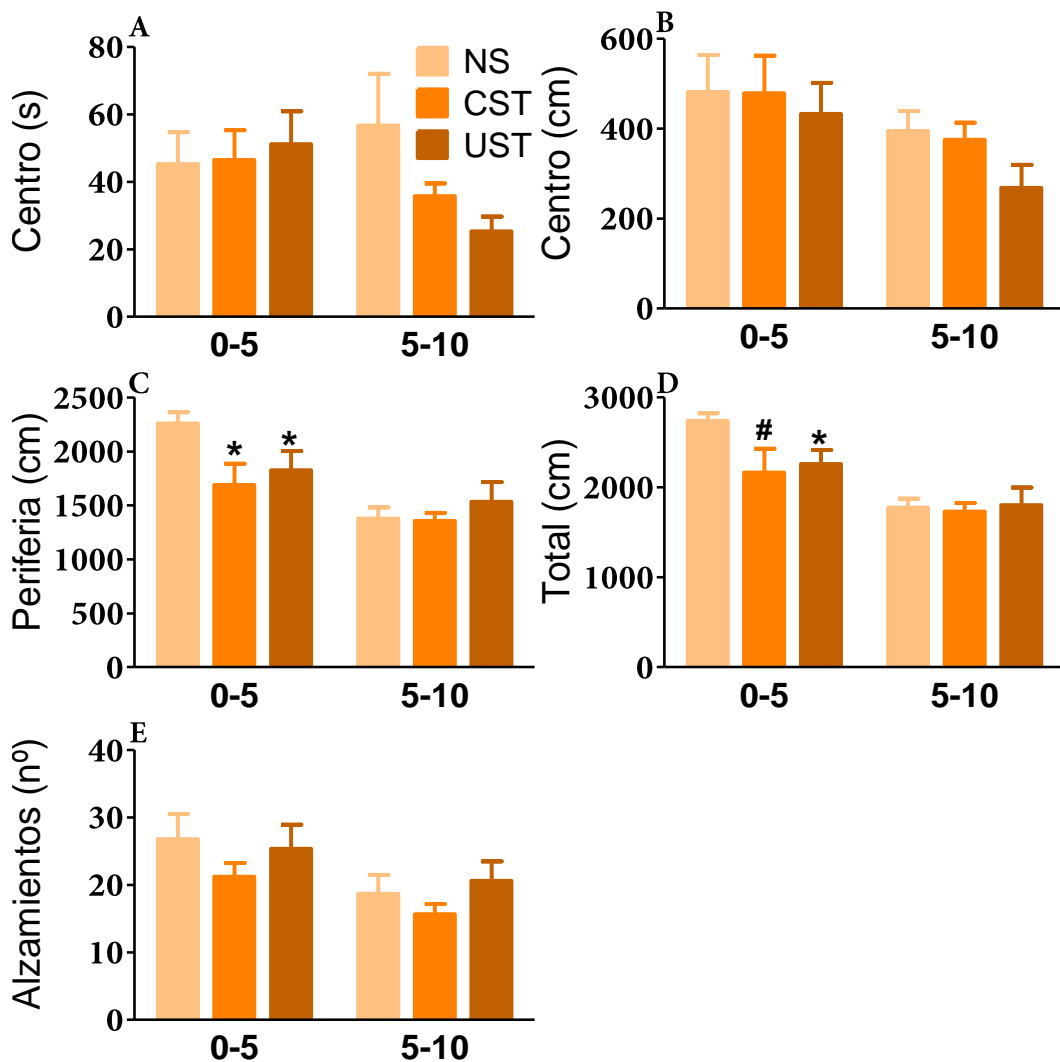


Figura 15. Respuesta conductual al OF.

La figura **A** muestra el tiempo (s) en el centro, la **B** muestra la distancia (cm) en el centro, la **C** en la periferia y la **D** en total (centro + periferia) y la **E** el número de alzamientos, en los dos intervalos estudiados en los 10 min de prueba (5 min iniciales y finales). Grupos: NS ($n=10$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * $p<0,05$ vs NS y # diferencias marginales ($p=0,054$) vs NS; en el mismo bloque temporal. Hay un descenso en el tiempo en el centro (figura **A**) en los grupos CST (marginal, $p=0,07$) y en el UST ($p<0,01$). Se observa un descenso en la distancia recorrida en el centro (figura **B**; $p<0,01$) y en el número de alzamientos (figura **E**; $p<0,001$) en los últimos 5 min respecto a los 5 primeros. Hay un descenso en la distancia recorrida en la periferia (figura **C**) en los grupos NS ($p<0,001$), CST ($p=0,08$) y UST ($p<0,01$) y en total (figura **D**) en los grupos NS ($p<0,001$), CST ($p<0,05$) y UST ($p<0,001$).

Efectos sobre el estilo de afrontamiento

El estilo de afrontamiento se valoró en la FST 4 días después de finalizada la última exposición a la tarea en la caja lanzadera. En esta prueba cuantificamos tres conductas: escape (**figura 16.A.**), nado suave (**figura 16.B.**) e inmovilidad (**figura 16.C.**); en tres bloques de tiempo (5 min iniciales, intermedios y finales). El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (GRUPO y BLOQUE). En los tres parámetros estudiados se observó un efecto estadísticamente significativo del factor BLOQUE: escape ($X^2(2) = 151$; $p < 0,001$), nado suave ($X^2(2) = 6,6$; $p = 0,03$) e inmovilidad ($X^2(2) = 91,7$; $p < 0,001$). También se observó en el factor GRUPO ($X^2(2) = 14,6$; $p = 0,001$) para el tiempo de escape. En ninguno de los tres parámetros estudiados la interacción GRUPO*BLOQUE fue significativa. La comparación por pares del factor BLOQUE revelaron un descenso en la conducta de escape en los dos últimos períodos de tiempo respecto al primero, un descenso en el tiempo de nado suave en los últimos 5 min respecto a los primeros, y un incremento en el tiempo de inmovilidad en los 5 min intermedios y finales, respecto a los 5 min iniciales. La comparación por pares del factor GRUPO mostró que los animales de los grupos CST y UST realizan más conducta activa que los del grupo NS, sin diferencias entre los dos primeros.

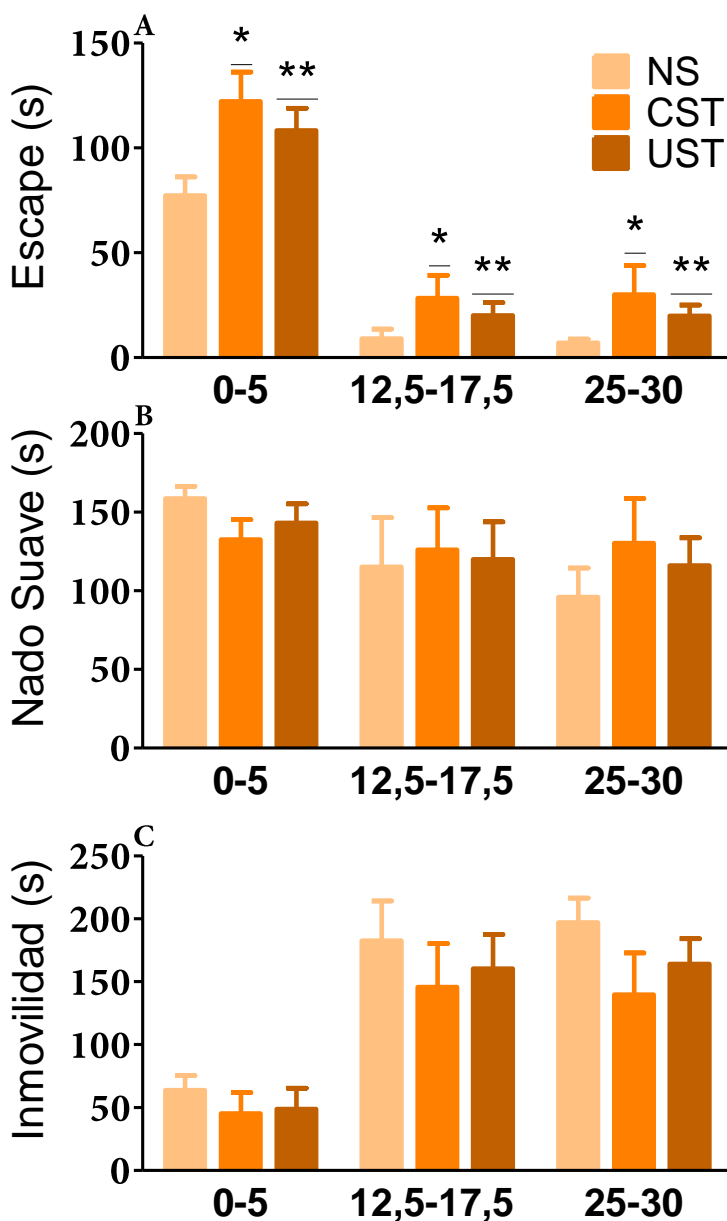


Figura 16. Respuesta conductual a la FST.

La figura A muestra el tiempo (s) de escape, la B de nado suave y la C de inmovilidad, en los tres intervalos estudiados durante los 30 min de FST (5 min iniciales, intermedios y finales). Grupos: NS (n=10), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad.

Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$ diferencias vs NS. El tiempo de conducta de escape (figura A) desciende en los dos últimos bloques respecto a los 5 min iniciales ($p < 0,001$), en el de nado suave (figura B) en los últimos 5 min respecto a los primeros ($p < 0,05$) y en el tiempo de inmovilidad un incremento en los dos últimos bloques de tiempo respecto al primero ($p < 0,001$).

3.4. Activación del SNC durante el período de estrés adolescente: Δ FosB

La activación neuronal asociada a la exposición al estrés durante el periodo adolescente se evaluó mediante el marcador de activación Δ FosB, a corto y largo plazo (factor TIEMPO), es decir, 4 y 30 días, respectivamente, después de la finalización de la tarea en la caja lanzadera. Esta evaluación se hace en condiciones basales dado que el anticuerpo usado en la IHC también reconoce FosB, el cual se expresa tras la exposición a estrés agudo. Un animal del grupo NS a corto plazo basal fue eliminado por problemas en el tejido durante el procesamiento histológico quedando la n de este grupo reducida de 10 a 9. Las áreas estudiadas fueron Cg1, PrL, IL, NAcC, NAcSh y NAcSh Vertex, DMS, VMS y Lsv. Para el análisis estadístico se utilizó un GzLM de dos factores entre-sujetos (GRUPO y TIEMPO).

En ninguna de las tres subdivisiones de la mPFC el factor GRUPO fue significativo, pero sí que hubo efecto del factor TIEMPO en Cg1 ($X^2(1) = 8,3$; $p=0,004$; **figura 17.A.**), PrL ($X^2(1) = 5,2$; $p=0,02$; **figura 17.B.**) e IL ($X^2(1) = 4,3$; $p=0,03$; **figura 17.C.**). El efecto del factor TIEMPO indicó un descenso en el número de neuronas positivas para Δ FosB a LP respecto al número a CP, independiente del tratamiento de estrés adolescente. La interacción TIEMPO*GRUPO no fue significativa en ningún caso.

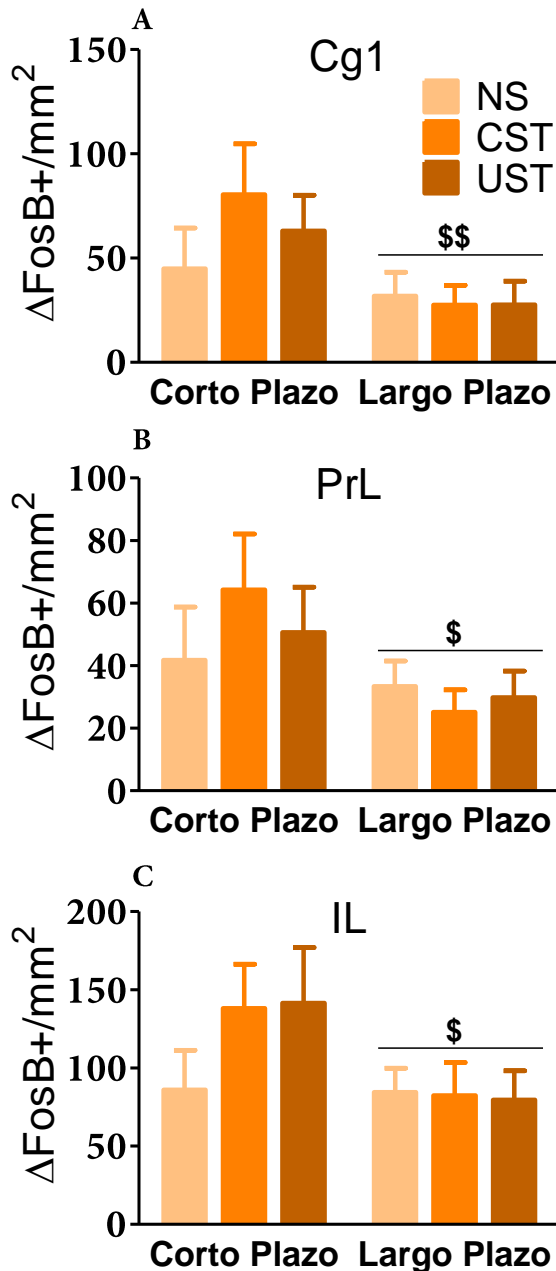


Figura 17. Neuronas positivas de Δ FosB por mm^2 en la mPFC.

La figura **A** muestra el número de células positivas/ mm^2 para Δ FosB en la Cg1, la **B** en la PrL y la **C** en la IL 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera (CP) y 30 días después (LP). Grupos CP: NS ($n=9$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$) y LP: NS ($n=10$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias $\$ p \leq 0,05$ y $\$\$ p \leq 0,01$ vs el CP, independientemente del tratamiento.

Al igual que ocurre en la mPFC, en ninguna de las subdivisiones estudiadas del estriado dorsal y ventral (**figura 18.A. DMS, 18.B. VMS, 18.C. NAcC, 18.D. NAcSh, 18.E. NAcSh Vertex**) hubo efecto del factor GRUPO. El factor TIEMPO fue estadísticamente significativo sólo en el NAcSh ($X^2(1) = 6,7; p = 0,009$) y en el NAcSh Vertex ($X^2(1) = 13,5; p < 0,001$), indicando un descenso en la expresión de Δ FosB en estas áreas en el grupo LP respecto al CP independientemente del tratamiento de estrés adolescente.

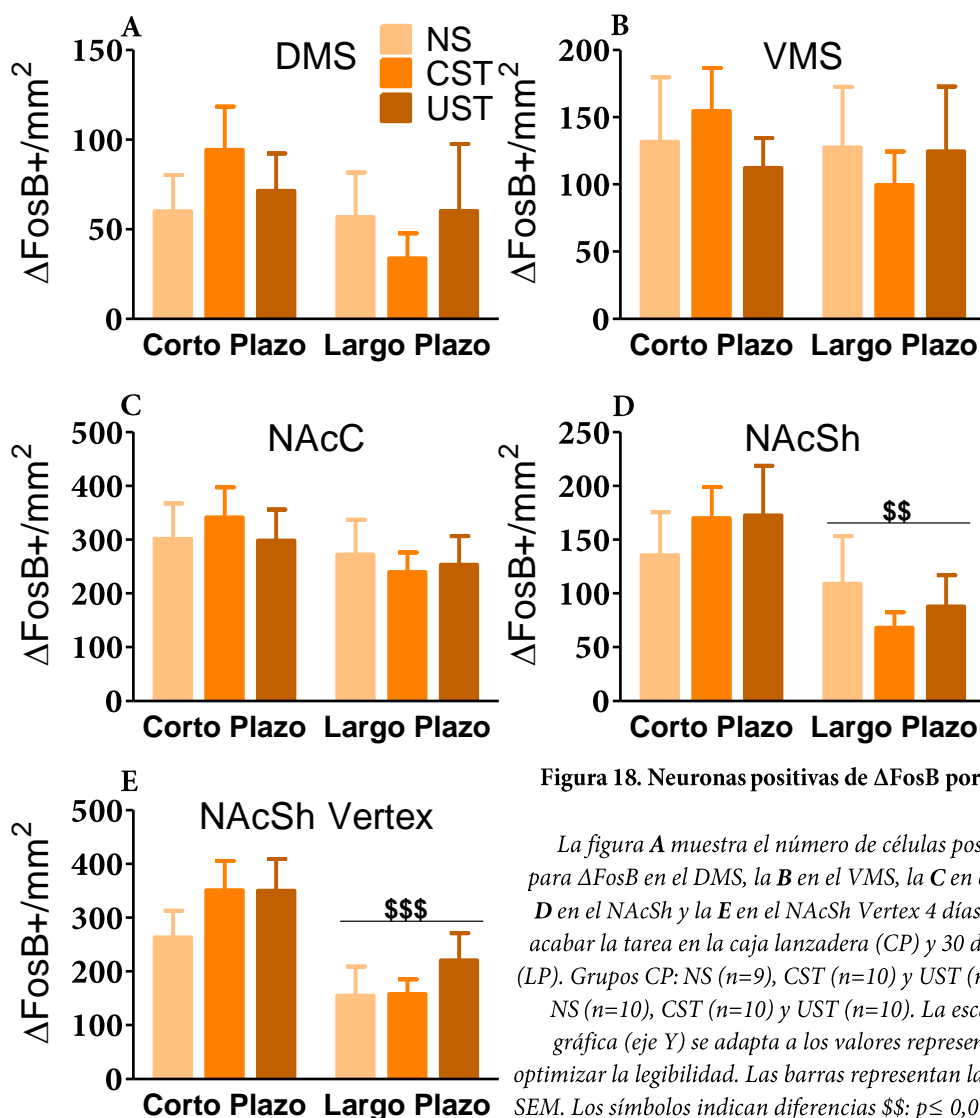


Figura 18. Neuronas positivas de Δ FosB por mm² en el estriado.

La figura A muestra el número de células positivas/mm² para Δ FosB en el DMS, la B en el VMS, la C en el NAcC, la D en el NAcSh y la E en el NAcSh Vertex 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera (CP) y 30 días después (LP). Grupos CP: NS (n=9), CST (n=10) y UST (n=10) y LP: NS (n=10), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y la SEM. Los símbolos indican diferencias \$: $p \leq 0,01$ y \$\$\$: $p \leq 0,001$ vs el CP independientemente del tratamiento de estrés adolescente.

En el LSv (**figura 19**) tanto el factor TIEMPO ($X^2(1) = 64$; $p < 0,001$), como el factor GRUPO ($X^2(2) = 23,3$; $p < 0,001$) fueron estadísticamente significativos, así como la interacción de ambos factores ($X^2(2) = 14,1$; $p = 0,001$). La descomposición de la interacción reveló un incremento en el número de neuronas Δ FosB positivas en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre ambos grupos. Estas diferencias desaparecieron a largo plazo.



Figura 19. Neuronas positivas de Δ FosB por mm^2 en el LSv.

Muestra el número de células positivas/ mm^2 para Δ FosB en el LSv 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera (CP) y 30 días después (LP). Grupos CP: NS ($n=9$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$) y LP: NS ($n=10$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias ***: $p \leq 0,001$ vs NS en el mismo plazo, \$\$\$: $p \leq 0,001$ vs el CP del mismo tratamiento adolescente.

3.5. Actividad constitutiva de Arc en la mPFC y el estriado

La expresión constitutiva del IEG *Arc* se estudió en la mPFC y el estriado 4 o 30 días después de la finalización de la tarea en la caja lanzadera. La mPFC fue cuantificada y analizada por Sofía Navarro (con mi colaboración), y los datos obtenidos en esta área formaron parte de su trabajo final de máster (Máster en Neurociencias por la Universidad Autónoma de Barcelona). El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de dos factores (GRUPO y TIEMPO). El factor GRUPO fue estadísticamente significativo en la Cg1 ($X^2(2) = 6,5$; $p = 0,03$; **figura 20.A.**), pero no en la PrL (**figura 20.B.**) o la IL (**figura 20.C.**), mientras que el factor TIEMPO fue estadísticamente significativo en las tres subdivisiones: Cg1 ($X^2(1) = 6,8$; $p = 0,009$), la PrL ($X^2(2) = 7,1$; $p = 0,008$) y en la IL ($X^2(1) = 49,3$; $p < 0,001$). La interacción entre ambos factores fue marginalmente significativa en las 3 subdivisiones de mPFC: Cg1 ($X^2(2) = 5,4$; $p = 0,06$), PrL ($X^2(2) = 5,5$; $p = 0,06$) e IL ($X^2(2) = 5,1$; $p = 0,07$). Procedimos a la

descomposición de la interacción analizando por separado los efectos a corto y largo plazo. Al analizarlo se observó un descenso significativo de los niveles de Arc en las tres subdivisiones en el grupo CST, y un descenso marginal ($p=0,09$) en la PrL del grupo UST, respecto al NS a CP, sin diferencias entre los grupos CST y UST. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales a LP. En las tres subdivisiones los niveles de Arc de los grupos CST y UST son más elevados a largo que a corto plazo, en tanto que se mantienen en el grupo NS.

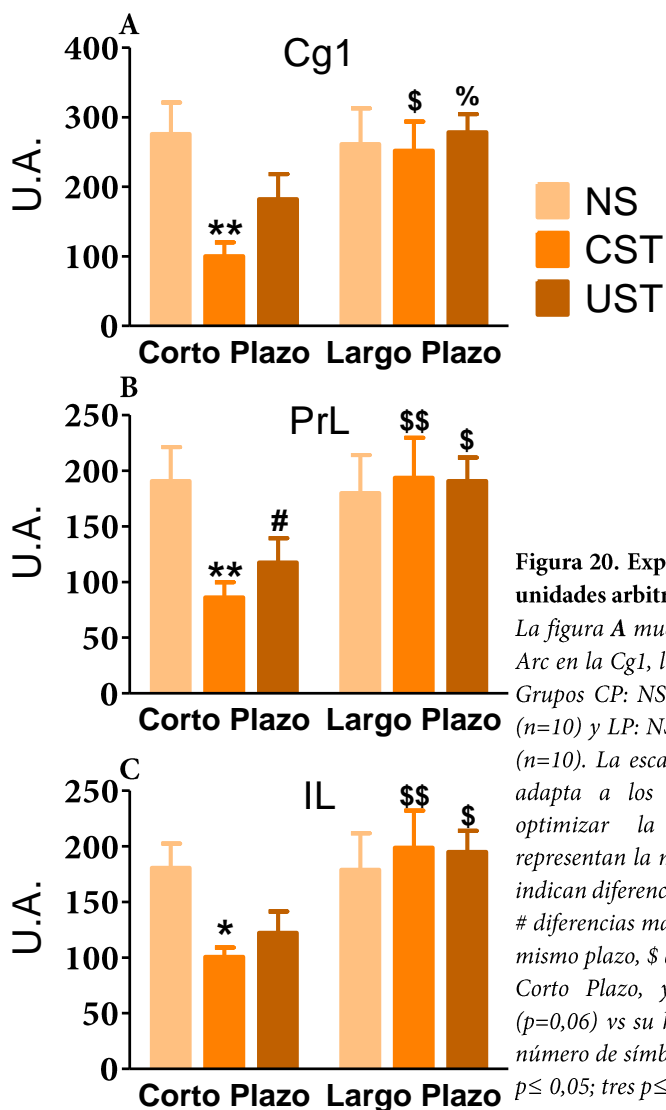


Figura 20. Expresión de Arc expresado en unidades arbitrarias (U.A.) en la mPFC.

La figura A muestra la expresión en U.A. de Arc en la Cg1, la B en la PrL y la C en la IL. Grupos CP: NS ($n=10$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$) y LP: NS ($n=10$), CST ($n=10$) y UST ($n=10$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias * vs NS en el mismo plazo, # diferencias marginales ($p=0,09$) vs NS en el mismo plazo, \$ diferencias vs su homónimo a Corto Plazo, y % diferencias marginales ($p=0,06$) vs su homónimo a Corto Plazo. El número de símbolos marca el valor de p : uno $p \leq 0,05$; tres $p \leq 0,001$.

Dado que el efecto sobre la expresión de *Arc* en la mPFC, decidimos estudiar el impacto en el estriado, cuantificándose la expresión de *Arc* en cuatro subdivisiones: DMS, VMS, DLS y VLS. Dos animales NS, uno CST y uno UST a corto plazo, y uno CST y otro UST a largo plazo, fueron eliminados por problemas en el procesamiento histológico. El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de dos factores (GRUPO y TIEMPO). El análisis estadístico del DMS (**figura 21.A.**) no reveló ningún efecto estadísticamente significativo, ni de los factores, ni de la interacción. En cambio, en el DLS (**figura 21.B.**) se observó un efecto estadísticamente significativo tanto del factor GRUPO ($X^2(2) = 6,6$; $p=0,03$), como del factor TIEMPO ($X^2(1) = 5,5$; $p=0,01$) y de la interacción GRUPO*TIEMPO ($X^2(2) = 6,7$; $p=0,03$). La descomposición de está, reveló que la expresión de *Arc* fue menor a corto plazo, pero no a largo, en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre los primeros. A largo plazo, los tres grupos se equipararon. También en la VMS se observó efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 5,9$; $p=0,05$; **figura 21.C.**), del factor TIEMPO ($X^2(1) = 4,7$; $p=0,02$) y de la interacción entre ambos factores ($X^2(2) = 7,7$; $p=0,02$). La descomposición de la interacción reveló de nuevo un descenso en la expresión de *Arc* en el CST y marginal ($p=0,07$) en el UST a corto plazo, pero no a largo, respecto al NS, sin diferencias entre los primeros. A largo plazo los tres grupos se equipararon. En la VLS se observó un efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 13,5$; $p=0,001$; **figura 21.D.**), pero no del factor TIEMPO, aunque sí de la interacción entre ambos ($X^2(2) = 8,6$; $p=0,01$). La descomposición de está, reveló que la expresión de *Arc* fue menor a corto plazo, pero no a largo, en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre los primeros. A largo plazo, los tres grupos se equipararon.

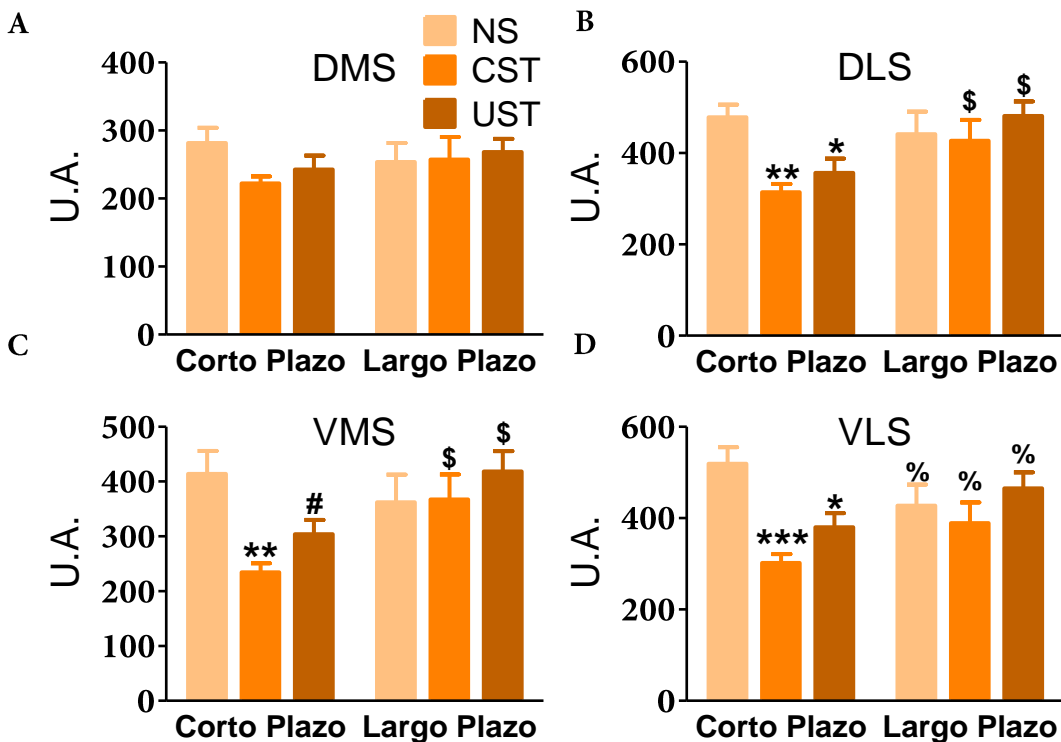


Figura 21. Expresión de Arc expresado en unidades arbitrarias (U.A.) en el estriado.

La figura A muestra la expresión en U.A. de Arc en el DMS, la B en el DLS, la C en el VMS y la D en el VLS 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera (CP) y 30 días después (LP). Grupos CP: NS (n=8), CST (n=9) y UST (n=9) y LP: NS (n=10), CST (n=9) y UST (n=9). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias * vs NS en el mismo plazo, # diferencias marginales ($p=0,07$) vs NS en el mismo plazo, \$ diferencias vs su homónimo a Corto Plazo, % diferencias marginales vs su homónimo a Corto Plazo (NS: $p=0,06$; CST: $p=0,07$; UST: $p=0,08$). El número de símbolos marca el valor de p : uno $p \leq 0,05$; dos $p \leq 0,01$; tres $p \leq 0,001$.

3.6. Expresión de Arc en la mPFC y el estriado en respuesta a un estímulo heterotípico

Dado el efecto a corto plazo del estrés adolescente en la expresión constitutiva de Arc, decidimos estudiar su expresión en la mPFC y el estriado tras la exposición a un estímulo estresante heterotípico 4 días después de finalizar el protocolo de estrés adolescente. Un animal del grupo NS fue eliminado por problemas en el proceso histológico. Está bien estudiado que la expresión de Arc se eleva en el telencéfalo tras la exposición a estrés, incluyendo la FST (Ons et al. 2004). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un GzLM de un factor (GRUPO).

El análisis de la mPFC reveló que hay un efecto estadísticamente significativo del factor GRUPO en Cg1 ($X^2(2) = 6,8$; $p=0,03$; **figura 22.A.**) pero no en PrL (**figura 22.B.**) o en IL (**figura 22.C.**). El análisis posterior en Cg1 mostró niveles superiores de *Arc* tras la exposición a FST en el grupo UST respecto al NS y una tendencia ($p=0,08$) respecto al CST.

El GzLM del estriado indicó un efecto significativo del factor GRUPO en el DMS ($X^2(2) = 8,5$; $p=0,01$; **figura 23.A.**), el DLS ($X^2(2) = 10,2$; $p=0,006$; **figura 23.B.**), el VMS ($X^2(2) = 15,2$; $p=0,00$; **figura 23.C.**) y el VLS ($X^2(2) = 9,9$; $p=0,007$; **figura 23.D.**). Las comparaciones posteriores indicaron que el grupo UST mostró una expresión superior de *Arc* que los otros dos grupos en las cuatro subdivisiones.

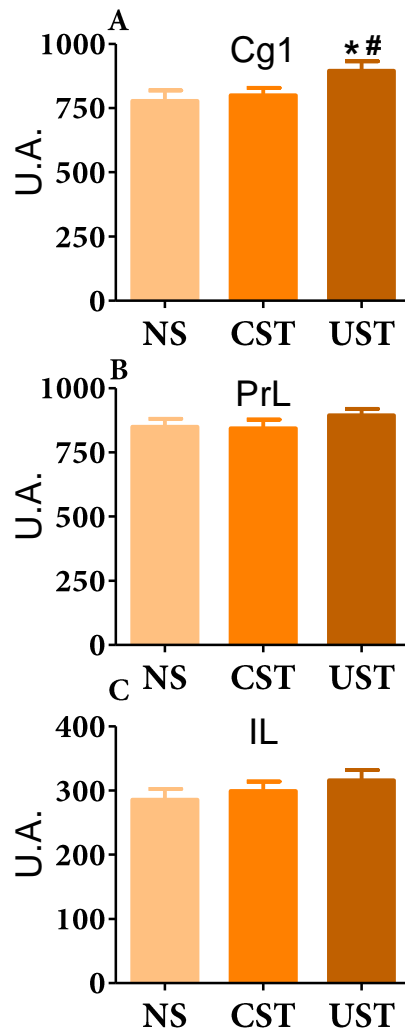


Figura 22. Expresión de Arc expresado en unidades arbitrarias (U.A.) en la mPFC en respuesta a FST. La figura A muestra la expresión en U.A. de Arc en la Cg1, la B en la PrL y la C en la IL 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera. Grupos: NS (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias * $p \leq 0,05$ vs NS; # marginales ($p=0,08$) vs CST.

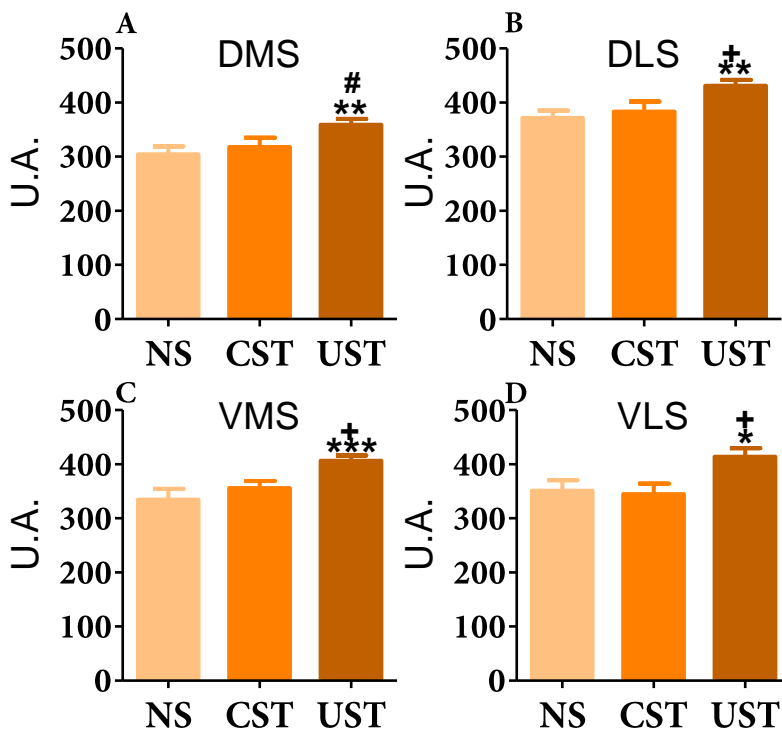


Figura 23. Expresión de Arc expresado en unidades arbitrarias (U.A.) en el estriado en respuesta a FST.

La figura A muestra la expresión en U.A. de Arc en el DMS, la B en el DLS, la C en el VMS y la D en el VLS 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera. Grupos: NS (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias * vs NS; + respecto CST; # marginales ($p=0,06$) vs CST. El número de símbolos marca el valor de p: uno $p \leq 0,05$; dos $p \leq 0,01$; tres $p \leq 0,001$.

3.7. Expresión de c-fos en el SNC en respuesta a un estímulo heterotípico

Debido a los cambios en la expresión de Arc, decidimos explorar otros IEG como el c-fos, el cual ha sido ampliamente utilizado para caracterizar el patrón de respuesta a estímulos estresantes (Armario 2006b). Asimismo, decidimos estudiar el número de neuronas por mm² en lugar de la expresión global de mRNA. Ambas medidas ofrecen información distinta pero complementaria. La expresión de mRNA nos indica la intensidad de la respuesta del IEG, pero no aporta información acerca del número de neuronas que se han activado. Por lo que hemos querido indagar en el número total de neuronas activadas. Un animal del grupo NS fue eliminado por problemas durante el procesamiento histológico. Se cuantificaron la mPFC, el DMS, el LSv y el PVNmpd (figura 24). Todas las áreas estudiadas se analizaron mediante un

GzLM de un factor (GRUPO). Sin embargo, en ninguna de las áreas evaluadas el factor GRUPO fue estadísticamente significativo.

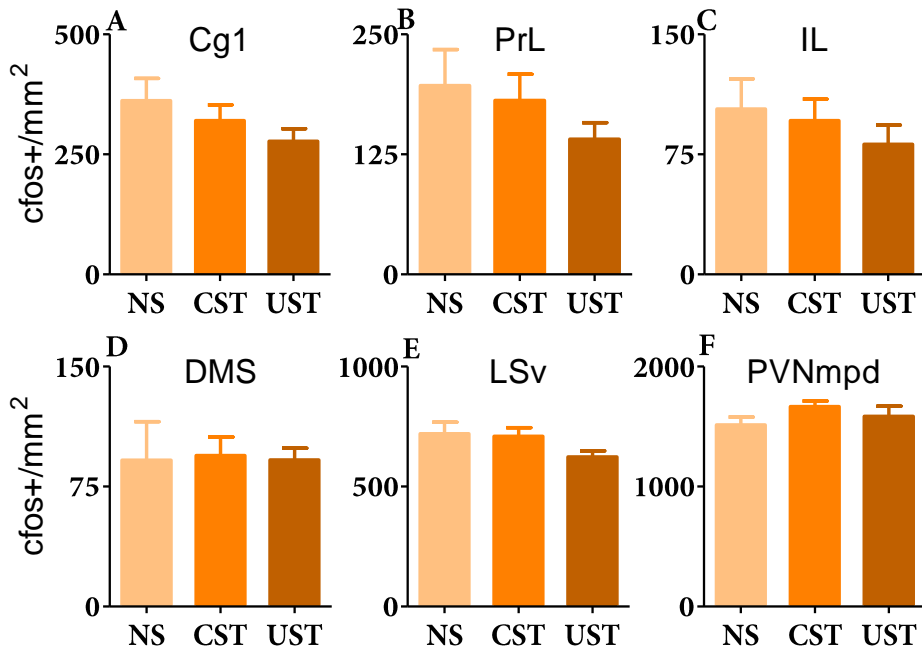


Figura 24. Número de neuronas positivas para *c-fos* por mm² en respuesta a FST.

La figura A muestra el número de células positivas/mm² para *c-fos* en la Cg1, la B en la PrL, la C en la IL, la D en el DMS, la E en el LSv y la F en el PVNmpd 4 días después de acabar la tarea en la caja lanzadera. Grupos: NS (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM.

Dado nuestro interés por el sistema dopaminérgico se estudió el impacto de la exposición a estrés adolescente sobre la respuesta de las neuronas del estriado mediante el uso de una doble FISH (*c-fos*, D2R). El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO). Las áreas estudiadas fueron el DMS, DLS, VMS, NAcC y NAcSh. En cada área se cuantificaron el número de neuronas D2R+, *c-fos*+, D2R+/c-*fes*+, D2R-/c-*fes*+, el porcentaje de neuronas D2R activadas y el porcentaje de neuronas activadas que son D2R. Dos animales del grupo NS fueron eliminados por problemas durante el procesamiento histológico.

En el DMS (**figura 25**) solo hubo efecto del factor grupo ($X^2(2) = 6,2; p = 0,04$) en el número de neuronas D2R-/c-*fes*+ (**figura 25.C.**). Las comparaciones posteriores indicaron que el número de neuronas positivas para *c-fos* que no

colocalizan con D2R (presumiblemente D1R+) es superior en los animales del grupo CST que en los del NS, sin existir diferencias con el grupo UST.

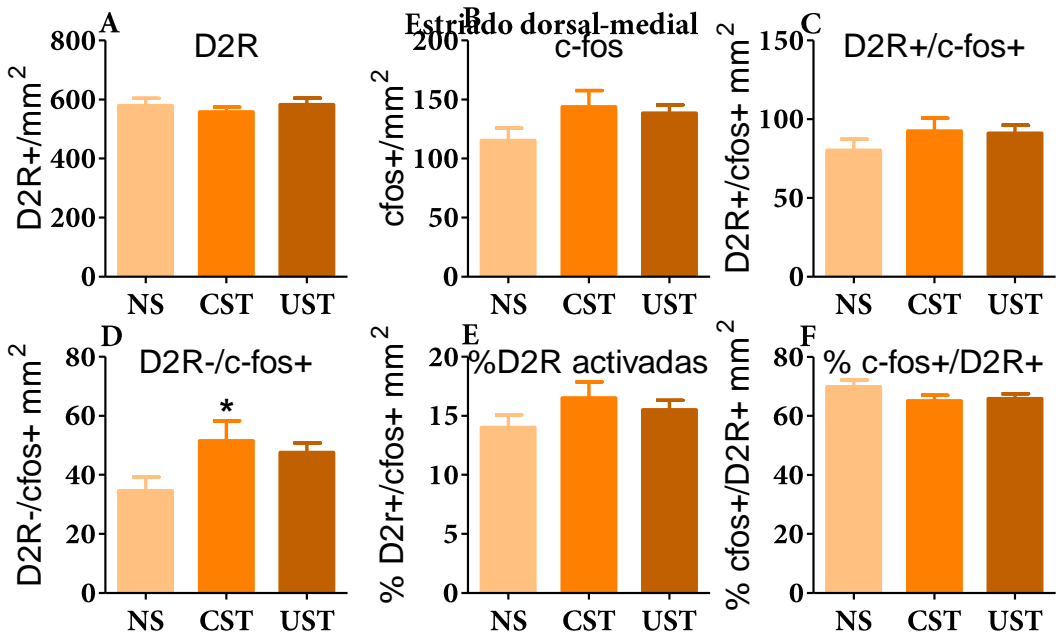


Figura 25. Activación del sistema dopaminérgico en el DMS tras la FST en sujetos que han sido expuestos a estrés adolescente.

La figura A indica el número de neuronas D2R+/mm², la B el de D2R+/c-fos+, la C el de D2R+/c-fos-, la D la de c-fos+, la E el porcentaje de neuronas D2R+ que expresa c-fos y la F el porcentaje de neuronas c-fos+ que expresan D2R. Grupos: VEH (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. * indica $p \leq 0,05$ diferencias vs NS.

El análisis estadístico del VMS (**figura 26**) reveló un efecto significativo del factor GRUPO en el número de neuronas c-fos+/D2R- ($X^2(2) = 7,1$; $p = 0,02$; **figura 26.C.**) y en el porcentaje de neuronas de c-fos+ que son D2R+ ($X^2(2) = 7,9$; $p = 0,01$; **figura 26.F.**). Las comparaciones posteriores indicaron que el grupo UST tiene más neuronas c-fos+/D2R- (presumiblemente D1R+) que el NS, sin diferir con el CST, y que este último muestra una expresión marginalmente superior ($p = 0,07$) respecto al NS en el número de neuronas c-fos+/D2R-. El porcentaje de neuronas c-fos+ que son D2R+ es menor en el CST y UST que en el NS, sin diferir entre ellos.

Estriado ventral-medial

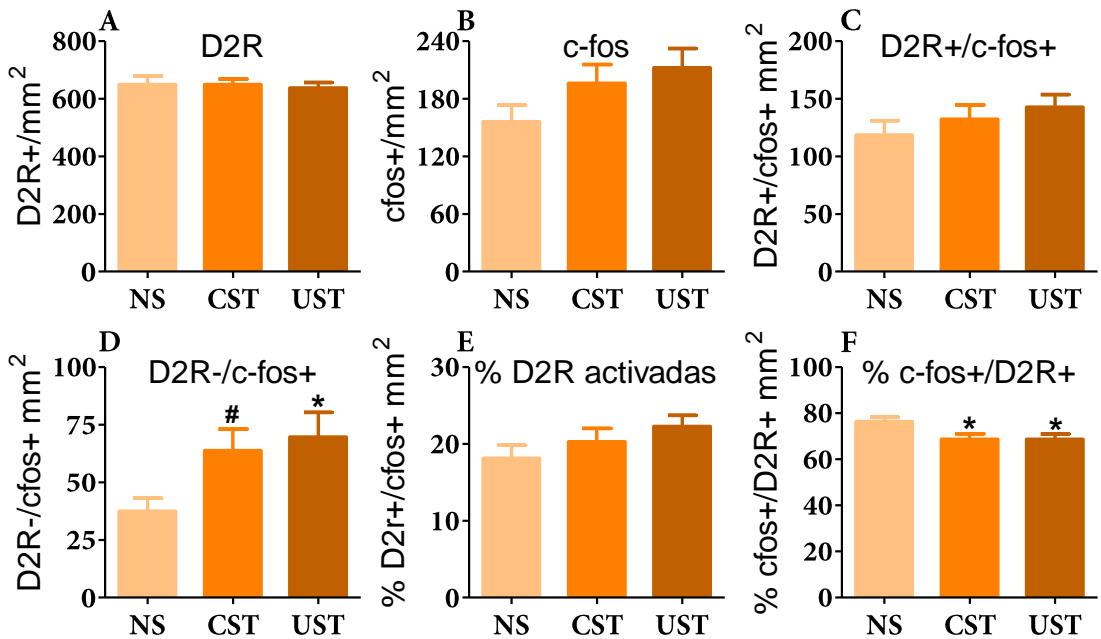


Figura 26. Activación del sistema dopaminérgico en el VMS tras la FST en sujetos que han sido expuestos a estrés adolescente.

La figura **A** indica el número de neuronas D2R+/mm², la **B** el de D2R+/c-fos+, la **C** el de D2R+/c-fos-, la **D** la de c-fos+, la **E** el porcentaje de neuronas D2R+ que expresa c-fos y la **F** el porcentaje de neuronas c-fos+ que expresan D2R. Grupos: VEH (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. * indica $p \leq 0,05$ diferencias vs NS, # tendencia ($p=0,07$) vs NS.

Ningún otro efecto fue encontrado en el resto de las subdivisiones estudiadas: DLS (**figura 27**), NAcC (**figura 28**) y NAcCSh (**figura 29**).

Estriado dorsal-lateral

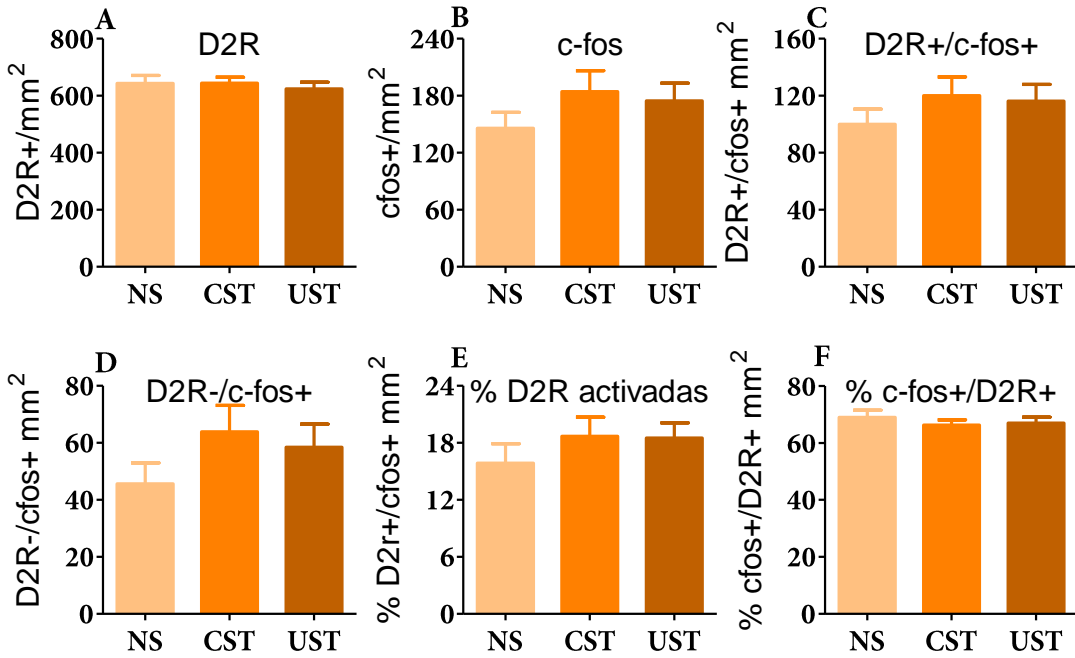


Figura 27. Activación del sistema dopaminérgico en el DLS tras la FST en sujetos que han sido expuestos a estrés adolescente.

La figura A indica el número de neuronas D2R+/mm², la B el de D2R+/c-fos+, la C el de D2R+/c-fos-, la D la de c-fos+, la E el porcentaje de neuronas D2R+ que expresa c-fos y la F el porcentaje de neuronas c-fos+ que expresan D2R. Grupos: VEH (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados

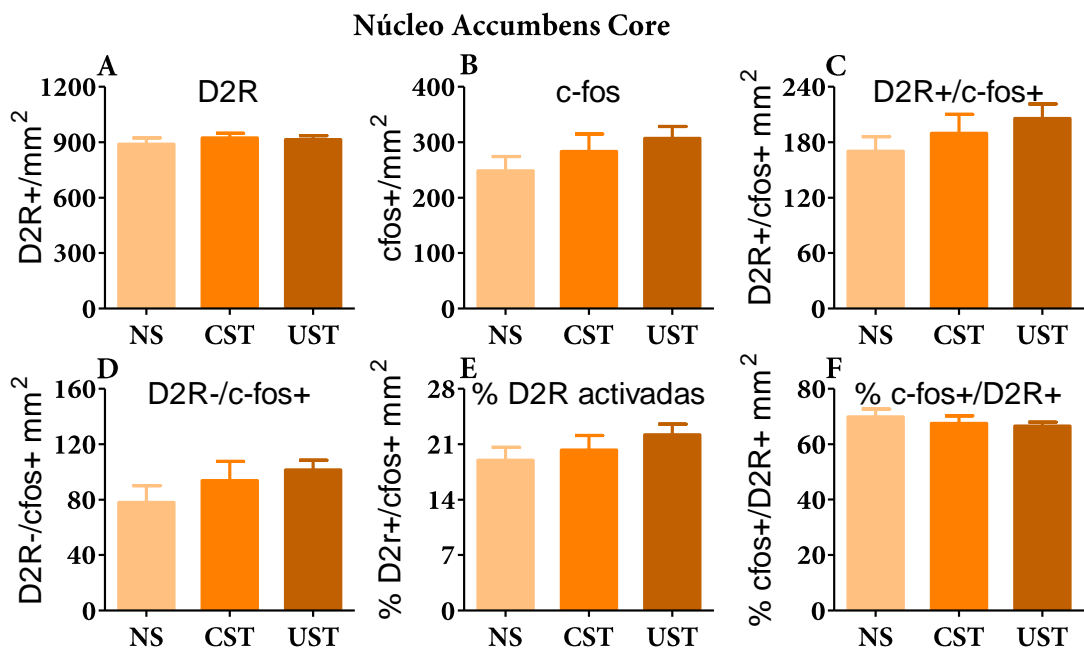


Figura 28. Activación del sistema dopaminérgico en el NAcC tras la FST en sujetos que han sido expuestos a estrés adolescente.

La figura A indica el número de neuronas D2R+/mm², la B el de D2R+/c-fos+, la C el de D2R+/c-fos-, la D la de c-fos+, la E el porcentaje de neuronas D2R+ que expresa c-fos y la F el porcentaje de neuronas c-fos+ que expresan D2R. Grupos: VEH (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM.

Núcleo Accumbens Shell

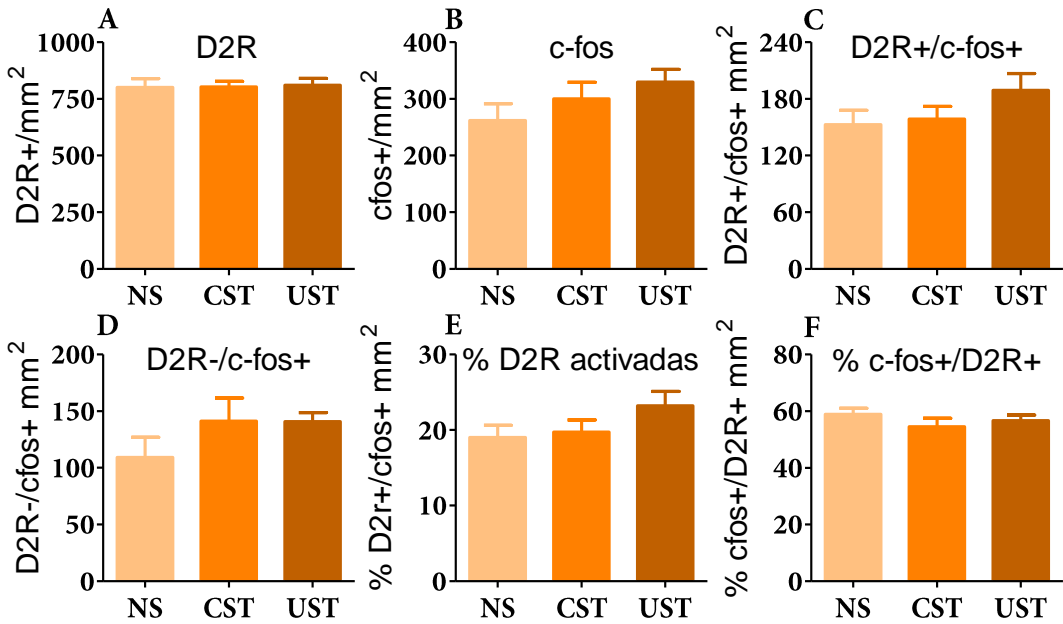


Figura 29. Activación del sistema dopaminérgico en el NAcSh tras la FST en sujetos que han sido expuestos a estrés adolescente.

La figura A indica el número de neuronas D2R+/mm², la B el de D2R+/c-fos+, la C el de D2R+/c-fos-, la D la de c-fos+, la E el porcentaje de neuronas D2R+ que expresa c-fos y la F el porcentaje de neuronas c-fos+ que expresan D2R. Grupos: VEH (n=9), CST (n=10) y UST (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM.

4. Conclusiones

Atendiendo a la curva de aprendizaje, al tiempo de choque y a la latencia de respuesta, podemos afirmar que los animales del grupo CST fueron capaces de adquirir la tarea. El número de cruzamientos durante la habituación fue inferior en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre ambos, indicando un condicionamiento del miedo al contexto no mediado por la controlabilidad. Se observó un descenso en la actividad durante el ITI en el grupo UST y un incremento en las CST, difiriendo ambos grupos en el número de cruzamientos durante el ITI en la primera y en la última sesiones.

A nivel hormonal observamos una sensibilización de la respuesta del eje HPA en respuesta a estímulos heterotípicos de baja y alta intensidad provocada por la exposición a estrés incontrolable, pero no al controlable. A nivel conductual observamos un incremento en la conducta de afrontamiento activo a corto plazo y un descenso inicial en la conducta exploratoria a corto plazo, ambos

efectos mediados por la exposición a estrés adolescente, pero no por la controlabilidad.

A nivel central, la exposición a estrés durante la adolescencia incrementó la acumulación de Δ FosB en el LSV, efecto que ya no se observó a los 30 días. La actividad constitutiva se vio reducida en todas las subdivisiones de la mPFC y del estriado, a excepción del DMS, por la exposición a estrés adolescente aunque fue más marcada en el grupo CST en la Cg1 y en las diferentes subdivisiones del estriado. Este efecto se desvaneció a los 30 días.

El patrón de expresión de *Arc* tras la exposición a un estímulo estresante heterotípico, cambió en los sujetos de los grupos CST y UST respecto al NS en la Cg1 y en las cuatro subdivisiones estudiadas del estriado. A pesar de los cambios en la expresión de *Arc*, no se observa ningún cambio en la de *c-fos* en ninguna de las subdivisiones estudiadas. Aunque no había cambios en los niveles totales de *c-fos*, sí se encontraron diferencias cuando identificamos el fenotipo neuronal en el estriado. Concretamente, observamos un incremento en el número de neuronas activadas que no expresan D2 (y potencialmente expresan D1) respecto al NS en el grupo CST en el DMS y el VMS, y en el grupo UST en el VMS.

Experimento 2: Consecuencias endocrinas, conductuales y sobre el sistema dopaminérgico de la exposición a estrés controlable/ incontrolable durante la adolescencia

1. Planteamientos y objetivos

Los objetivos del presente capítulo son: (i) evaluar los parámetros de adquisición de la tarea y su impacto sobre la conducta en dicha tarea (cruzamientos durante la habituación y el ITI), (ii) valorar los cambios endocrinos y conductuales producidos por la exposición a este paradigma y (iii) evaluar cambios en el funcionamiento del sistema dopaminérgico.

2. Diseño experimental

En este experimento se utilizaron 90 animales distribuidos equitativamente entre los tres grupos experimentales del experimento anterior (NS, CST y UST) siguiendo el mismo procedimiento. Cada grupo se dividió a su vez en tres subgrupos equiparables en función de la administración de fármacos antes de la FST: vehículo (VEH; n=10), SCH23390 (Anta-D1, n=10) o Eticlopride (Anta-D2, n=10). Una explicación detallada del procedimiento experimental y la distribución se encuentra en la **tabla 3**.

Los niveles de corticosterona en pelo se evaluaron al día siguiente de acabar la tarea en la caja lanzadera. Tres días después de la última sesión de estrés adolescente 38 sujetos (10 NS, 14 CST y 14 UST) fueron administrados con ACTH para valorar la respuesta de la corteza adrenal a la liberación de ACTH. Se analizó la conducta en una prueba de IS (15 min) 2 días después de finalizar la exposición a estrés. Esta prueba permite analizar conductas relacionadas con la ansiedad social y con el nivel de motivación para la interacción social (lo que podría medir potencialmente anhedonia). Evaluamos el impacto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la respuesta conductual y hormonal a la FST (30 min) 8 días después de la última sesión. Esta prueba nos permite observar qué papel tiene la DA en el estilo de afrontamiento durante esta prueba y los cambios producidos en este sistema por la exposición a estrés adolescente. La administración se realizó 15 min antes de la exposición a 30 min de FST. La conducta en una prueba de hiponeofagia alimentaria (10

min) se estudió 30 días después de acabar la exposición a estrés adolescente, la cual mide conductas similares a la ansiedad y la actividad exploratoria. Para la prueba de hiponeofagia alimentaria los animales fueron privados de comida, pero no de bebida, las 24 h previas a la prueba.

Asimismo, previamente se evaluó el efecto de los antagonistas en animales que no fueron manipulados hasta el día de la prueba (más allá de las manipulaciones rutinarias, el transporte y la habituación al procedimiento experimental) para valorar si las dosis de los fármacos elegidas eran suficientes. Los grupos para esta prueba fueron: VEH (n=10), Anta-D1 (n=10) y Anta-D2 (n=10). Los sujetos fueron administrados 15 min antes de la exposición a 30 min de FST y se tomó una TM nada más acabar y 30 min después.

Tabla 3. Grupos experimentales y diseño: Experimento 2

Grupo	PND 27-48 (±1)	PND 49 (±1)	PND 50 (±1)	PND 51 (±1)	PND 56 (±1)		PND 78
NS (29)	Exposición a caja lanzadera	Pelo	IS	Administración ACTH	VEH (9)	FST + TM	Prueba hiponeofagia
					Anta- D1 (10)	FST + TM	
					Anta- D2 (10)	FST + TM	
CST (26)	Estrés controlable	Pelo	IS	Administración ACTH	VEH (9)	FST + TM	Prueba hiponeofagia
					Anta- D1 (9)	FST + TM	
					Anta- D2 (9)	FST + TM	

UST (30)	Estrés incontrolable	Pelo	IS	Administración ACTH	VEH (10)	FST + TM	Prueba hiponeofagia
					Anta- D1 (10)	FST + TM	
					Anta- D2 (10)	FST + TM	
Grupo		PND 62 (± 1)					
VEH (10)		VEH + FST + TM					
Anta-D1 (10)		Anta-D1 + FST + TM					
Anta-D2 (9)		Anta-D2 + FST + TM					

Los sujetos fueron expuestos a la caja lanzadera del PND 27 al 48. La extracción de pelo se realizó el PND 49 y el PND 51, a 38 animales, se les hizo una administración de ACTH sintética y se cogió una TM. Las ratas fueron expuestas en el PND 50 a 15 min de IS, en el 56 fueron administrados con la sustancia respectiva 15 min antes de la exposición a 30 min de FST y en el 78 se expusieron a 10 min de hiponeofagia alimentaria.

*30 animales se utilizaron para valorar el efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en ratas sin historia de estrés. El número entre paréntesis indica la **n** final. PND: día postnatal, FST: prueba de natación forzada, NS: sin estrés, CST: estrés controlable, UST: estrés incontrolable, TM: toma de muestra (sangre), VEH: vehículo, Anta-: antagonista.*

3. Resultados

3.1. Caja lanzadera y TWAA: Segunda cohorte

Cuatro animales del grupo CST no llegaron a aprender la tarea por lo que fueron eliminados de los análisis posteriores, y un sujeto del grupo NS murió tras la primera sesión (sufrió una parada cardíaca durante el proceso de rasuración). La **n** final fue: NS = 29, CST = 26, UST = 30.

La **figura 30** representa el número promedio de evitaciones, escapes y nulas durante las 8 sesiones de TWAA del grupo CST. Se realizó un análisis de medidas repetidas (GEE) para cada parámetro. Los datos del GEE muestran un efecto significativo del factor SESIÓN en el número de evitaciones ($X^2(7) = 43,3$; $p=0,00$), escapes ($X^2(7) = 42,4$; $p=0,00$) y respuestas nulas ($X^2(7) = 26,7$; $p=0,00$). La comparación posterior mostró un incremento significativo en el

número de evitaciones a lo largo de las sesiones, un descenso significativo en el número de respuestas de escapes y leves fluctuaciones en el número promedio de respuestas nulas, que aun así se mantuvieron a bajo nivel. El número de evitaciones se incrementó en el resto de sesiones respecto a la sesión 1, y en las 4 últimas sesiones respecto a las sesiones 2, 3 y 4. En paralelo se observó un descenso en el número de escapes respecto a la sesión 1, y en las sesiones de la 4 a la 8 respecto a la 2 y la 3. De la sesión 4 a la 8 (en la que hubo un promedio de 29 escapes) el número de escapes se mantuvo estable, salvo por un descenso la sesión 7 en la que el número de escapes fue inferior respecto al resto de sesiones. El número de respuestas nulas fluctuó ligeramente a lo largo de las sesiones. A pesar de que hubo un descenso estadísticamente significativo en las primeras sesiones respecto a la sesión 1, hubo un pico en la 4, seguido de un nuevo descenso estadísticamente significativo en la 5 y 6 y un nuevo pico en la 7 seguido de un descenso.

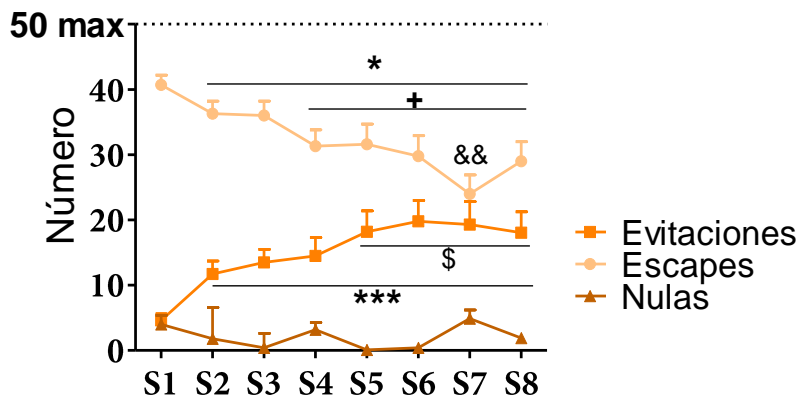


Figura 30. Curva de adquisición de la TWAA durante la adolescencia: Experimento 2.

Se grafican el número de evitaciones, escapes y respuestas nulas de los sujetos CST ($n=26$) por cada sesión. Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican *** $p \leq 0,001$ vs la S1 en el número de evitaciones; * $p \leq 0,01$ vs la S1 en el número de escapes; \$ $p \leq 0,05$ en el número de evitaciones vs las sesiones 2, 3 y 4; + $p \leq 0,05$ en el número de escapes vs las sesiones 2 y 3; && $p \leq 0,01$ en el número de escapes vs el resto de sesiones. El número de respuestas nulas también varió. Las sesiones 3 ($p < 0,05$), 5 y 6 ($p < 0,01$) tuvieron un número de respuestas nulas inferior a las S1 y 2. La S4 tuvo valores estadísticamente superiores ($p < 0,01$) a las S5 y 6. La S5 y la S6 tuvieron valores inferiores que la S7 ($p < 0,001$) y que la S8 ($p < 0,05$), que a su vez su media fue inferior a la de la S7 ($p < 0,01$). Estas diferencias no fueron incluidas en la representación gráfica para no enturbiar la legibilidad.

La cantidad de choque eléctrico en las patas (**figura 31.A.**) se analizó con un GEE de un factor (SESIÓN) el cual tuvo un efecto estadísticamente significativo ($X^2(7) = 77,4$; $p < 0,001$). El contraste por pares con correcciones

secuenciales de Bonferroni indicó que el tiempo de choque varió significativamente a lo largo de las sesiones en paralelo a las fluctuaciones observadas en el número de respuestas nulas. Algo similar a lo ocurrido en la latencia de respuesta (**figura 31.B.**). Este parámetro se analizó utilizando un GEE de un factor (SESIÓN). Se observó un efecto significativo del factor sesión ($X^2(7) = 209$; $p=0,00$). El análisis por parejas con correcciones secuenciales de Bonferroni mostró un patrón fluctuante similar al observado en el número de respuestas nulas y en el tiempo de choque.

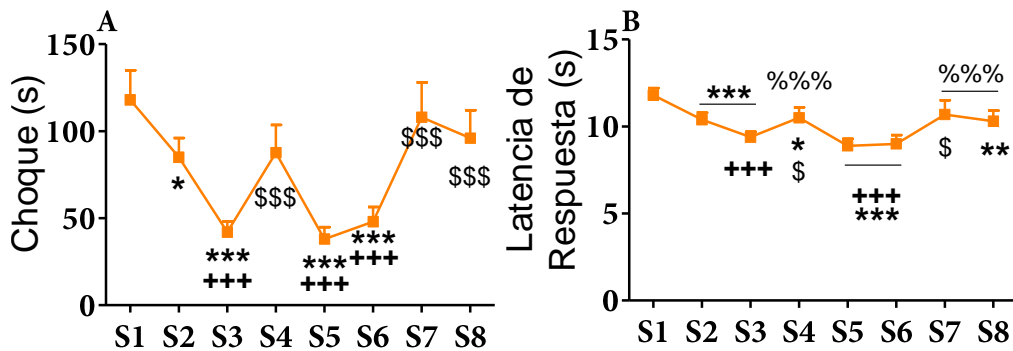


Figura 31. Tiempo de choque (A) y latencia de respuesta (B) del Experimento 2.

Para cada sesión, la figura A marca el tiempo de choque y la B la latencia de respuesta en el grupo CST ($n=26$). Los puntos representan la media y el SEM. En la gráfica A los símbolos indican * diferencias vs la S1, + vs la S2 y \$ vs las sesiones 3, 5 y 6. En la gráfica B * diferencias vs la S1, + vs la S2, \$ vs la S3 y % vs las sesiones 5 y 6. El número de símbolos indica el valor de p : uno: $\leq 0,05$; dos: $\leq 0,01$; tres: $\leq 0,001$.

El número de cruzamientos de la habituación se cuantificó en todos los grupos, pero, igual que en el experimento anterior, el número de cruzamientos durante el ITI solo se evaluó en los animales del grupo CST ($n=26$) y la mitad de los UST ($n=15$) por razones técnicas.

El número de cruzamientos durante la habituación (**figura 32**) se analizó mediante un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). Los factores SESIÓN ($X^2(7) = 612$; $p < 0,001$) y GRUPO ($X^2(2) = 115$; $p < 0,001$) tuvieron ambos efectos estadísticamente significativos, así como la interacción de ambos factores ($X^2(14) = 140$; $p < 0,001$). La descomposición de la interacción indicó un descenso en el número de cruzamientos durante la fase de habituación en todos los grupos, mucho más marcada en los grupos CST y UST, respecto a la sesión 1 y respecto al grupo NS en las sesiones que van de la 2 a la 8, sin diferencias entre los grupos CST y UST hasta la sesión 6 ($p=0,08$) y la 8 en la

que los CST hacen más cruzamientos que los UST. Como era de esperar, los grupos no difieren en la sesión 1.

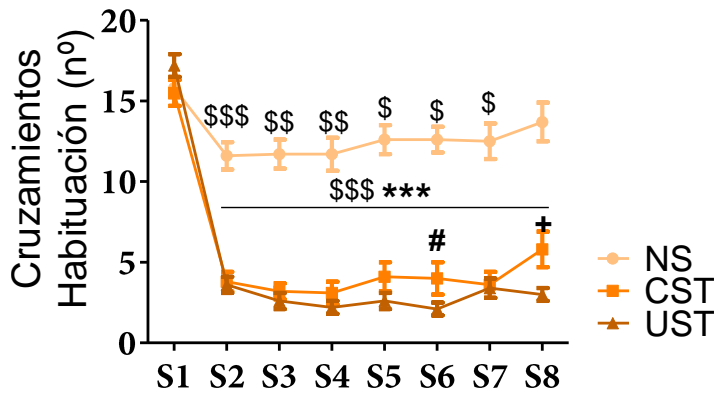


Figura 32. Número de cruzamientos durante la fase de habituación: Experimento 2.

Número de cruzamientos durante la fase de habituación para cada sesión en los grupos NS ($n=29$), CST ($n=26$) y UST ($n=30$). Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: \$ diferencias vs la sesión 1, * vs NS en la misma sesión, + vs el CST en la misma sesión y # diferencias marginales ($p=0.08$) vs el CST en la sesión 6. El número de símbolos indica el valor de p : uno $\leq 0,05$; dos $\leq 0,01$; tres $\leq 0,001$.

El número de cruzamientos durante el ITI (**figura 33**) se analizó con un GEE de dos factores (SESIÓN x GRUPO). El factor GRUPO no tuvo efectos estadísticamente significativos, pero sí los hubo en el factor SESIÓN ($X^2(7) = 14,1$; $p=0,04$) y la interacción de ambos factores ($X^2(7) = 41,7$; $p < 0,001$). La descomposición de la interacción mostró que el patrón resultante difirió entre grupos. Mientras que en el grupo CST no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en el UST se observa un descenso respecto a la primera sesión en las 5 últimas sesiones, respecto a la sesión 2 en las sesiones 4 y 7, y respecto a la sesión 3 en las sesiones 4, 5, 6 y 7. Pero más allá de la progresión temporal de ambos grupos, en la sesión 1 el número de cruzamientos fue superior en el grupo UST respecto al CST, mientras que en la sesión 6 ($p=0,06$) y 7 el número de cruzamientos fue superior en el CST respecto al UST. Asimismo, el número de cruzamientos durante el ITI en el grupo CST correlaciona positivamente con el número de evitaciones a partir de la segunda sesión (**Tabla 4**).

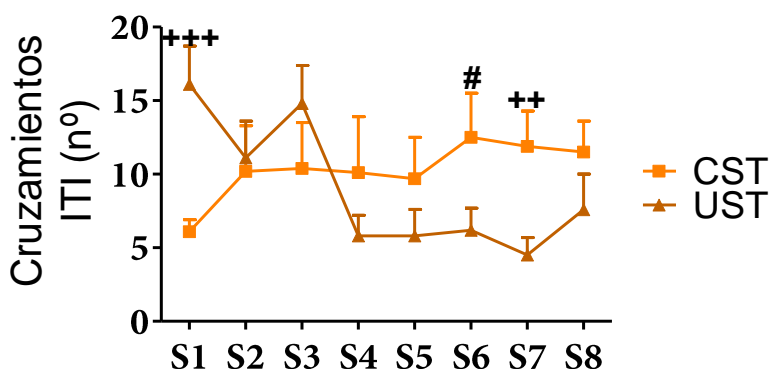


Figura 33. Número de cruzamientos durante el ITI: Experimento 2.

Se grafican el número de cruzamientos por cada sesión en los grupos CST ($n=26$) y UST ($n=15$). Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos marcan: + diferencias entre los grupos CST y UST en la misma sesión; # diferencias marginales ($p=0,06$) entre los grupos CST y UST en la sesión 6. El número de símbolos indica el valor de p : dos $\leq 0,01$; tres $\leq 0,001$. El número de cruzamientos en el grupo UST en las sesiones de la 4 a la 7 respecto a la sesión 1 ($p<0,001$) y la 8 respecto a la 1 ($p=0,09$), en la sesión 4 y 7 respecto a la 2 ($p<0,05$) y en la 4 ($p<0,001$), 5 ($p<0,05$), 6 ($p<0,01$) y la 7 ($p<0,01$) respecto a la S3.

Tabla 4. Correlaciones

Sesión	r
S1	0,01
S2	0,77***
S3	0,47*
S4	0,50**
S5	0,74***
S6	0,67***
S7	0,54**
S8	0,68***

Experimento 2. La tabla muestra la correlación entre el número de evitaciones y el número de cruzamientos durante el ITI en cada sesión (en el grupo CST). *= $p<0,05$; ***= $p<0,001$.

3.2. Consecuencias endocrinas de la exposición a estrés adolescente

Los niveles de corticosterona (figura 34) en pelo se midieron un día después de finalizar la exposición a estrés adolescente en la segunda cohorte y el análisis

estadístico se realizó utilizando un GzLM de un factor (GRUPO) que fue estadísticamente significativo ($X^2(2) = 17,4; p < 0,001$). Los contrastes por parejas con correcciones secuenciales de Bonferroni revelaron un incremento significativo en los niveles de corticosterona en pelo en el grupo CST y UST respecto al grupo NS, sin diferencias entre ambos grupos.

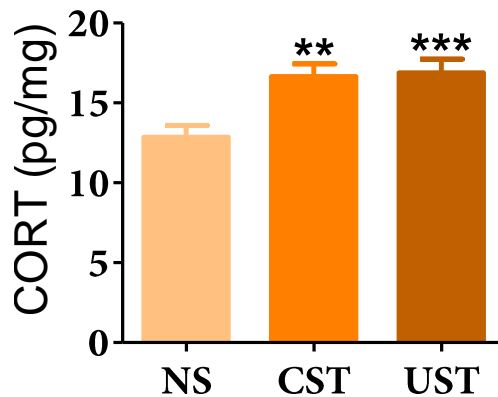


Figura 34. Corticosterona (pg/mg) acumulada en pelo.

Corticosterona acumulada en pelo del PND 27 al 49. Grupos: NS ($n=29$), CST ($n=26$) y UST ($n=30$). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias vs NS. ** $p \leq 0,01$ y *** $\leq 0,001$.

Para evaluar si la sensibilidad de la glándula adrenal a la liberación de ACTH cambiaba por la exposición a estímulos estresantes durante la adolescencia administramos ACTH sintética en una dosis (0,01 mg/kg) que provoca la liberación máxima de corticosterona por parte de esta glándula, pero no se observaron diferencias entre los grupos (**figura 35**).

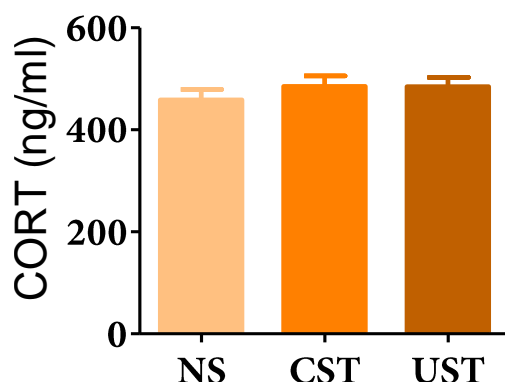


Figura 35. Respuesta de la glándula adrenal a la administración de ACTH sintético.

La figura muestra los niveles de corticosterona después de la administración de ACTH sintética (0,01 mg/kg) evaluados 3 días después de finalizar la exposición a caja lanzadera. Grupos: NS (n=10), CST

3.3. Efectos sobre la conducta de interacción social a corto plazo

En la prueba de IS, realizada 2 días después de la última sesión de estrés adolescente, evaluamos tres tipos de conducta: activa (**figura 36.A.**), seguimiento (**figura 36.B.**) y pasiva (**figura 36.C.**). Para la medición de las conductas dividimos la prueba en tres bloques de tiempo (0-5 min, 5-10 min y 5-15 min). Para el análisis estadístico utilizamos un GEE de dos factores (GRUPO y BLOQUE). En la conducta de interacción social activa ninguno de los dos factores tuvo efectos estadísticamente significativos, pero sí los hubo en la interacción entre ambos ($X^2(4) = 12,5; p = 0,01$). La descomposición de la interacción indicó que los sujetos del grupo UST realizaron menos tiempo de interacción social activa que los del grupo NS y CST ($p = 0,06$) pero solo en los primeros 5 min, después se equiparan. En la conducta activa de seguimiento no se observaron efectos estadísticamente significativos para el factor GRUPO, pero sí para el factor BLOQUE ($X^2(2) = 32,4; p < 0,001$), sin que la interacción presente ningún efecto estadístico. La comparación posterior indicó un descenso en la conducta de seguimiento en los dos últimos bloques temporales respecto al primero. En la interacción social pasiva, el factor GRUPO no tuvo efectos estadísticamente significativos, pero sí se observaron en el factor BLOQUE ($X^2(2) = 12,6; p = 0,02$) y en la interacción entre ambos factores ($X^2(4) = 9,7; p = 0,04$). La descomposición de la interacción indicó un incremento en el tiempo de interacción social pasiva en los dos últimos bloques temporales

respecto a los 5 min iniciales, sin diferir entre ellos, en el grupo NS. La comparación por parejas con correcciones secuenciales de Bonferroni del factor BLOQUE reveló un descenso en la conducta de seguimiento respecto a los primeros 5 min en los otros dos bloques temporales, sin diferencias entre estos.

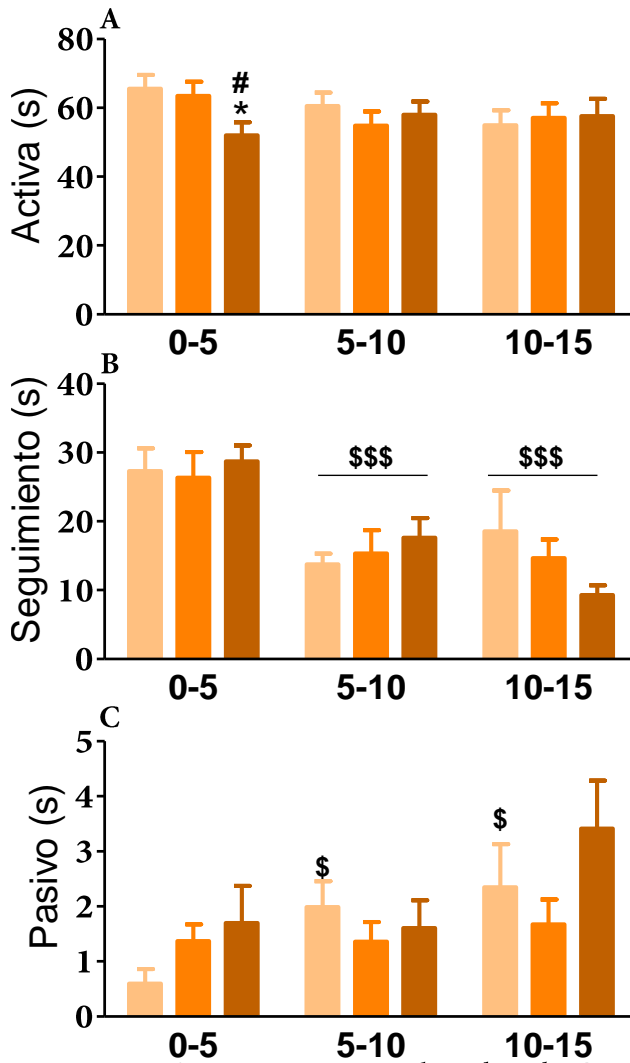


Figura 36. Respuesta conductual prueba IS.

Conducta durante la prueba de IS realizada 2 días después de finalizar la exposición a estrés adolescente. La figura A indica el tiempo (s) de interacción social activa, la B de conducta seguimiento y la C de interacción social pasiva en los tres periodos estudiados en los 15 min de prueba (5 min iniciales, intermedios y finales). Grupos: NS (n=28), CST (n=26) y UST (n=30). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias * $p \leq 0,05$ vs NS en su mismo intervalo, # diferencias marginales ($p=0,06$) vs CST en su mismo intervalo, \$ $p \leq 0,05$ diferencias vs los primeros 5 min del mismo grupo y \$\$\$ $p \leq 0,001$ vs los primeros 5 min.

3.4. Conducta exploratoria en la prueba de hiponeofagia a largo plazo

En la prueba de hiponeofagia analizamos la latencia de aproximación a la placa que contenía los pellets (**figura 37.A.**), el número de entradas a la placa (**figura 37.B.**), el tiempo en el centro (**figura 37.C.**), así como la distancia recorrida en el centro (**figura 37.D.**), la periferia (**figura 37.E.**) y en total (**figura 37.F.**). La latencia de aproximación y el número de entradas a las placas se analizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO) que no fue significativo para ninguna de las dos medidas. El resto de variables se analizaron mediante un GEE de dos factores (BLOQUE y GRUPO). El factor GRUPO no fue estadísticamente significativo para el tiempo transcurrido en el centro, pero sí lo fue el factor BLOQUE ($X^2(1) = 35$; $p < 0,001$) y la interacción BLOQUE*GRUPO tendió a la significación ($X^2(2) = 5,1$; $p = 0,08$). La descomposición de la interacción de la interacción reveló un descenso en el tiempo de permanencia en el centro en los grupos NS y CST en los últimos 5 min respecto a los 5 iniciales, sin diferencias entre grupos. Para la distancia recorrida en el centro, el factor GRUPO tendía a la significación estadística ($X^2(2) = 5,4$; $p = 0,06$), mientras que el factor BLOQUE ($X^2(1) = 62,8$; $p < 0,001$) y la interacción GRUPO*BLOQUE ($X^2(2) = 13$; $p = 0,001$) tuvieron efectos estadísticamente significativos. La descomposición de la interacción indicó que la distancia recorrida en el centro durante los 5 min iniciales fue menor en el grupo CST y marginalmente en el UST ($p = 0,08$) respecto al NS, sin diferencias entre los primeros. En los 5 últimos min los 3 grupos se equipararon y recorrieron menos distancia en el centro que en los 5 primeros. Para la distancia recorrida en la periferia no se observó un efecto estadísticamente significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 4,5$; $p = 0,1$), pero sí del factor BLOQUE ($X^2(1) = 111$; $p < 0,001$) y una tendencia a la significación en la interacción entre ambos ($X^2(2) = 5,5$; $p = 0,06$). La descomposición de la interacción indicó que la distancia recorrida en la periferia fue inferior en el grupo UST que en el NS, sin diferencias con el CST, en los 5 min iniciales. Los 3 grupos se equipararon en los 5 últimos minutos y recorren menos distancia que en los 5 min iniciales. Para la distancia recorrida en el total del campo, el factor GRUPO tuvo efectos estadísticos marginales ($X^2(2) = 4,6$; $p = 0,09$), así como un efecto estadísticamente significativo en el factor BLOQUE ($X^2(1) = 119$; $p < 0,001$) y en la interacción entre ambos ($X^2(2) = 7,1$; $p = 0,02$). La

descomposición de la interacción en la distancia total mostró que los animales del grupo UST y marginalmente ($p=0,059$) los del CST, recorrían menos distancia que los del grupo NS durante los 5 min iniciales, sin diferencias entre los primeros. En los últimos 5 min los 3 grupos recorrieron menos distancia y se equipararon entre ellos.

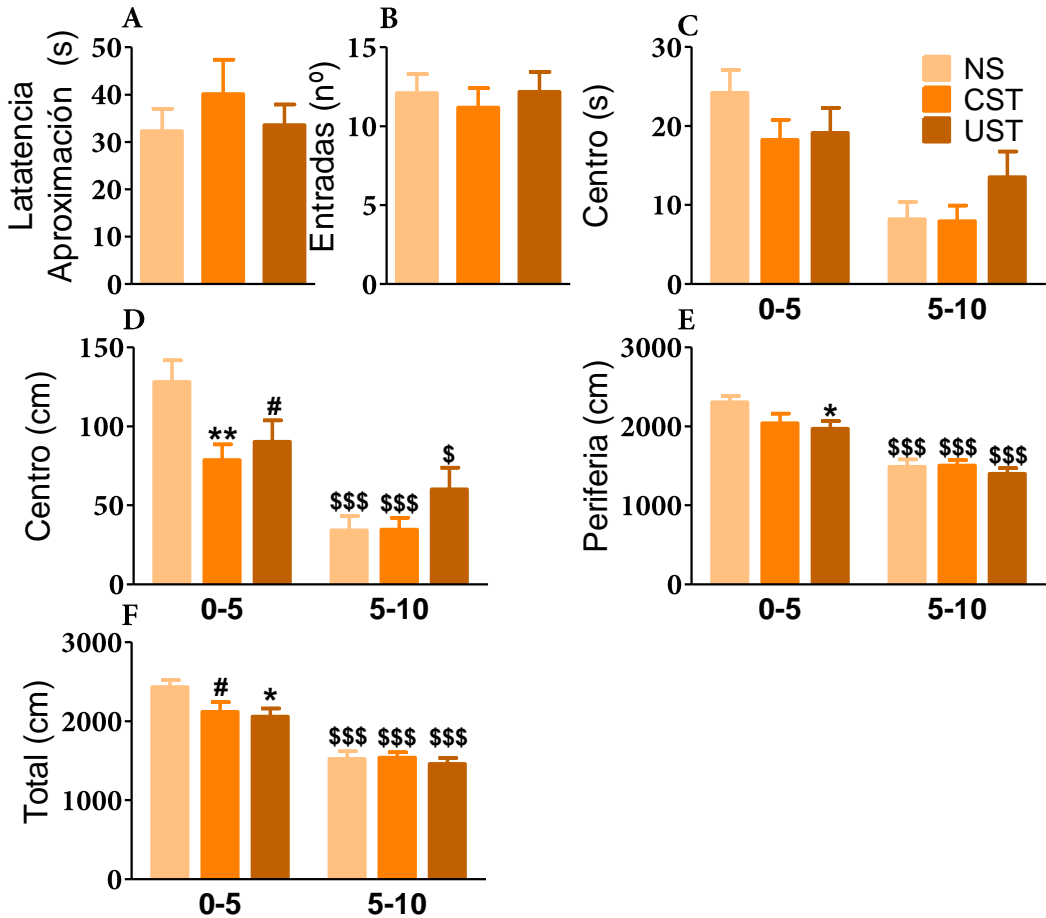


Figura 37. Respuesta conductual a la prueba de hiponeofagia alimentaria.

La prueba de hiponeofagia alimentaria fue realizada 30 días después de la última sesión en caja lanzadera. La figura A la latencia de aproximación a la placa con los pellets y la B el número de entradas. La figura C muestra el tiempo (s) de permanencia en el centro, la D la distancia (cm) recorrida en el centro, la E en la periferia y la F en total (centro + periferia) en los dos tiempos estudiados durante los 10 min de prueba (5 min iniciales y finales). Grupos: NS ($n=29$), CST ($n=26$) y UST ($n=30$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican diferencias \$ vs los primeros 5 min de su mismo grupo; * diferencias vs NS en el mismo intervalo; # (figura D) marginales ($p=0,08$) vs NS, # (figura B) marginales ($p=0,059$) vs NS. El número de símbolos indica el valor de p : uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.

3.5. Efectos de la administración de antagonistas dopaminérgicos sobre la respuesta a FST

Efectos en animales sin historia previa de estrés

Para evaluar si las dosis elegidas (0,025 mg/kg para ambos antagonistas) eran suficientes para afectar a la respuesta conductual hicimos una administración en animales que no habían sido manipulados (a excepción de las sesiones de habituación) hasta el día experimental (PND 62). Un animal del grupo Anta-D2 (Eticlopride) hubo que sacarlo antes de acabar los 30 min de FST dado que fue incapaz de adoptar la conducta de inmovilidad y por tanto de flotabilidad, y fue eliminado del análisis posterior. La conducta en la FST se analizó mediante un GEE de dos factores (BLOQUE y FÁRMACO). Se analizaron tres conductas: escape (**figura 38.A.**), nado suave (**figura 38.B.**) e inmovilidad (**figura 38.C.**). En el tiempo de escape el factor GRUPO ($X^2(2) = 13,3$; $p = 0,001$), BLOQUE ($X^2(2) = 137$; $p < 0,001$) y la interacción entre ambos ($X^2(4) = 22$; $p < 0,001$) se observaron efectos estadísticamente significativos. La descomposición de la interacción indicó que la conducta de escape fue inferior en los 5 min iniciales en el grupo Anta-D2 que en el VEH, sin diferir con el Anta-D1. En los últimos 5 min el tiempo de escape fue superior en el grupo Anta-D1 que en el Anta-D2, sin que hubiese diferencias con el grupo VEH en ninguno de los dos. Además, se observó un descenso en la conducta de escape en los dos últimos bloques de tiempo en los tres grupos respecto a ellos mismos en los primeros 5 min. En el grupo Anta-D1 se incrementó la conducta de escape en los últimos 5 min, respecto a los 5 min intermedios, sin que lo mismo ocurriese en los otros grupos. En el tiempo realizando nado suave se observaron efectos estadísticamente significativos en el factor GRUPO ($X^2(2) = 13$; $p = 0,001$) y BLOQUE ($X^2(2) = 63,8$; $p < 0,001$), pero no para la interacción entre ambos. Las comparaciones posteriores del factor GRUPO mostraron un descenso en el tiempo de nado suave en los grupos Anta-D1 y Anta-D2 respecto al VEH, sin diferencias entre ambos. En el factor BLOQUE indicaron un descenso general en los últimos bloques temporales respecto al primero, sin diferencias entre ellos. En el tiempo que realizaron inmovilidad, tanto en el factor GRUPO ($X^2(2) = 22,2$; $p < 0,001$), como en el factor BLOQUE ($X^2(2) = 185$; $p < 0,001$), así como en la interacción GRUPO*BLOQUE ($X^2(4) = 12,4$; $p = 0,01$) se hallaron efectos estadísticamente significativos. La descomposición de la interacción reveló un incremento en el tiempo que realizaban inmovilidad en los grupos Anta-D1 y Anta-D2 respecto al VEH, durante los 5

min iniciales, los 5 min intermedios y en el último bloque, solo en el grupo Anta-D2 respecto al VEH, pero no en el Anta-D1. El grupo Anta-D2 realizó más conducta de inmovilidad en el primer (marginal; $p=0,056$) y último bloque, pero no en el bloque intermedio, que el grupo Anta-D1. Todos los grupos incrementaron el tiempo que realizaban conducta de inmovilidad durante los dos últimos bloques de tiempo respecto a su desempeño en el primero. El grupo Anta-D1 redujo el tiempo de inmovilidad en el último bloque, respecto al bloque intermedio, sin diferencias en el resto de los grupos.

Asimismo, evaluamos los efectos de la administración de fármacos sobre la respuesta hormonal. Medimos los niveles de ACTH (**figura 39.A.**) y corticosterona (**figura 39.B.**) al acabar la exposición (R0) y 30 min después (R30) para observar la respuesta al estímulo y la fase de recuperación. El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (DINÁMICA y FÁRMACO). Para la ACTH el factor DINÁMICA fue estadísticamente significativo ($X^2(1) = 370,1$; $p=0,00$), pero no lo fueron el factor FÁRMACO, ni la interacción entre ambos. Estos resultados indican un descenso en los niveles de ACTH a los 30 min de finalizar la prueba comparados con los niveles al finalizar. El análisis de los niveles de corticosterona no reveló efectos estadísticamente significativos del factor FÁRMACO, pero sí del factor DINÁMICA ($X^2(1) = 47$; $p < 0,001$) y de la interacción entre ambos factores ($X^2(2) = 6,09$; $p = 0,04$). La descomposición de la interacción indicó que en todos los grupos se produjo un descenso en los niveles de corticosterona a los 30 min respecto a los niveles al finalizar la exposición.

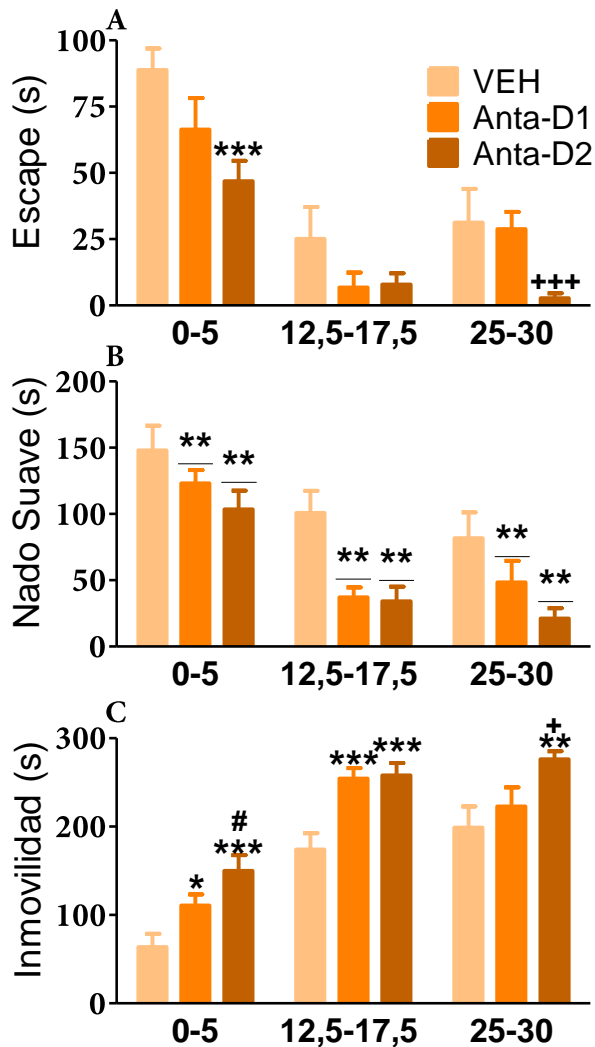


Figura 38. Efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la conducta en la FST.

Prueba realizada en animales que no fueron manipulados hasta el día experimental (PND 62). La figura **A** muestra el tiempo (s) de escape, la **B** de nado suave y la **C** de inmovilidad, en los tres intervalos estudiados durante los 30 min de FST (5 min iniciales, intermedios y finales). Grupos: VEH (n=10), Anta-D1 (n=10) y Anta-D2 (n=9). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. En las figuras **A** y **C** los símbolos indican: * diferencias vs VEH de su intervalo, + vs Anta-D1 de su intervalo, # diferencias marginales ($p=0,056$) vs Anta-D1 de su intervalo. En la figura **B** los símbolos representan: * diferencias vs VEH. El número de símbolos en las tres figuras indica el valor de p : uno $p \leq 0,05$, dos $p \leq 0,01$, tres $p \leq 0,001$. Además de las diferencias entre grupos mostradas por los símbolos, la conducta de escape (figura **A**) descendió en los dos últimos bloques en los tres grupos respecto al primero ($p < 0,001$), pero subió en los últimos 5 min respecto al tiempo de escape en los 5 min intermedios en el grupo Anta-D1 ($p < 0,001$). El tiempo de nado suave (figura **B**) global descendió en los dos últimos bloques respecto al primero ($p < 0,001$), sin diferencias entre ellos. El tiempo de inmovilidad (figura **C**) se incrementó en los dos últimos bloques temporales respecto al primero ($p < 0,001$), sin diferencias entre ellos, salvo en el grupo Anta-D1 que en el último bloque hubo un descenso respecto al segundo ($p < 0,05$).

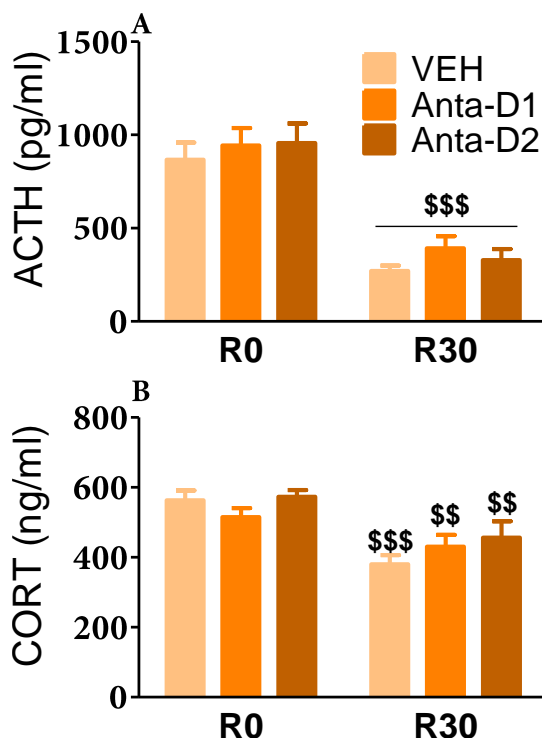


Figura 39. Efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la respuesta del eje HPA a FST.

La figura **A** indica los niveles de ACTH (pg/ml) y la **B** los de corticosterona (ng/ml) nada más acabar (R0) y 30 min después (R30). Grupos: NS (n=10), CST (n=10) y UST (n=9). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican \$ diferencias vs R0 en la figura A y vs su homónimo del R0 en la figura B. El número de símbolos indica el valor de p: dos $p \leq 0,01$, tres $p \leq 0,001$.

Efectos en animales con historia de estrés adolescente

Las mismas dosis de fármacos fueron utilizadas en animales con historia de estrés adolescente antes de la exposición a FST, realizada 8 días después de la exposición durante la adolescencia. El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de tres factores (BLOQUE, FÁRMACO y GRUPO).

El análisis del tiempo de escape (**figura 40.A.**), no reveló efectos estadísticamente significativos del factor GRUPO, ni del FÁRMACO, pero sí del factor BLOQUE ($X^2(2) = 273$; $p < 0,001$). La interacción BLOQUE*GRUPO

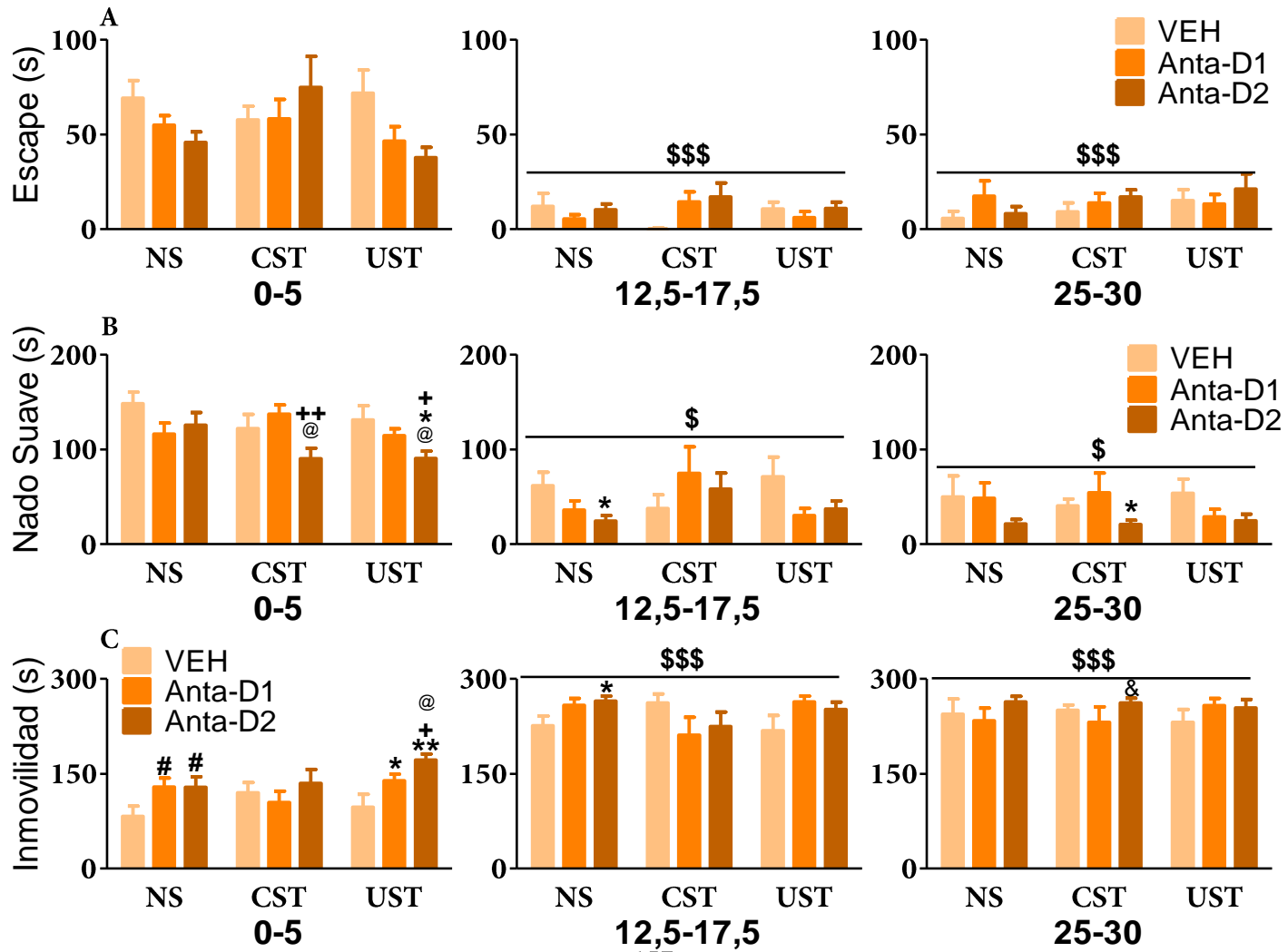
no resultó significativa, pero se observó una tendencia de la interacción FÁRMACO*GRUPO ($X^2(4) = 8,9$; $p=0,06$) y efecto significativo de la interacción BLOQUE*FÁRMACO ($X^2(4) = 9,4$; $p=0,05$) pero no de la triple interacción. La descomposición de la interacción FÁRMACO*GRUPO no mostró efectos estadísticamente significativos de ninguna comparación por parejas, aunque sí lo hizo la descomposición de la interacción BLOQUE*FÁRMACO que indicó un descenso general de en los dos últimos bloques de tiempo respecto al primero, sin diferencias entre estos, en los animales administrados con las tres sustancias.

La evaluación del tiempo de nado suave (**figura 40.B.**) reveló un efecto estadísticamente significativo del factor BLOQUE ($X^2(2) = 376$; $p < 0,001$) y del factor FÁRMACO ($X^2(2) = 11,8$; $p = 0,003$), pero no del factor GRUPO. No hubo efectos estadísticos de la interacción FÁRMACO*GRUPO, ni de la interacción BLOQUE*FÁRMACO, aunque sí hubo una tendencia de la interacción BLOQUE*GRUPO ($X^2(4) = 8,8$; $p = 0,06$) y un efecto significativo de la triple interacción BLOQUE*FÁRMACO*GRUPO ($X^2(8) = 16,3$; $p = 0,03$). La descomposición de la triple interacción mostró un descenso en el tiempo de nado suave en los animales del grupo Anta-D2/CST y Anta-D2/UST respecto a los del grupo Anta-D2/NS, sin diferencias entre estos. También se observó un descenso en el tiempo de nado suave en el primer bloque de tiempo en los grupos Anta-D2/CST y Anta-D2/UST, respecto a los Anta-D1/CST y Anta-D1/UST respectivamente, sin diferencias en el grupo NS, ni con el VEH/CST en el caso de este grupo, pero sí entre los VEH/UST y los Anta-D2/UST, siendo más bajos los valores en este último. En los 5 min intermedios solo se vio un descenso estadísticamente significativo en el grupo Anta-D2/NS, respecto al VEH/NS, sin ninguna otra diferencia relevante en este bloque, y en el grupo Anta-D2/CST y el VEH/CST del último bloque, sin ningún otro cambio relevante en este. El tiempo de nado suave se redujo en todos los grupos en los dos últimos bloques respecto a su desempeño en el primer bloque, sin diferencias entre el segundo y el último bloque.

El análisis del tiempo de inmovilidad (**figura 40.C.**) mostró un efecto estadísticamente significativo de los factores FÁRMACO ($X^2(2) = 6,4$; $p = 0,04$) y BLOQUE ($X^2(2) = 917$; $p < 0,001$) pero no GRUPO. La interacción BLOQUE*FÁRMACO fue estadísticamente significativa ($X^2(4) = 12,2$; $p = 0,01$) y la interacción BLOQUE*GRUPO tendió a la significación ($X^2(4) = 8,3$; $p = 0,07$), sin efectos de la interacción FÁRMACO*GRUPO. La triple

interacción BLOQUE*FÁRMACO*GRUPO tendió a la significación ($X^2(8) = 15,02$; $p=0,059$). La descomposición de la triple interacción reveló una tendencia ($p=0,07$) a mayor tiempo de inmovilidad en el primer bloque temporal en los grupos Anta-D1/NS y Anta-D2/NS respecto al VEH/NS, sin diferencias entre ellos. En este primer bloque se vio un incremento en el tiempo de inmovilidad en los grupos Anta-D1/UST y Anta-D2/UST respecto al VEH/UST, y en el Anta-D2/UST respecto al Anta/D1/UST y respecto al Anta-D2/NS, sin que haya ningún otro cambio relevante en este bloque temporal. En el segundo bloque se observó un incremento en el tiempo de inmovilidad en el grupo Anta-D2/NS respecto al VEH/NS, sin más diferencias por pares en este bloque temporal. Todos los grupos incrementaron el tiempo de inmovilidad en los dos últimos bloques temporales respecto a su desempeño en el primer bloque, sin diferencias entre ellos, salvo en el grupo Anti-D2/CST que realizó más tiempo de inmovilidad en el último bloque en el que realizó en los 5 min intermedios.

El gran número de comparaciones resultantes de la descomposición global impone un criterio muy restrictivo. Por ello realizamos un análisis complementario de los 5 minutos iniciales (**figura 41**), limitando el número de comparaciones. Incluimos los factores FÁRMACO y GRUPO. En la conducta de escape (**figura 41.A.**) ningún factor fue estadísticamente significativo, pero se observó una tendencia en la interacción entre ambos ($X^2(4) = 9,09$; $p=0,059$). Comparamos los efectos de los antagonistas respecto al VEH en cada grupo de estrés adolescente y observamos un descenso en la conducta de escape en los animales NS administrados con Anta-D2 y en los UST en los administrados con Anta-D1 y Anta-D2. En el análisis del tiempo de nado suave (**figura 41.B.**) no se observó efectos estadísticos del factor GRUPO, pero sí del factor FÁRMACO ($X^2(2) = 12,8$; $p=0,002$) y marginalmente de la interacción entre ambos ($X^2(4) = 8,2$; $p=0,08$). En la descomposición observamos un descenso en los animales administrados con Anta-D2 en los grupos CST y UST. La evaluación del tiempo de inmovilidad reveló un efecto estadístico en el factor FÁRMACO ($X^2(2) = 12,8$; $p=0,002$), pero no en el factor GRUPO ni en la interacción entre ambos. En la comparación por pares se observó un incremento en el tiempo de inmovilidad en los animales administrados con Anta-D2.



◀Figura 40. Efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la conducta en la FST en sujetos con una historia previa de estrés adolescente.

La prueba fue realizada 8 días después de la finalizar la última sesión en la caja lanzadera. Las figuras se han partido en tres siguiendo los bloques temporales para facilitar su lectura. La figura **A** muestra el tiempo (s) de escape, la **B** de nado suave y la **C** de inmovilidad, en los tres intervalos estudiados durante los 30 min de FST (5 min iniciales, intermedios y finales). Grupos: NS/VEH (n=9), CST/VEH (n=10), UST/VEH (n=10), NS/Anta-D1 (n=8), CST/Anta-D1 (n=9), UST/Anta-D1 (n=9), NS/Anta-D2 (n=10), CST Anta-D2 (n=10) y UST Anta-D2 (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. En la figura **A** los símbolos indican: \$ diferencias vs los 0-5 min. En las figuras **B** y **C** los símbolos representan: * diferencias vs el VEH de su intervalo y GRUPO, + vs el Anta-D1 de su intervalo y GRUPO, # una tendencia (p=0,07) vs el VEH de su intervalo y GRUPO, @ diferencias vs el Anta-D2 del NS de su intervalo, \$ diferencias vs su homónimo de 0-5 min, & vs su homónimo de 12,5-17,5 min. El número de símbolos en las tres figuras indica el valor de p: uno p≤ 0,05, dos p≤ 0,01, tres p≤ 0,001.

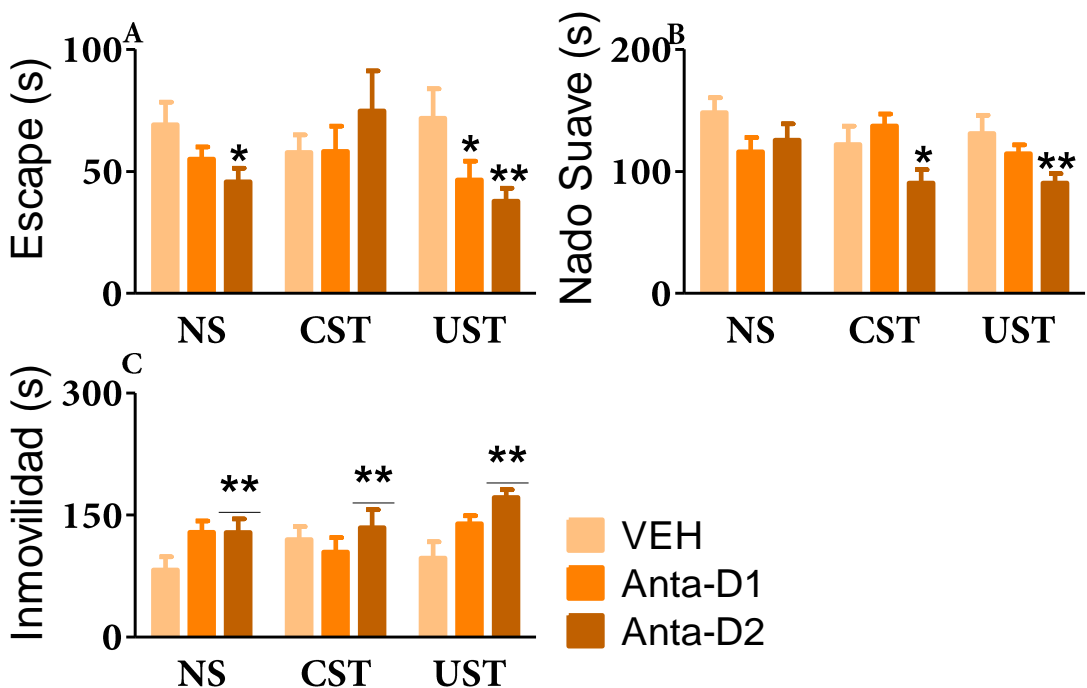


Figura 41. Efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la conducta en la FST en sujetos con una historia previa de estrés adolescente en los primeros 5 min.

La figura **A** indica el tiempo (s) de escape, la **B** de nado suave y la **C** de inmovilidad en los primeros 5 min. Grupos: NS/VEH (n=9), CST/VEH (n=10), UST/VEH (n=10), NS/Anta-D1 (n=8), CST/Anta-D1 (n=9), UST/Anta-D1 (n=9), NS/Anta-D2 (n=10), CST Anta-D2 (n=10) y UST Anta-D2 (n=10). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican * p≤ 0,05 diferencias vs VEH de su mismo grupo, ** p≤ 0,01 vs VEH de su mismo grupo, *** p≤ 0,01 vs VEH

El análisis de la respuesta hormonal se realizó mediante un GEE de tres factores (DINÁMICA, FÁRMACO y GRUPO). El análisis de los niveles de ACTH (**figura 42.A.**) reveló un efecto estadísticamente significativo de los factores DINÁMICA ($X^2(1) = 844$; $p < 0,001$), FÁRMACO ($X^2(2) = 10,3$; $p = 0,006$) y GRUPO ($X^2(2) = 14,8$; $p = 0,001$), así como de la interacción DINÁMICA*GRUPO ($X^2(2) = 10,3$; $p = 0,006$), y una tendencia de la interacción DINÁMICA*FÁRMACO ($X^2(2) = 5,1$; $p = 0,07$), pero sin efectos de la interacción FÁRMACO*GRUPO, ni de la triple interacción. La descomposición de la interacción DINÁMICA*GRUPO mostró un incremento en los niveles de ACTH nada más acabar la prueba en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre ellos, y un incremento en el CST respecto al NS a los 30 min sin diferencias con el UST. Además, se produjo una reducción general a los 30 min en comparación a los niveles que presentaban al acabar la prueba. En los niveles de corticosterona (**figura 42.B.**) el análisis estadístico mostró un efecto significativo del factor DINÁMICA ($X^2(1) = 22$; $p < 0,001$), FÁRMACO ($X^2(2) = 11$; $p = 0,004$) y GRUPO ($X^2(2) = 8$; $p = 0,01$). La interacción BLOQUE*FÁRMACO tuvo a su vez efectos estadísticamente significativos ($X^2(2) = 7,06$; $p = 0,02$), pero ningún otro efecto se observó en las interacciones dobles, salvo en la triple interacción, que tuvo efectos marginales ($X^2(4) = 8,1$; $p = 0,08$). La descomposición de la interacción indicó que no había diferencias entre grupos en los niveles de corticosterona nada más acabar la prueba, pero sí a los 30 min. Los animales NS tuvieron niveles de corticosterona más elevados en los sujetos administrados con Anta-D1 y Anta-D2 respecto a los administrados con VEH, sin diferencias entre ellos. El grupo Anta-D2/CST presentó niveles más elevados que el grupo VEH/CST, sin diferir con los sujetos Anta-D1/CST. Además, el grupo Anta-D2/CST presentó unos niveles de corticosterona más elevados que los del grupo Anta-D2/NS y, marginalmente ($p = 0,09$), con el Anta-D2/UST. Por último, solo los sujetos del grupo VEH/NS, Anta-D2/NS y VEH/UST redujeron los niveles de corticosterona en R30 respecto a los niveles nada más acabar la prueba (R0), sin embargo el grupo Anta-D1/UST ($p = 0,06$) y el Anta-D2/UST ($p = 0,09$) tendían a la significación en R30 respecto a R0. Ninguna otra comparación por pares fue significativa.

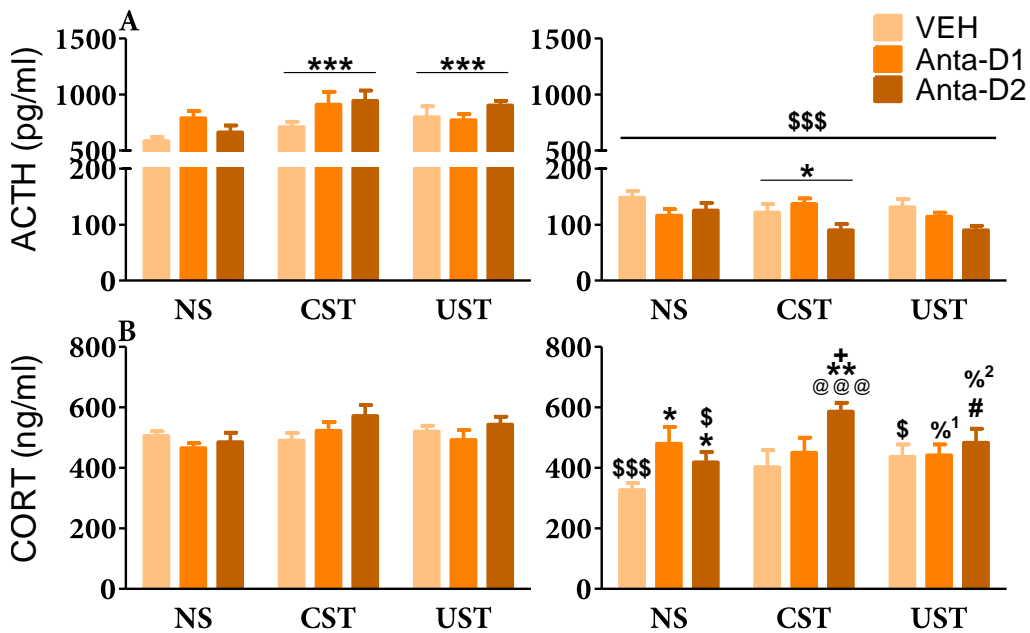


Figura 42. Efecto de la administración de antagonistas dopaminérgicos en la respuesta hormonal a la FST en sujetos con una historia previa de estrés adolescente.

La prueba fue realizada 8 días después de finalizar la última sesión en la caja lanzadera. Las figuras se han partido en DOS siguiendo los bloques temporales para facilitar su lectura. La figura A indica los niveles de ACTH (pg/ml) y la B los de corticosterona (ng/ml) nada más acabar (R0) y 30 min después (R30). Grupos: NS/VEH (n=9), CST/VEH (n=10), UST/VEH (n=10), NS/Anti-D1 (n=8), CST/Anta-D1 (n=9), UST/Anta-D1 (n=9), NS/Anta-D2 (n=10), CST Anta-D2 (n=10) y UST Anta-D2 (n=10). Las barras representan la media y el SEM. En la figura A los símbolos indican: * diferencias vs el grupo NS de su respectivo intervalo, \$ diferencias vs el R0. En la figura B los símbolos representan: * diferencias entre los grupos VEH de su propio tratamiento adolescente en R30, + diferencias vs el grupo Anta-D1/CST en R30, @ diferencias vs el grupo Anta-D2/NS en el R30, # tendencia (p=0,09) vs el grupo Anta-D2/CST, \$ diferencias vs su correspondiente grupo en R0, % tendencia vs su respectivo grupo en R0: 1: p=0,06; 2: p=0,09. El número de símbolos en las tres figuras indica el valor de p: uno p≤ 0,05, dos p≤ 0,01, tres p≤ 0,001.

4. Conclusiones

Atendiendo a la curva de aprendizaje, al tiempo de choque y a la latencia de respuesta, podemos afirmar que los animales del grupo CST fueron capaces de adquirir la tarea, aunque el aprendizaje fue inferior al de la primera cohorte (datos estadísticos no mostrados). A pesar de diferir en la tasa de adquisición de la tarea, en esta segunda cohorte se observó un descenso del miedo condicionado al contexto en las últimas sesiones durante el período de habituación evaluado por la actividad motora, que no se observó en la primera cohorte. En ambas se observó un descenso en la actividad durante el ITI en el grupo UST y un incremento en las CST, difiriendo ambos grupos en el número de cruzamientos durante el ITI en la primera y en las últimas sesiones.

Los niveles de corticosterona acumulados en pelo fueron superiores, como era de esperar, en los grupos expuestos a estrés adolescente, pero sin diferencias mediadas por la controlabilidad. Los niveles de corticosterona tras la administración de ACTH sintético no difieren entre grupos, indicando que la sensibilidad de la glándula adrenal a los niveles de ACTH no se ve alterada por la exposición a estrés adolescente.

A nivel conductual observamos un descenso inicial en la conducta exploratoria a largo plazo, mediada por la exposición a estrés adolescente, sin afectar a ningún otro de los parámetros estudiados durante la prueba de hiponeofagia; así como un descenso en la conducta de interacción social activa mediada por la exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia.

La administración de antagonistas dopaminérgicos, tanto D1 como D2, reduce la actividad en la FST y dificulta la recuperación de la corticosterona en animales sin historia previa de estrés. Cuando los sujetos administrados son ratas que han pasado por una exposición crónica a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia el impacto de los antagonistas varía. Mientras que ambos potencian sus efectos en el grupo UST, especialmente el Anti-D2, el impacto de los antagonistas parece reducirse (o bloquearse) cuando los animales han experimentado estrés adolescente controlable, especialmente el del Anti-D1. Los niveles de ACTH indicaron una sensibilización en la

respuesta del eje HPA en ambos grupos, que no se observó en la corticosterona. La administración de antagonistas dopaminérgicos redujo la recuperación de los niveles de corticosterona 30 min después de la exposición respecto a la de vehículo en los animales del grupo NS. Los sujetos del grupo Anti-D2/CST mantuvieron unos niveles de corticosterona más elevados que el resto de grupos CST y Anti-D2. Además, mientras que los grupos NS y UST reducen, en general, los niveles de corticosterona de R0 a R30, no ocurre lo mismo en los animales CST en los que en ninguna de las condiciones (FÁRMACO) presentó una reducción.

Experimento 3: Consecuencias endocrinas y conductuales de la exposición a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia en animales de la cepa *Long-Evans*

1. Planteamientos y objetivos

El paradigma de estrés que hemos utilizado provoca efectos moderados o leves, que en muchos casos no están modulados por la controlabilidad. Además, los resultados obtenidos no siempre se replican de un experimento a otro, por lo que el impacto no parece ser muy robusto. Por este motivo, hemos explorado variaciones del modelo. El objetivo de este experimento fue evaluar el impacto del paradigma usado hasta ahora, en la cepa de ratas *Long-Evans* que, según indican datos no publicados de nuestro grupo (Sanchís-Ollé en preparación), es más vulnerable a las consecuencias de exposición a estrés. Esperamos que el impacto de la exposición a estrés sea más marcado en las ratas de la cepa *Long-Evans* el observado hasta ahora en las ratas *Sprague-Dawley*.

2. Diseño experimental

Se siguió el mismo procedimiento que los utilizados en los experimentos 1 y 2, salvo que la exposición se hizo entre el PND 34 y 56 (± 1). Evaluamos la respuesta del eje HPA en las sesiones 1 y 8, la actividad basal 3 días después de la última sesión y las respuestas del eje a un estímulo estresante heterotípico de baja intensidad (HB) 4 días después y a uno de intensidad moderada-alta (FST) 8 días más tarde. Se estudió el impacto sobre la conducta exploratoria en un OF (PND 60 ± 1), la conducta social en la prueba de IS (PND 62 ± 1), el estilo de afrontamiento en la FST (PND 64 ± 1), y la anhedonia, evaluada por el consumo de sacarina (PND 69-74 ± 1). Treinta días después de la última sesión en la caja lanzadera (PND 86) todos los sujetos fueron expuestos a la TWAA.

Un resumen detallado del procedimiento experimental lo podemos ver en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Grupos experimentales y diseño Capítulo 3

Experimento <i>Long-Evans</i>	PND 34-56 (±1)	PN D 59 (±1)	PN D 60 (±1)	PND 62 (±1)	PN D 64 (±1)	PND 69 a 74 (±1)	PND 86 (±1)
NS (12)	Caja lanzadera	TM Basal	OF + TM	Prueba IS	FST + TM	Ingesta sacarina	TWAA
CST (20)	Caja lanzadera	TM Basal	OF + TM	Prueba IS	FST + TM	Ingesta sacarina	TWAA
UST (20)	Caja lanzadera	TM Basal	OF + TM	Prueba IS	FST + TM	Ingesta sacarina	TWAA

Del PND 34 al 56 se realizó la exposición a estrés adolescente. En el PND 24 y en el 56 se realizó una TM. En los PND 59, 60 y 64 se extrajeron una TM en condiciones basales, tras la exposición a OF y a FST, respectivamente. En los PND 60, 62 y 64 se evaluaron la conducta durante 10 min de OF, 15 min de prueba de IS y 30 min de FST, respectivamente. Del PND 69 al 74 se evaluó el consumo de sacarina. En el PND 86 fueron expuestos a TWAA.

*El número entre paréntesis indica la **n** final. PND: día postnatal, NS: sin estrés, CST: estrés controlable, UST: estrés incontrolable, TM: toma de muestra, OF: campo abierto, IS: interacción social, FST: prueba de nado forzado, TWAA: evitación activa en dos sentidos.*

3. Resultados estrés controlable/ incontrolable en *Long-Evans*

3.1. Caja lanzadera y TWAA

Cuantificamos el número de evitaciones, escapes, respuestas nulas, la cantidad de choque y la latencia de respuesta con el objetivo de evaluar la adquisición de la tarea en las ratas del grupo CST. El análisis

estadístico se realizó mediante un GEE de un factor (SESIÓN) que tuvo efecto significativo en el número de evitaciones ($X^2(7) = 40,9$; $p=0,00$; **Figura 43.A.**), respuestas nulas ($X^2(6) = 40,1$; $p=0,00$; **Figura 43.A.**), tiempo de choque ($X^2(7) = 123$; $p=0,00$; **Figura 43.B.**) y latencia de respuesta ($X^2(7) = 112$; $p=0,00$; **Figura 43.C.**), pero no en el número de escapes (**Figura 43.A.**). Las comparaciones posteriores indicaron un incremento significativo en el número de evitaciones de la sesión 1 a las siguientes, un descenso en las respuestas nulas en las últimas sesiones respecto a las tres primeras, en las 4 últimas sesiones en el tiempo de choque respecto a las 4 primeras, y en la latencia de respuesta en las 4 últimas respecto a las 4 primeras.

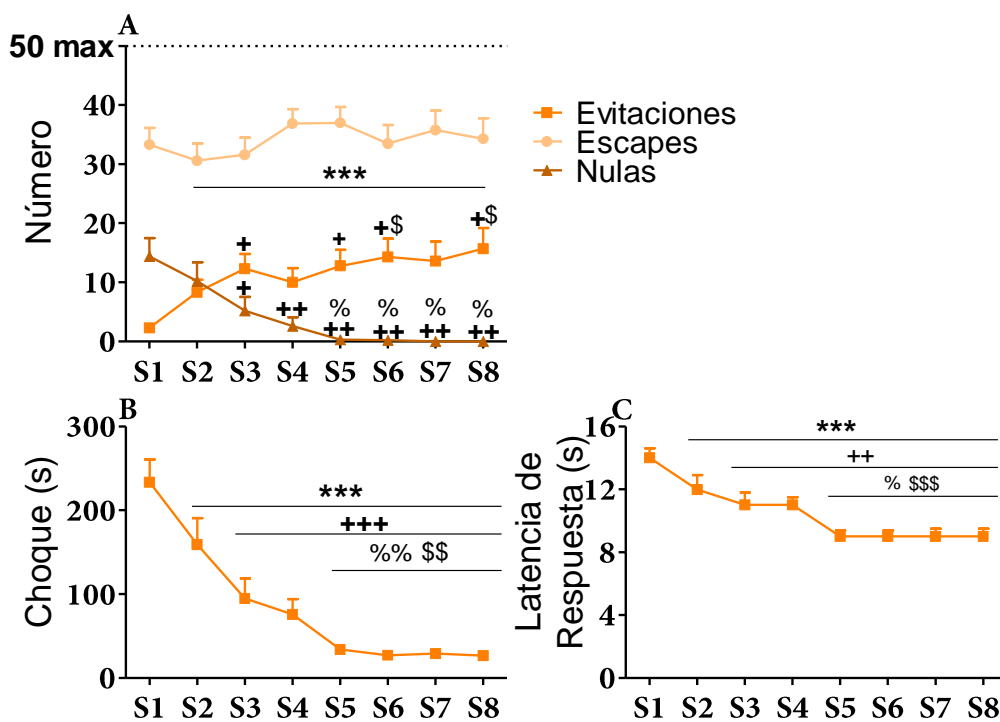


Figura 43. Desempeño en la TWAA.

Para cada sesión, la figura A marca el número de evitaciones, escapes y respuestas nulas, la B el tiempo de choque y la C la latencia de respuesta en el grupo CST ($n=20$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs la Sesión 1; + diferencias vs la Sesión 2, % diferencias vs la sesión 3, \$ diferencias vs la sesión 4. El número de símbolos marca el valor de p : uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.

Se cuantificó el número de cruzamientos (**figura 44**) durante la fase de habituación y el análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). Se observó efecto significativo del factor SESIÓN ($X^2(7) = 504$; $p < 0,001$), del factor GRUPO ($X^2(2) = 154$; $p < 0,001$) y de la interacción SESIÓN*GRUPO ($X^2(14) = 507$; $p < 0,001$). La descomposición de la interacción mostró un descenso en los grupos CST y UST en todas las sesiones respecto a la sesión 1, y un incremento en el NS en las tres últimas sesiones respecto a la sesión 1. El número de cruzamientos durante la habituación en todas las sesiones, a excepción de la primera, es significativamente inferior en los dos grupos de estrés repetido respecto al del grupo NS, como era de esperar. En la sesión 2 el número de cruzamientos fue superior en el grupo UST que en el CST, mientras que en la última fue marginalmente superior ($p = 0,059$) en el CST que en el UST, en el resto de sesiones no hubo diferencias entre estos grupos.

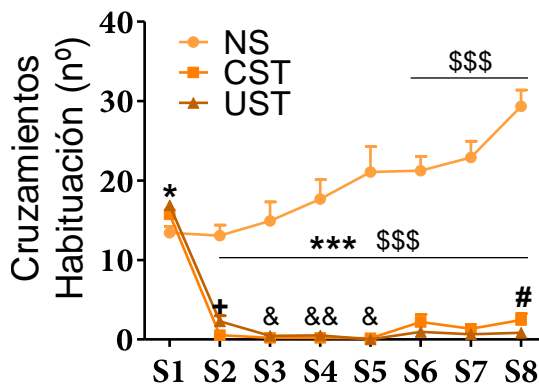


Figura 44. Número de cruzamientos durante la fase de habituación.

Número de cruzamientos durante la fase de habituación para cada sesión en los grupos NS ($n=12$), CST ($n=20$) y UST ($n=20$). Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: \$ diferencias vs la Sesión 1 del mismo grupo, & diferencias vs la Sesión 2 en el grupo UST, * diferencias vs NS en la misma sesión; + diferencias vs CST en la misma sesión, # diferencias marginales ($p=0,059$) vs UST en la sesión 8. El número de símbolos indica el valor de p : uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.

Cuantificamos, asimismo, los cruzamientos durante el ITI (**figura 45**) en los animales del grupo CST y en la mitad de los del UST (solo fue posible hacerlo en la mitad por razones técnicas). El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). El efecto del factor GRUPO fue estadísticamente significativo ($X^2(1) = 7,8$;

$p=0,005$), mientras que los efectos del factor SESIÓN ($X^2(7) = 13,2$; $p=0,06$) y de la interacción SESIÓN*GRUPO ($X^2(7) = 13,3$; $p=0,06$) fueron marginales. La descomposición de la interacción indicó un incremento en el número de cruzamientos en el grupo CST respecto a los cruzamientos en la sesión 1, incremento que no ocurre en el grupo UST que se mantiene estable a lo largo de las sesiones. Los cruzamientos durante el ITI son significativamente inferiores en el grupo UST en comparación al CST en las sesiones 3, 5, 6 ($p=0,059$), 7 y 8. El número de cruzamientos durante el ITI en el grupo CST correlaciona positivamente con el número de evitaciones a partir de la segunda sesión (Tabla 6).

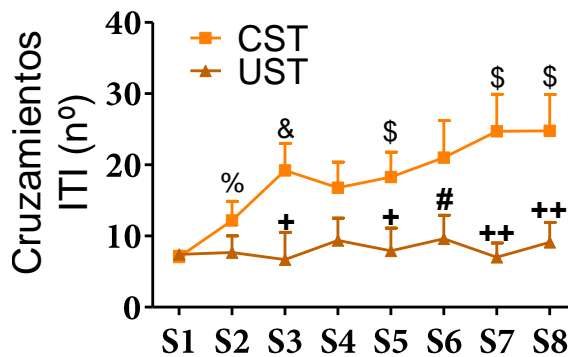


Figura 45. Número de cruzamientos durante el ITI.

Se grafican el número de cruzamientos por cada sesión en los grupos CST ($n=20$) y UST ($n=10$). Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: \$ diferencias vs la Sesión 1 del mismo grupo, & diferencias vs la Sesión 2 del mismo grupo, % tendencia ($p=0,056$) vs la sesión 1 del mismo grupo, + diferencias vs el CST en la misma sesión, # tendencia ($p=0,059$) vs el grupo CST en la Sesión 6. El número de símbolos indica el valor de p : uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$.

Tabla 6. Correlaciones

Sesión	r
S1	0,14
S2	0,78***
S3	0,79***
S4	0,49*

S5	0,46*
S6	0,59*
S7	0,66**
S8	0,69**

Experimento 3. La tabla muestra la correlación entre el número de evitaciones y el número de cruzamientos durante el ITI en cada sesión (en el grupo CST). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,001$.

Por último, medimos el tiempo de petrificación en las sesiones 2 y 8 (**figura 46**). El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (SESIÓN y GRUPO). El factor SESIÓN no tuvo efecto significativo, aunque sí lo tuvo el factor GRUPO ($X^2(2) = 876$; $p < 0,001$) y la interacción SESIÓN*GRUPO ($X^2(2) = 5,8$; $p = 0,05$). La descomposición de la interacción reveló que el grupo UST realizó menos tiempo de petrificación en la segunda sesión que el grupo CST, pero estas diferencias desaparecían en la sesión 8. Ambos grupos difirieron del grupo NS en las dos sesiones, porque, como era de esperar, estos no hicieron prácticamente conducta petrificación.

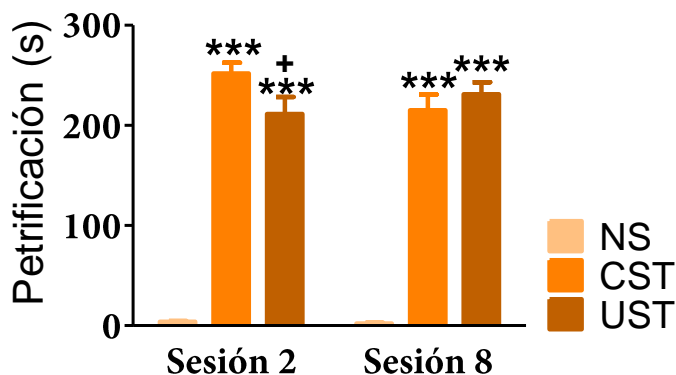


Figura 46. Tiempo de petrificación en las sesiones 2 y 8.

Se muestra el tiempo (s) que los sujetos realizan la conducta de petrificación durante la fase de habituación en las sesiones 2 y 8. Grupos: NS ($n=12$), CST ($n=20$) y UST ($n=20$). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: *** $p \leq 0,001$ diferencias vs el NS de la misma sesión, + $p \leq 0,05$ diferencias vs el CST en la misma sesión.

3.2. Respuesta hormonal a la caja lanzadera

Tras las sesiones 1 y 8 se realizaron dos TM (una nada más finalizar la sesión y otra 30 min después). Se analizaron los niveles de corticosterona

en R0 y R30 en las dos sesiones y los de GLU solo en R0. El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de tres factores (SESIÓN, DINÁMICA y GRUPO) en el caso de la corticosterona y de dos (SESIÓN y GRUPO) en el caso de la glucosa.

El análisis estadístico de la corticosterona (**figura 47**) reveló un efecto significativo de los factores SESIÓN ($X^2(1) = 62,7$; $p < 0,001$), DINÁMICA ($X^2(1) = 98,1$; $p < 0,001$) y GRUPO ($X^2(2) = 252$; $p < 0,001$), y de las interacciones DINÁMICA*GRUPO ($X^2(2) = 108$; $p < 0,001$) y SESIÓN*DINÁMICA*GRUPO ($X^2(2) = 6,4$; $p = 0,04$), pero no del resto de interacciones. La descomposición de la triple interacción mostró que los niveles de corticosterona nada más acabar ambas sesiones eran superiores en los grupos CST y UST respecto al NS, y en el CST respecto al UST. Algo similar se observó en R30 en la primera sesión y en la última. En los grupos CST y UST se observó un descenso en los niveles de corticosterona en R0 de la sesión 8 respecto al de la sesión 1 y en los tres grupos se vio un descenso en los niveles de corticosterona en R30 en la última sesión respecto a la primera.

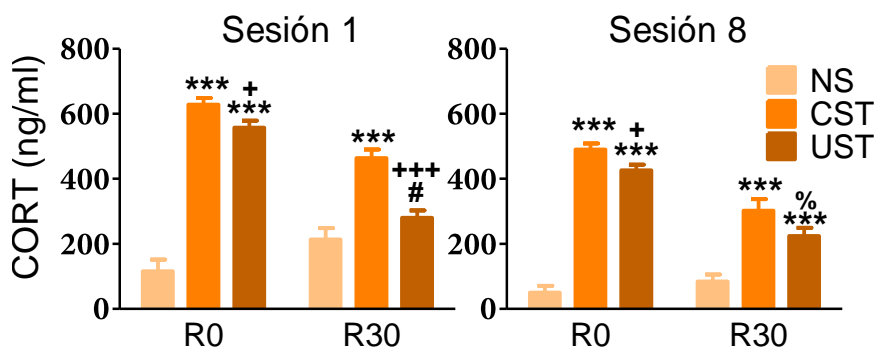


Figura 47. Niveles de corticosterona en las sesiones 1 y 8.

Niveles de corticosterona (ng/ml) en las sesiones 1 y 8, nada más acabar (R0) y media hora después (R30) de finalizar la sesión. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS, + diferencias vs CST, # diferencias marginales ($p = 0,09$) vs NS, % diferencias marginales ($p = 0,06$) vs CST, en la misma sesión. El número de símbolos marca el valor de p : uno: $p \leq 0,05$, tres: $p \leq 0,001$. Las diferencias entre R0 y R30 y entre sesiones no se especificaron para facilitar la lectura. El grupo NS difiere en R30 de R0 en la primera sesión ($p < 0,05$), pero no en la última. Ambos grupos con estrés (CST y UST) difieren en R30 de su R0 ($p < 0,001$) en ambas sesiones. Los grupos CST y UST tuvieron una respuesta inferior en la sesión 8 en R0 que en la sesión 1 ($p < 0,001$) y fue marginal en el NS ($p = 0,06$). En R30 descendió en la última sesión respecto a la primera en el grupo NS ($p < 0,05$), CST ($p < 0,001$) y marginalmente en el UST ($p = 0,07$).

En los niveles de glucosa (**figura 48**) no hubo efecto significativo del factor SESIÓN, pero sí del factor GRUPO ($X^2(2) = 58,9$; $p < 0,001$) y de la interacción SESIÓN*GRUPO ($X^2(2) = 6,8$; $p = 0,03$). La descomposición de la interacción mostró que los niveles de glucosa fueron superiores en los grupos CST y UST, respecto al NS en la primera y última sesión, pero sin diferencias entre ellos. Asimismo, los niveles de glucosa del grupo CST fueron superiores en la última sesión que en la primera, mientras que en los demás grupos la respuesta se mantuvo estable.

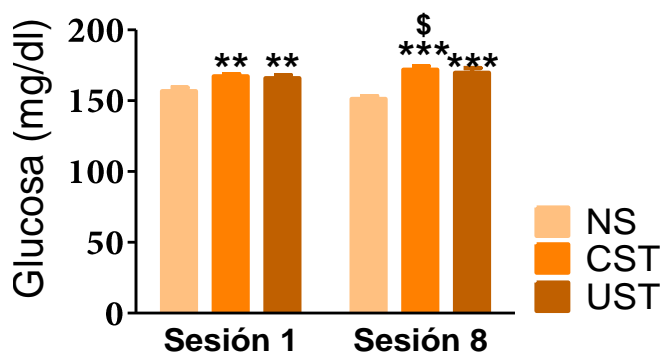


Figura 48. Niveles de Glucosa en las sesiones 1 y 8.

*Niveles de glucosa (mg/dl) en las sesiones 1 y 8 nada más acabar la sesión. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS en la misma sesión, \$ diferencias vs la sesión 1 de su mismo grupo. El número de símbolos marca el valor de p: uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.*

3.3. Impacto sobre el peso

Se estudió el incremento de peso (**figura 49**) del día previo a la primera sesión en la TWAA a la última. El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO) que fue estadísticamente significativo ($X^2(2) = 8,6$; $p = 0,01$). La comparación posterior indicó que el incremento de peso fue inferior en el grupo CST y, marginalmente ($p = 0,056$), en el UST, respecto al NS, sin diferencias entre los primeros

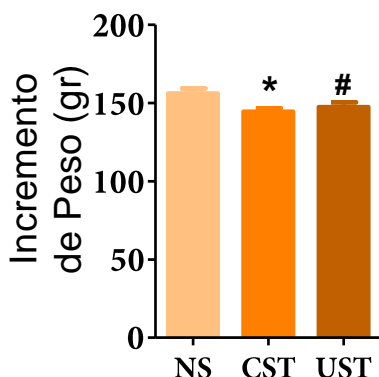


Figura 49. Incremento de peso (gr) del día previo a la sesión 1 al día posterior a la sesión 8. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * $p \leq 0,05$ diferencias vs NS, # diferencias marginales ($p=0,059$) vs NS.

3.4. Consecuencias sobre la actividad de eje HPA (respuesta de corticosterona)

Evaluamos el impacto de la exposición a estrés controlable/incontrolable sobre los niveles basales de corticosterona y su respuesta a un estímulo de intensidad baja (OF) y otro de intensidad moderada-alta (FST), 3, 4 y 8 días después de finalizar la exposición a estrés adolescente, respectivamente. Un animal fue eliminado del grupo UST porque hubo que parar su exposición a FST antes de finalizar los 30 min, debido a que era incapaz de adoptar la conducta de inmovilidad y tenía problemas de flotabilidad. El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO) en los dos primeros casos, y un GEE de dos en el último (DINÁMICA y GRUPO), dado que se llevaron a cabo dos TM tras la FST (R0 y R30).

No hubo efecto significativo en los niveles basales (**figura 50.A**), ni tras la exposición al OF (**figura 50.B**). Sí los hubo tras la exposición a FST (**figura 50.C**): un efecto del factor GRUPO ($X^2(2) = 12,8$; $p=0,002$) y del factor DINÁMICA ($X^2(1) = 4,0$; $p=0,04$), pero no de la interacción. El contraste posterior del factor GRUPO indicó que los animales que habían sido expuestos a estrés adolescente mostraron una respuesta de corticosterona superior que los no expuestos, sin diferencias entre ellos.

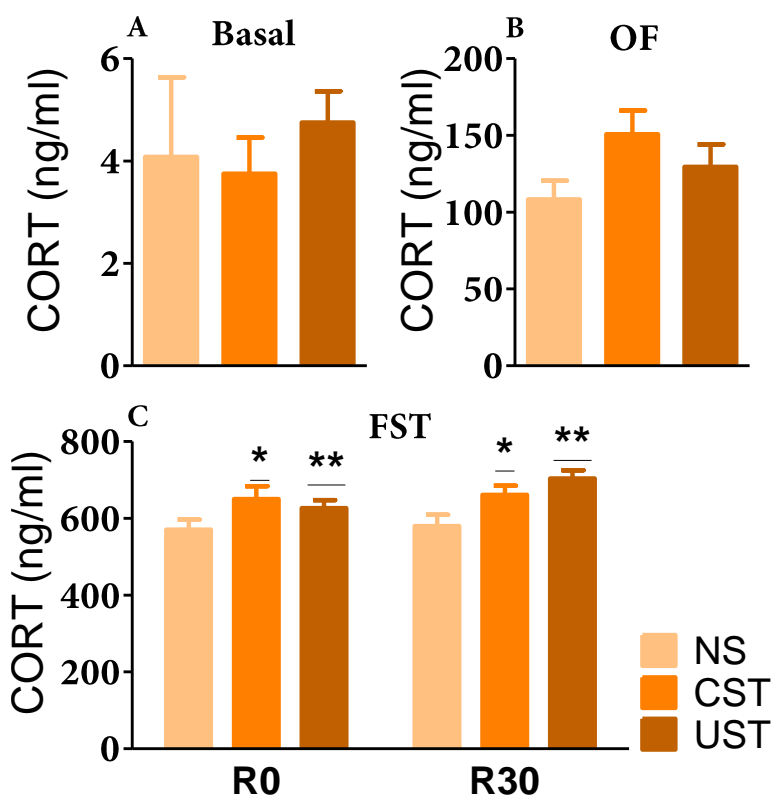


Figura 50. Niveles de corticosterona a nivel basal (A), tras OF (B) y FST (C).

Se muestran los niveles de corticosterona (ng/ml) en la figura A sin exposición a estrés (basal, 3 días después de la última sesión), en la B tras la exposición a OF (4 días después de la última sesión) y la C nada más acabar (R0) y 30 min después (R30) de acabar la exposición a FST (8 días después de la última sesión). Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: *diferencias vs NS. El número de símbolos marca el valor de p: uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$.

3.5. Consecuencias conductuales (conducta exploratoria, la interacción social, las estrategias de afrontamiento y la anhedonia)

La conducta exploratoria durante el OF se evaluó 4 días después de la última sesión y se analizó dividiendo la prueba en dos bloques de 5 min. En ambos se cuantificó el tiempo de permanencia en el centro (figura 51.A.), así como la distancia recorrida en el centro (figura 51.B.), la periferia (figura 51.C.) y en total (figura 51.D); y el número de alzamientos (figura 51.E.). El análisis estadístico se realizó mediante un

GEE de dos factores (BLOQUE y GRUPO). En el tiempo que permanecieron en el centro hubo efecto marginalmente significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 5,3$; $p=0,06$), pero no del factor BLOQUE, ni de la interacción entre ambos. La comparaciones posteriores del factor GRUPO mostraron que los animales del grupo CST estaban menos tiempo en el centro (marginal; $p=0,06$) que el grupo NS, sin diferencias de ninguno con el grupo UST. En la distancia recorrida en el centro no se observó un efecto significativo del factor GRUPO, pero sí del factor BLOQUE ($X^2(1) = 3,9$; $p=0,04$) y de la interacción BLOQUE*GRUPO ($X^2(2) = 6,8$; $p=0,03$). La descomposición de la interacción mostró que el grupo CST y, marginalmente, el UST ($p=0,07$) recorrieron menos distancia en el centro durante los primeros 5 min que el grupo NS, sin diferencias entre los primeros. En los últimos 5 min los tres grupos se equiparan. En la distancia recorrida en la periferia no se halló efecto significativo del factor GRUPO, pero sí del BLOQUE ($X^2(1) = 211$; $p<0,001$) y de la interacción entre ambos ($X^2(2) = 10,4$; $p=0,006$). La descomposición de la interacción no reveló cambios entre grupos, y solo se observó un descenso en la distancia recorrida por cada grupo en los últimos 5 min respecto a los 5 primeros. En la distancia recorrida en total el factor GRUPO no tuvo efecto significativo, pero sí el BLOQUE ($X^2(1) = 202$; $p<0,001$) y la interacción entre ambos ($X^2(2) = 12,0$; $p=0,002$). La descomposición de la interacción indicó que el grupo UST recorrió marginalmente ($p=0,09$) menos distancia en total durante los primeros 5 min que el grupo NS, sin diferencias con el CST de ninguno de ellos. En los últimos 5 min los tres grupos recorrieron menos distancia y fue similar entre ellos. En el número de alzamientos se observó efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(1) = 43,7$; $p<0,001$), pero no del factor GRUPO, ni de la interacción entre ambos.

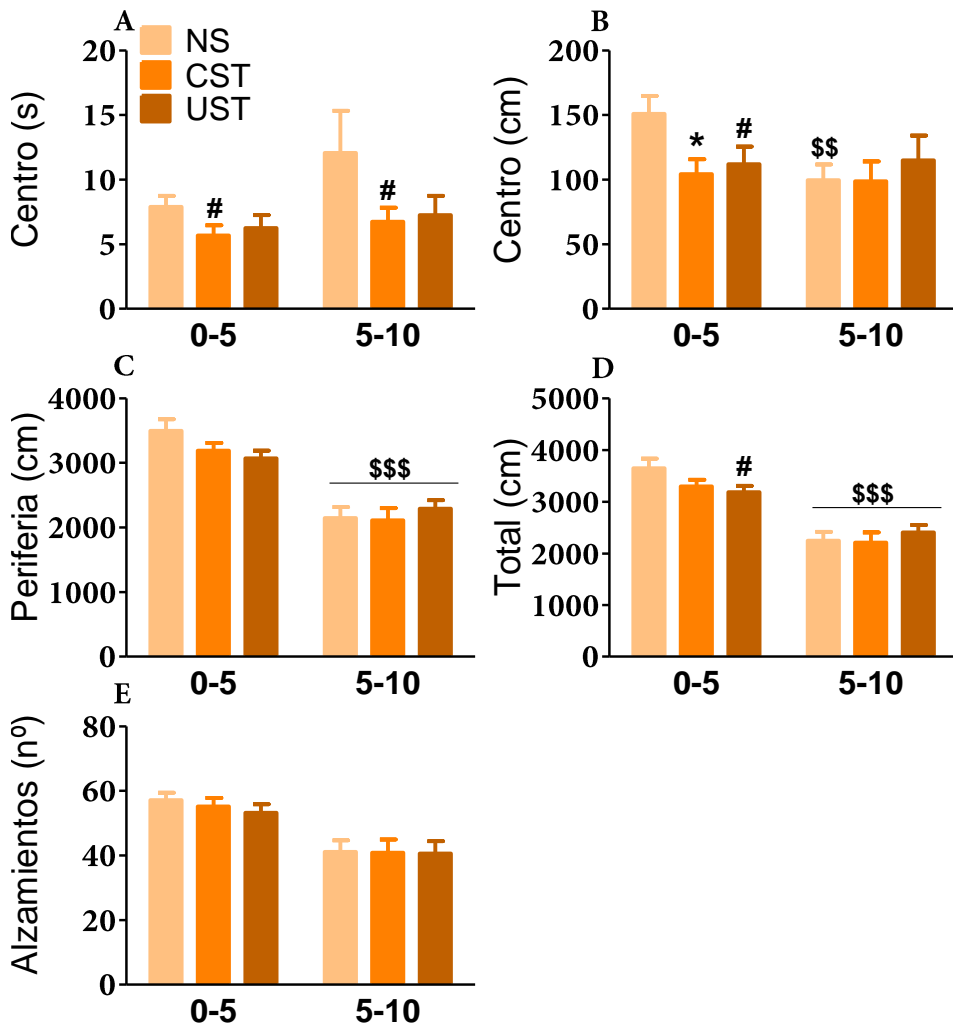


Figura 51. Conducta exploratoria en el OF.

La conducta en la OF se evaluó 4 días después de la última sesión en la caja lanzadera. Se grafica la conducta en el OF (10 min) dividiendo la sesión en dos intervalos de 5 minutos. La figura A representa el tiempo (s) de permanencia en el centro, la B distancia (cm) recorrida en el centro, la C en la periferia y la D en total (centro + periferia). La figura E representa el número de alzamientos. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS de su intervalo, # diferencias marginales vs NS de su intervalo en la figura B: $p=0,07$ y en la D: $p=0,09$, y vs NS en global en la figura A: $p=0,06$; \$ diferencias vs los primeros 5 min de su mismo grupo experimental, salvo en la figura E que es en conjunto. El número de símbolos marca el valor de p: uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.

La conducta de interacción social fue medida en la prueba de IS 6 días después de la última sesión en caja lanzadera. Se cuantificaron tres tipos de conducta durante la prueba: la interacción social activa (**figura 52.A.**), la conducta de seguimiento (**figura 52.B.**) y la conducta de interacción social pasiva (**figura 52.C.**), dividiendo la sesión en tres bloques temporales (0-5, 5-10 y 10-15 min). El análisis estadístico se realizó mediante un GEE de dos factores (BLOQUE y GRUPO). En la conducta de interacción activa hubo efecto marginalmente significativo del factor BLOQUE ($X^2(2) = 5,79$; $p = 0,055$), pero no en el factor GRUPO o en la interacción entre ambos. La comparación posterior del factor BLOQUE indicó un descenso marginal ($p = 0,052$) en el tiempo de conducta activa durante los 5 últimos minutos respecto a los primeros, sin diferencias entre los otros bloques temporales. En la conducta de seguimiento se observó efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(2) = 164$; $p < 0,001$), pero no del factor GRUPO o de la interacción entre ambos. La comparación por parejas del factor BLOQUE mostró un descenso progresivo en el tiempo de seguimiento del primer bloque al último. En la conducta de interacción pasiva el factor BLOQUE tuvo efecto significativo ($X^2(2) = 9,05$; $p = 0,01$), pero no el factor GRUPO o la interacción entre ambos factores. La comparación posterior mostró un incremento en el último bloque temporal respecto al primero en el tiempo de interacción pasiva, sin más diferencias entre bloques.

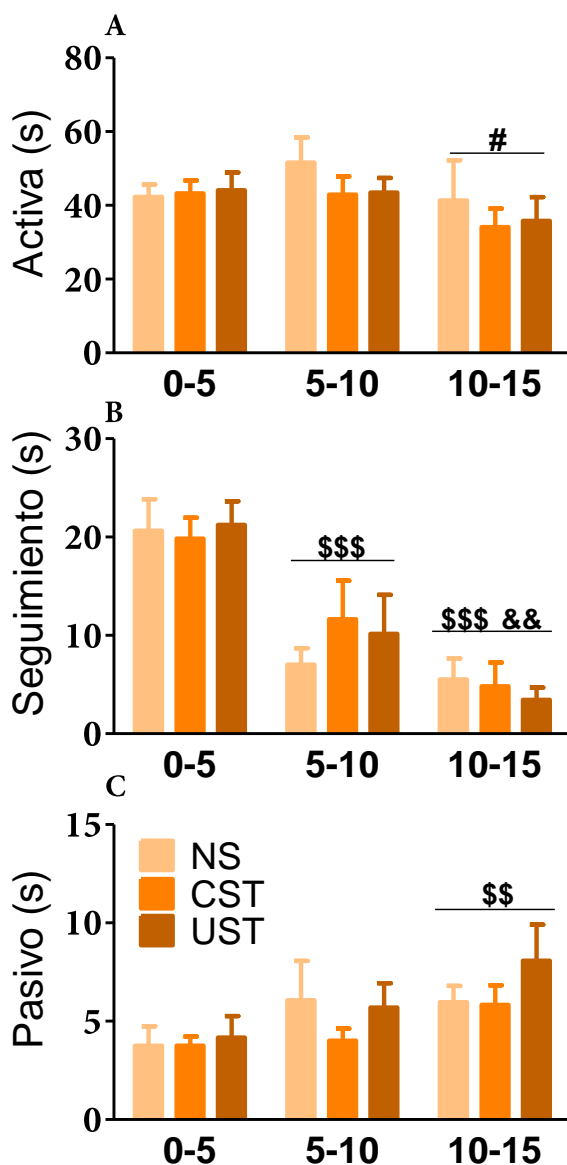


Figura 52. Conducta de interacción social.

La interacción social se evaluó 6 días después de la última sesión en la caja lanzadera. Se gráfica la conducta en prueba de IS (15 min) dividiendo la sesión en tres intervalos de 5 minutos. La figura **A** representa el tiempo (s) de interacción social activa, la **B** el de conducta de seguimiento y la **C** de interacción social pasiva. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: \$ diferencias vs los primeros 5 min, & diferencias vs los 5 minutos intermedios, # diferencias

Las estrategias de afrontamiento se evaluaron mediante la FST 8 días después de la última sesión en la caja lanzadera. Se midieron las conductas de escape (**figura 53.A.**), nado suave (**figura 53.B.**) e inmovilidad (**figura 53.C.**) durante los primeros 5 min de la prueba (después realizaron inmovilidad, predominantemente). Se analizó estadísticamente mediante un GzLM de un factor (GRUPO), pero no hubo ningún efecto significativo en ninguna de las tres conductas estudiadas.

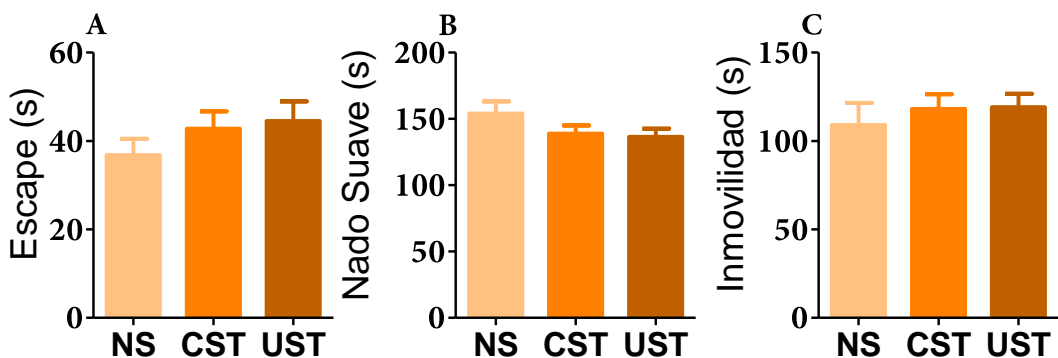


Figura 53. Conducta en la FST.

La conducta en la FST se evaluó 8 días después de la última sesión en la caja lanzadera. Se muestra la conducta en la FST durante los primeros 5 min. La figura A representa el tiempo (s) de escape, la B el de nado suave y la C de inmovilidad. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM.

Trece días después de la última sesión en la caja lanzadera se evaluaron conductas similares a la anhedonia a través de la medición del consumo preferente de sacarina a las 4 h (para evaluar la neofobia alimentaria; **figura 54.A.**) de colocar las botellas y cada día durante 6 días (para evaluar anhedonia; **figura 54.B.**). El análisis estadístico de las 4 primeras horas se realizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO), mientras que el consumo diario se analizó mediante un GEE de dos factores (DÍA y GRUPO). El factor GRUPO tuvo efecto significativo en el consumo durante las 4 primeras horas ($X^2(2) = 11,1; p=0,004$). El contraste posterior mostró un consumo inferior en los grupos CST y UST respecto al NS durante las primeras 4 h, sin diferencias entre los primeros. En el consumo durante los 6 días el factor GRUPO ($X^2(2) = 7,5; p=0,02$) y el factor DÍA ($X^2(5) = 41,5; p=0,00$) tuvieron efecto significativo, pero no

la interacción entre ambos. La comparación posterior mostró que el consumo global fue inferior en los grupos CST y, marginalmente ($p=0,06$), en el UST, respecto al NS, sin diferencias entre los primeros, así como fluctuaciones en el consumo a lo largo de las sesiones. El consumo de agua (datos no mostrados) se evaluó durante este período pero se mantuvo en niveles muy bajos y en ningún caso tuvo efectos significativos. También valoramos si el peso de los animales podría mediar el consumo de sacarina pero el ANCOVA no reveló efecto significativo del pelo.

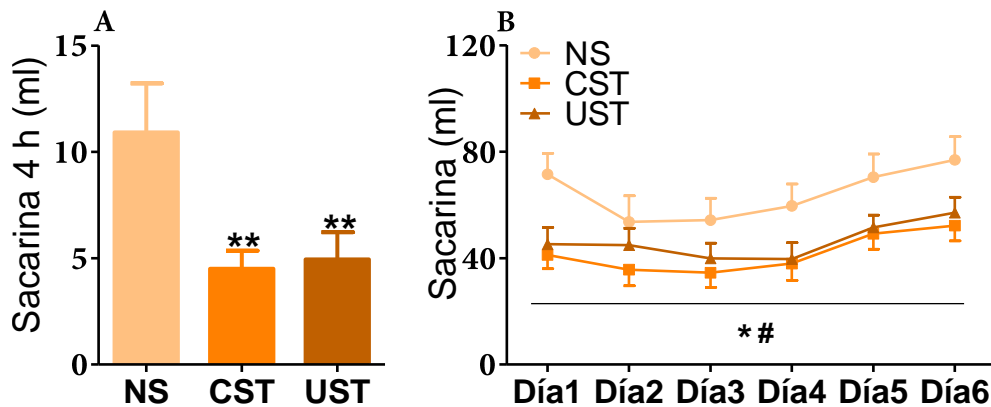


Figura 54. Consumo preferente de sacarina.

Se muestra el consumo de sacarina (ml). La figura A representa el consumo durante las primeras 4 h y la B el consumo diario durante 6 días. Grupos: NS ($n=12$), CST ($n=20$) y UST ($n=20$). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras y los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS, # diferencias marginales ($p=0,06$) vs el NS. El número de símbolos marca el valor de p : dos: $p \leq 0,01$. Las fluctuaciones entre días no se indicaron en la gráfica para favorecer la legibilidad. El consumo fue inferior en los días 2 y 3 respecto al primero ($p < 0,05$), en el día 5 fue superior respecto al día 2 ($p < 0,05$), 3 ($p < 0,01$) y 4 ($p < 0,05$), y en el día 6 respecto al día 1 ($p < 0,05$), 2 ($p < 0,001$), 3 ($p < 0,001$), 4 ($p < 0,001$) y 5 ($p < 0,05$).

3.6. TWAA a largo plazo

Expusimos todos los grupos a la TWAA en la edad adulta (PND 86) para estudiar cómo afecta la experiencia previa en la caja lanzadera (NS, CST y UST) durante la adolescencia en la adultez. Evaluamos el tiempo de petrificación y los alzamientos durante la habituación, los cruzamientos durante la habituación y el ITI, el número de evitaciones, escapes, nulas y el tiempo de choque. Asimismo, analizamos el progreso temporal en

la TWAA dividiendo el número de evitaciones, escapes, respuestas nulas y tiempo de choque en 5 bloques de 10 ensayos. El análisis estadístico se realizó mediante un GzLM de un factor (GRUPO), salvo en el caso de la progresión de la sesión que se utilizó un GEE de dos factores (BLOQUE y GRUPO).

En el tiempo de petrificación el factor GRUPO tuvo efecto significativo ($X^2(2) = 205$; $p = 0,00$; **figura 55.A.**). La comparación posterior indicó que los animales de los grupos CST y UST realizaron más conducta de petrificación, como era de esperar, que el grupo NS. Los animales del grupo UST estuvieron, marginalmente ($p = 0,06$), más tiempo en conducta de petrificación que el grupo CST. En el número de alzamientos el factor GRUPO tuvo efecto significativo ($X^2(2) = 748$; $p = 0,00$; **figura 55.B.**). La comparación posterior indicó que los grupos con estrés adolescente realizaron menos alzamientos que los del grupo NS, sin diferencias entre los primeros. El número de cruzamientos durante la habituación tuvo efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 108$; $p = 0,00$; **figura 55.C.**). La comparación posterior indicó que fue superior en el grupo NS que en los otros dos grupos experimentales, sin diferencias entre estos. En el número de cruzamientos durante el ITI el factor GRUPO tuvo efecto significativo ($X^2(2) = 30,5$; $p = 0,00$; **figura 55.D.**) La comparación posterior indicó que el número de cruzamientos durante el ITI fue superior en el grupo CST que en los otros dos grupos experimentales, sin diferencias entre estos.

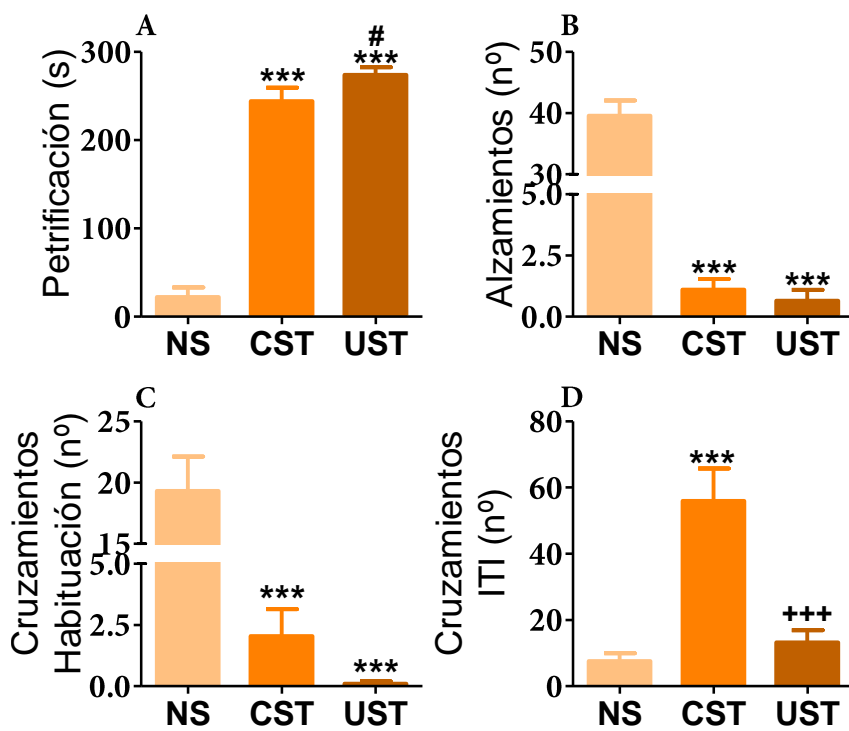


Figura 55. Conducta durante la habituación y el ITI.

La figura A representa el tiempo que realizan petrificación (s) durante la habituación, la B el número de alzamientos y la C el número de cruzamientos. La figura D muestra el número de cruzamientos durante el ITI. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: *** $p \leq 0,001$ diferencias vs NS, +++ $p \leq 0,001$ vs CST, # diferencias marginales ($p=0,06$) vs CST.

En el número de evitaciones se observó un efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 21,4$; $p < 0,001$; **figura 56.A.**). La comparación posterior mostró que los animales del grupo CST realizaron más evitaciones que los otros dos grupos, sin diferencias entre estos. En el número de escapes hubo un efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 19,2$; $p < 0,001$; **figura 56.B.**). La comparación posterior indicó que el número de escapes fue inferior en el grupo CST que en los otros dos grupos experimentales, sin diferencias entre estos. En el número de respuestas nulas hubo efecto del factor GRUPO ($X^2(2) = 10,3$; $p = 0,006$; **figura 56.C.**). La comparación posterior indicó que el número de respuestas nulas fue superior en el grupo UST que en los otros dos

grupos, sin diferencias entre ellos. En el tiempo de choque se halló efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 28,9$; $p < 0,001$; **figura 56.D.**). La comparación posterior mostró que el tiempo de choque fue inferior en el grupo CST que en los otros dos grupos experimentales, sin diferencias entre ellos. En la latencia de respuesta se observó un efecto significativo del factor GRUPO ($X^2(2) = 30,7$; $p < 0,001$; **figura 56.F.**). La comparación posterior indicó que la latencia de respuesta es inferior en el CST que en los otros dos grupos, sin diferencias entre ellos.

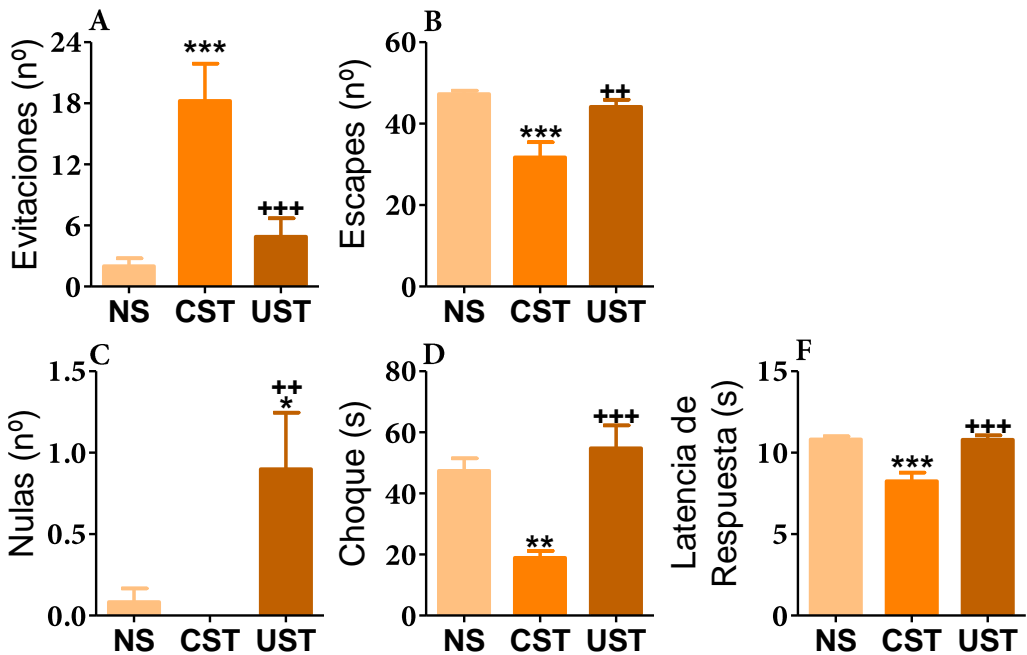


Figura 56. Conducta en la TWAA.

La figura A representa el número de evitaciones, la B el de escapes, la C el de respuestas nulas, la de D el tiempo (s) de choque y la F la latencia de respuesta (s). Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Las barras representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS, + vs CST. El número de símbolos marca el valor de p: uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$.

En el análisis por bloques, en el número de evitación se observó efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(4) = 35,8$; $p < 0,001$; **figura 57.A.**), GRUPO ($X^2(2) = 21,6$; $p < 0,001$) y de la interacción entre ambos ($X^2(8) = 16,0$; $p = 0,04$). La descomposición de la interacción mostró que el grupo CST realizó más evitaciones que los otros dos grupos todos los bloques. El grupo UST realizó, marginalmente ($p = 0,06$), menos evitaciones en el

primer bloque que el grupo NS, pero más en el último; sin diferencias en los bloques intermedios. En el número de escapes se observó un efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(4) = 19,1$; $p = 0,001$; **figura 57.B.**), GRUPO ($X^2(2) = 19,4$; $p < 0,001$) y de la interacción entre ambos ($X^2(8) = 19,9$; $p = 0,01$). La descomposición de la interacción indicó que en el primer bloque no hubo diferencias entre grupos, pero sí en los cuatro siguientes, en los que el grupo CST realizó menos escapes que los otros dos grupos. El grupo UST realizó menos escapes en el último bloque que el grupo NS, sin diferencias entre ellos en los bloques previos. En el número de respuestas nulas se observó un efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(4) = 13,4$; $p = 0,009$; **figura 57.C.**), GRUPO ($X^2(2) = 12$; $p = 0,002$) y de la interacción entre ambas ($X^2(6) = 13,7$; $p = 0,03$). La descomposición de la interacción indicó que el número de respuestas nulas fue superior en el grupo UST que en el CST en el primer bloque, sin diferencias con el NS de ninguno de ellos. En el resto de bloques no hubo diferencias entre grupos. En el tiempo de choque se observó efecto significativo del factor BLOQUE ($X^2(4) = 35,3$; $p < 0,001$; **figura 57.D.**), GRUPO ($X^2(2) = 50$; $p < 0,001$) y de la interacción entre ambos ($X^2(8) = 23,3$; $p = 0,003$). La descomposición de la interacción indicó que el tiempo de choque fue inferior en todos los bloques en el grupo CST que en los otros dos grupos, sin diferencias entre ellos hasta el último bloque en los que el tiempo de choque fue inferior en el UST que en el NS.

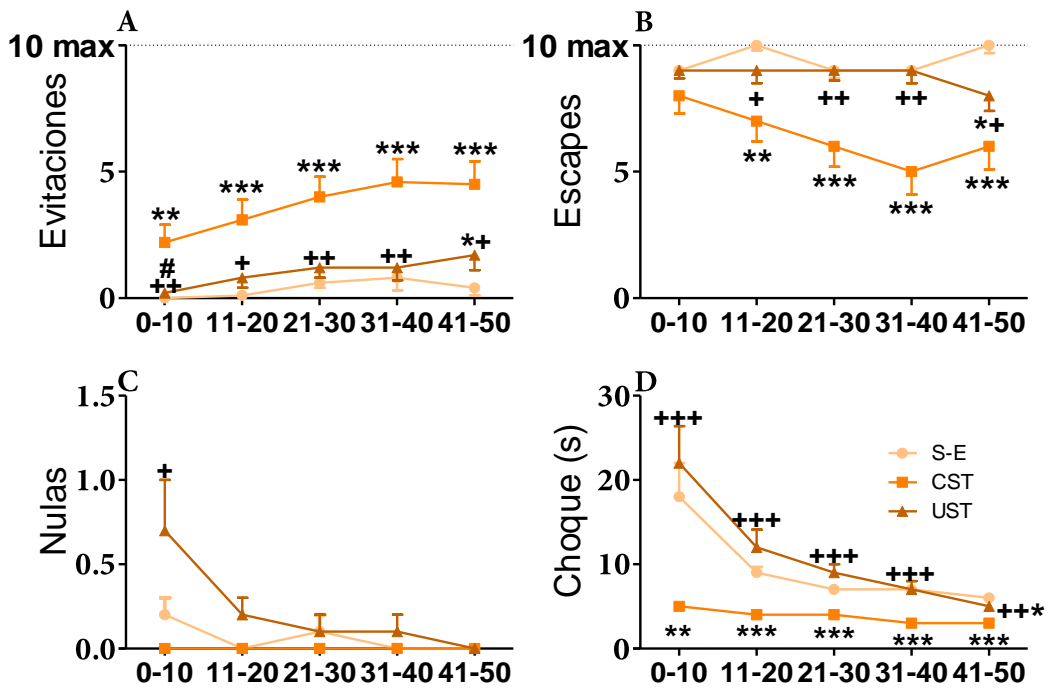


Figura 57. Conducta en la TWAA por bloques.

La figura A representa el número de evitaciones en cinco bloques de diez ensayos, la B el de escapes, la C el de respuestas nulas y la de D el tiempo (s) de choque. Grupos: NS (n=12), CST (n=20) y UST (n=20). La escala de cada gráfica (eje Y) se adapta a los valores representados para optimizar la legibilidad. Los puntos representan la media y el SEM. Los símbolos indican: * diferencias vs NS, + vs CST, #= diferencias marginales ($p=0,06$) vs NS. El número de símbolos marca el valor de p: uno: $p \leq 0,05$, dos: $p \leq 0,01$, tres: $p \leq 0,001$. Las diferencias entre bloques no se añadieron para favorecer la legibilidad.

4. Conclusiones

Los parámetros estudiados durante la tarea en la caja lanzadera indican que las ratas CST aprendieron la tarea progresivamente. Los animales del grupo UST muestran menos miedo condicionado en la sesión 2 que los animales del grupo CST, pero se igualan en la 8. En las *Long-Evans* no observamos la amortiguación de la respuesta del eje HPA provocada por la exposición repetida a estrés controlable, sino que observamos que en el grupo expuesto a estrés incontrolable, ya en la sesión 1, los niveles de corticosterona son inferiores a lo del CST. La exposición a estrés adolescente provoca una reducción en la distancia recorrida en el centro del OF en ambos grupos, pero no tienen ningún impacto sobre la interacción social, ni sobre el estilo de afrontamiento en la FST. La

exposición a choque eléctrico en las patas de forma repetida durante la adolescencia provocó anhedonia evaluada por el consumo preferente de sacarina, sin que hubiese mediación de la controlabilidad. Por último, la exposición a la TWAA en la edad adulta indicó que los animales expuestos a estrés incontrolable acaban adquiriendo mejor la tarea, si atendemos al último bloque, que los animales que no son expuestos a estrés en la adolescencia, a pesar de que al inicio de la sesión (10 primeros bloques) tienen un desempeño inferior al NS.

Discusión

El objeto de este estudio ha sido evaluar la influencia de la controlabilidad en las consecuencias endocrinas y conductuales de la exposición repetida a estrés durante la adolescencia, y su relación con cambios en el SNC y el sistema dopaminérgico. El estímulo estresante utilizado fue el choque eléctrico en las patas y el grupo de estrés controlable (CST) realizaba una tarea de evitación/escape de choques eléctricos en una caja lanzadera (TWAA). El grupo de estrés incontrolable (UST) recibió la misma cantidad de choque eléctrico que su homólogo del CST sin que su conducta alterase la probabilidad de la aparición o finalización de los choques. Un tercer grupo (NS) se expuso a las mismas condiciones que los dos anteriores, pero sin ser expuestos al estímulo aversivo. Los primeros estudios se llevaron a cabo con la cepa *Sprague-Dawley*. La última parte de este trabajo tuvo la finalidad de estudiar posibles diferencias en el impacto de este paradigma de estrés en una cepa de ratas más susceptible a ciertos aspectos del estrés como es la cepa *Long-Evans*.

1. Caja lanzadera y TWAA (Experimentos 1 y 2)

La adquisición de la TWAA viene afectada por factores como la ansiedad, la reactividad emocional y las estrategias de afrontamiento (Steimer y Driscoll 2003). Para realizarla correctamente el sujeto debe aprender a inhibir la respuesta defensiva de petrificación ante el CS y el US y poder así realizar la respuesta operante adecuada: cruzar al compartimento contrario a donde va a recibir o está recibiendo el choque.

En las ratas *Sprague-Dawley* el número de evitaciones se fue incrementando a lo largo de las sesiones, mientras que, como era de esperar, descendía el número de escapes. La tasa de adquisición de la TWAA se incrementó hasta alcanzar en general una asíntota a partir de la tercera sesión. La respuesta de huida se aprendió rápidamente en la primera sesión y la latencia de respuesta se redujo a lo largo de las sesiones a medida que se iba adquiriendo la tarea. Las respuestas nulas se mantuvieron a un nivel muy bajo durante todas las sesiones. El patrón de respuesta obtenido en el presente estudio concuerda con los datos previos de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé et al. 2019). No

obstante, el nivel de adquisición de la tarea fue superior en el primer experimento que en el segundo.

Los estudios previos han demostrado que existen diferencias individuales en la adquisición de la tarea y una relación con la edad. En ratas adultas, Galatzer-Levy y colaboradores (2014) han identificado cuatro grupos de animales en función del patrón de adquisición de la tarea: los que realizan muchas evitaciones ya en la segunda sesión (*rapid-avoiders*), los que van incrementando progresivamente el número de evitaciones (*modal-avoiders*), los que presentan una tasa de adquisición de la tarea muy lenta (*slow-avoiders*) y los que no llegan a adquirir la tarea de evitación (*non-avoiders*). Estos últimos, dada la nula adquisición de la tarea, se suelen eliminar en la mayoría de los estudios. Las diferencias en la adquisición de la tarea entre tandas podrían explicarse por la preponderancia de “*modal-avoiders*” y “*slow-avoiders*” en el segundo experimento. Respecto a la edad, estudios previos indican que entre el PND 28 y 51 se optimiza el aprendizaje de esta tarea en comparación con edades inferiores y superiores (Bauer 1978), aunque otros estudios muestran un incremento progresivo en la tasa de aprendizaje de la tarea desde la infancia a la edad adulta (Gruss et al. 2010; Spröwitz et al. 2013).

Además de estudiar la tasa de aprendizaje en el grupo CST, evaluamos en los tres grupos la adquisición de miedo condicionado al contexto (la caja lanzadera) durante los 5 min previos a cada sesión. La exposición a choques eléctricos genera miedo condicionado y, por lo tanto, petrificación (Fendt y Fanselow 1999; Daviu et al. 2010). En el presente trabajo no analizamos el tiempo de petrificación ni el número de alzamientos en los experimentos llevados a cabo con la cepa Sprague-Dawley, porque ya fueron analizados previamente en estudios de nuestro grupo, sin que se observaran diferencias entre los grupos CST y UST en ninguno de los dos parámetros estudiados (Sanchís-Ollé 2018). Con todo, sí que estudiamos las posibles diferencias en el número de cruzamientos durante el período de habituación. En las últimas sesiones del segundo experimento, los CST realizaron más cruzamientos que los UST, de acuerdo con nuestros datos previos (Sanchís-Ollé 2018), aunque las diferencias fueron pequeñas. Es posible que el número de

cruzamientos sea una medida complementaria algo más sensible del miedo condicionado al contexto que la petrificación o los alzamientos, aunque las diferencias entre los grupos CST y UST, en el caso de que sean detectables, son consistentemente de poca magnitud. Destacar que los tres grupos experimentales no difirieron en el número de cruzamientos durante la primera exposición a la caja lanzadera, como era de esperar al ser una medida previa al tratamiento.

Otra medida adicional que puede evaluarse en la caja lanzadera es el número de cruzamientos entre ensayos. Realizar cruzamientos durante el ITI en el grupo CST puede facilitar la realización de evitaciones y la adquisición de la tarea (Vicens-Costa et al. 2011; Galatzer-Levy et al. 2014). En este estudio, el número de cruzamientos durante el ITI se incrementó progresivamente de la primera a la última sesión en el grupo CST. En el UST se observó un patrón opuesto, siendo los cruzamientos de éstos superiores en la primera sesión, pero inferiores en las últimas sesiones. El comportamiento de los grupos fue parecido en ambos experimentos y al observado en estudios previos de nuestro laboratorio con animales adultos (Cordón-Morillas 2019). Si interpretamos los cruzamientos durante el ITI como una conducta de afrontamiento activo, el patrón observado en el grupo UST podría indicar el desarrollo de indefensión aprendida a medida que experimentan la falta de contingencia entre su conducta y la aparición de los choques. En cambio, en el grupo CST esta medida reflejaría la adquisición de la tarea y de la respuesta operante, ya que el número de evitaciones se incrementó en paralelo al de cruzamientos durante el ITI y de hecho ambos parámetros correlacionan positivamente a partir de la segunda sesión.

2. Consecuencias de la exposición a estrés controlable/incontrolable (Experimentos 1 y 2)

2.1. Consecuencias endocrinas

Estudios previos de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé et al. 2019) han mostrado que la respuesta hormonal del eje HPA (evaluada por los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona) no difería entre los dos grupos expuestos a estrés (CST y UST) en la primera sesión, pero sí en

la última, en la que dicha respuesta era menor en el grupo CST que en el UST. En el presente trabajo quisimos valorar si los niveles globales de corticosterona durante todo el período de exposición a estrés eran superiores en el grupo UST que en el CST. Para ello medimos los niveles de corticosterona acumulados en el pelo, que representarían una integración de toda la corticosterona liberada durante todo el periodo de exposición a choques en la caja lanzadera (Scorrano et al. 2015). Los niveles fueron superiores en ambos grupos respecto al grupo NS, como era de esperar de una situación de estrés crónico (Scorrano et al. 2015), pero no se observó efecto de la controlabilidad. Por tanto, podemos suponer que las posibles diferencias en la respuesta hormonal mediadas por la controlabilidad son relativamente pequeñas y no se reflejan en la acumulación global en el pelo a lo largo de las semanas de exposición a choques.

Datos previos en la literatura utilizando también la TWAA pero en ratas adultas indican que la exposición repetida a estrés incontrolable (UST), pero no a controlable (CST), incrementa los niveles basales de corticosterona al día siguiente a la última sesión (Lucas et al. 2014), lo que sugiere indirectamente un mayor impacto del estrés incontrolable, al menos en esta última sesión. Datos previos de nuestro grupo utilizando ratas adolescentes no mostraron diferencias en los niveles basales de ACTH o corticosterona ni a los tres días de la última sesión ni 60 días después (Sanchís-Ollé 2018), lo que no es extraño, dado que el incremento en los niveles basales de corticosterona tras estrés crónico de elevada intensidad desaparecen en pocos días, al menos en animales adultos en los que existen datos al respecto (Ottenweller et al. 1992; Servatius et al. 1994). En el presente estudio valoramos la actividad basal 8 días después de finalizar la exposición a la caja lanzadera, observando, tan solo en los sujetos UST, un incremento marginal en los niveles de ACTH, pero no de corticosterona.

Tras la exposición repetida a estímulos estresantes que rebasan un cierto nivel de intensidad, la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo estresante (heterotípico) puede estar sensibilizada (Belda et al. 2015). Por ello quisimos estudiar cómo la exposición repetida a choque eléctrico durante la adolescencia y la posibilidad de control sobre los

mismos afectaba a la sensibilización. En nuestro caso, estudiamos la respuesta endocrina a estímulos heterotípicos 4 y 5 días después de la última exposición a la caja lanzadera en el primer experimento y 8 días después en el segundo. En el primer experimento observamos sensibilización de la respuesta del eje HPA sólo en los animales UST, reflejada en los niveles de ACTH tras la exposición a un estímulo de baja intensidad (OF) y en los niveles de corticosterona tras la exposición a uno de moderada-alta intensidad (FST). Un aspecto a comentar es porqué observamos una sensibilización en la ACTH tras el OF y en la corticosterona tras la FST. En la primera prueba la duración fue de 10 min, periodo óptimo para detectar sensibilización heterotípica si se valoran los niveles de ACTH (Belda et al. 2016), pero no para que la respuesta de ACTH se refleje en la corticosterona cuyo máximo está sobre los 30 min (Armario 2006a). En cambio, la duración de la segunda prueba no era la apropiada para detectar sensibilización de la ACTH ya que ésta suele reducirse o desaparecer tras los 30 min de estrés (Belda et al. 2016), pero sí era óptima para que la corticosterona pudiera reflejar la sensibilización inicial de la ACTH.

Aunque en el primer experimento observamos sensibilización de la corticosterona en respuesta a la FST tan solo en el grupo UST, en el segundo experimento observamos una sensibilización de la respuesta al FST que afectó sobre todo a la ACTH (a la corticosterona solo modestamente en la fase pos-nado) y fue aparentemente similar en los grupos CST y UST. Dejando de lado la posible interferencia con los fármacos en el segundo experimento, es evidente que la sensibilización del eje HPA es moderada en magnitud y las diferencias entre los grupos CST y UST parecen ser siempre muy pequeñas, lo que puede explicar las inconsistencias. En estudios previos de nuestro laboratorio utilizando el mismo modelo (Sanchís-Ollé 2018) se ha observado sensibilización de la respuesta de la ACTH a la FST en los grupos CST y UST, y de la respuesta de la corticosterona tan solo en el grupo UST. Aunque hay algunas diferencias metodológicas entre uno y otro, quizás la más crítica sea la duración de la exposición a la FST (20 min y no 30 min como en el presente estudio), dado que la sensibilización se manifiesta más claramente con estímulos de corta duración. En cualquier caso, la poca magnitud de la sensibilización del eje HPA es esperable considerando

que ésta solo es observable tras una historia previa de estrés de elevada intensidad y es muy evidente en las primeras 48 h para ir desapareciendo a lo largo de los días (Belda et al. 2016).

Cuando los cambios son pequeños, como es el caso de la sensibilización en nuestras condiciones, la relación entre ACTH y corticosterona es más compleja debido a la clara diferencia en la dinámica temporal de respuesta entre ambas hormonas. No obstante, no podíamos descartar que el tratamiento previo hubiera dado lugar a diferencias en la respuesta de la adrenal a los niveles circulantes de ACTH. Se ha observado que tras la exposición a estrés repetido puede observarse una mayor respuesta de corticosterona a un estrés heterotípico que no está mediada por una sensibilización de la ACTH sino por un cambio en la respuesta máxima de la corteza adrenal (Armario et al. 1985; Armario et al. 1988b; Ulrich-Lai et al. 2006). Para estudiar esta posibilidad administramos ACTH a una dosis capaz de dar lugar a una respuesta máxima de la corteza adrenal (Armario et al. 1988b; Ulrich-Lai et al. 2006). También analizamos los niveles de ACTH tras la administración exógena para descartar posibles cambios en la metabolización de esta hormona. No observamos diferencias entre grupos en los niveles plasmáticos de ACTH y tampoco en los de corticosterona, lo que indica que la exposición repetida a choques no ha modificado la respuesta máxima de la corteza adrenal a la ACTH. Estos resultados sugieren que los cambios en la respuesta del eje HPA estarían mediados por procesos de sensibilización situados a nivel hipofisario o supra-hipofisario y no por cambios en la capacidad máxima de respuesta de la corteza adrenal. No obstante, existen múltiples evidencias de una modulación por el SNC de la sensibilidad de la corteza adrenal a los niveles circulantes de ACTH, mediada por la inervación simpática de la adrenal (Ulrich-Lai y Engeland 2000; Engeland y Arnhold 2005), fenómeno que ha sido poco investigado en situaciones de estrés crónico y podría contribuir a las divergencias en la respuesta de ambas hormonas.

Como se detalla en la introducción (apartado 5), otros estudios con diversos modelos de exposición a estrés adolescente han sido incapaces de detectar sensibilización del eje HPA en respuesta a estímulos estresantes heterotípicos (Jankord et al. 2011; Lui et al. 2012; Cotella et

al. 2019), exceptuando un estudio en el que las ratas fueron expuestas durante 21 días a 6 h diarias de inmovilización en tubo y la respuesta al nuevo estrés se estudió justo al día siguiente (Eiland et al. 2012). Incluso en este caso, tan solo se analizaron los niveles de corticosterona, lo que puede dar lugar a interpretaciones erróneas respecto a la sensibilización del eje HPA (ver Armario et al. 1985).

2.2. Consecuencias conductuales

En el presente estudio evaluamos el impacto de la exposición a estrés en varias pruebas conductuales: OF y FST en el experimento 1 e interacción social, FST e hiponeofagia en el experimento 2. Comentaremos los resultados en función del día pos-estrés en el que se han evaluado (haciendo siempre referencia al experimento en el que se estudiaron), excepto en el caso del FST en el que se han centrado gran parte de los estudios de la presente tesis y cuyos resultados se discutirán en último lugar.

Dos días después de finalizar la exposición a los choques, los animales del experimento 2 fueron evaluados durante 15 min en una prueba de interacción social. Nuestra hipótesis era que la exposición a choques incontrolables reduciría la interacción social mientras que la exposición a la TWAA no. Observamos que el tiempo de interacción social activa durante los primeros 5 min fue inferior en los sujetos UST respecto a los NS y CST. Estos datos están en la línea de los obtenidos previamente en nuestro grupo cuando se evaluó la conducta a los 35 días de la última exposición a estrés (Sanchís-Ollé 2018). En el estudio citado se observaron niveles superiores de conducta social activa en los CST, mientras que en los UST se incrementó la interacción social pasiva y se redujo la conducta de seguimiento. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en el laboratorio de Maier tras una sola sesión de estrés controlable o incontrolable, tanto en animales adolescentes (Kubala et al. 2012) como en adultos (Short y Maier 1993; Amat et al. 2010). Estudios previos con otros modelos de estrés crónico adolescente indican también un descenso de la interacción social o de la preferencia por el compartimento asociado a la presencia de congéneres (Varlinskaya et al. 2010; Aga-Mizrachi et al. 2014; Veenit et al. 2014; Tzanoulinou et al. 2014a).

Aunque se ha considerado clásicamente que una reducción de la interacción social está relacionada con un aumento en la ansiedad (File y Seth 2003), este fenotipo conductual puede también estar asociado a un descenso de la motivación para la interacción social, y podría ser un marcador de conductas asimilables a la depresión (Seiglie et al. 2015). En nuestro caso, las diferencias en la conducta de interacción social desaparecen a lo largo de la sesión (equiparándose al grupo NS), lo que sugiere que las diferencias vendrían mediadas por la ansiedad inicial en el ambiente nuevo, más que por falta de motivación para iniciar la interacción. Asimismo, datos previos de nuestro grupo (Sanchís-Ollé 2018) indican que no hay diferencias en el consumo de sacarina tras la exposición a este paradigma de estrés adolescente, por lo tanto, podríamos descartar que las causas de la reducción de la interacción social activa sea una falta generalizada de motivación por todo tipo de estímulos apetitivos.

En el experimento 1 evaluamos la conducta exploratoria en un OF a los 5 días de acabar la exposición al estrés. En animales adultos, el miedo condicionado generado por la administración de choques eléctricos se puede generalizar a otros contextos de unas características y configuración completamente diferentes a los de la adquisición (Radulovic et al. 1998; Daviu et al. 2010; 2014). Este proceso lo hemos denominado “*generalización cognitiva del miedo condicionado*”, reflejada en un descenso en la actividad exploratoria en ambientes nuevos, que se percibirían como potencialmente más peligrosos en los animales previamente expuestos a choques eléctricos en las patas. Dicho fenómeno es dependiente del desarrollo previo de medio condicionado a un contexto (Daviu et al. 2010; 2014) y aparece consistentemente cuando se utiliza el choque eléctrico en las patas como estímulo estresante (v.g. Van Dijken et al. 1992a; 1992b; Van den Berg et al. 1998; Bruijnzeel et al. 2001). Nuestra hipótesis de partida era que la exposición a choques eléctricos incontrolables induciría un descenso de la actividad en el OF y que la controlabilidad lo amortiguaría. Sin embargo, observamos una reducción de la actividad exploratoria, evaluada por la distancia recorrida, durante los primeros 5 min de exposición a un OF, pero no se detectó un efecto específico de la controlabilidad. No se observaron efectos del estrés en el número de alzamientos.

De acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio, también se ha observado reducción de la actividad exploratoria en un OF tras la exposición repetida a choques eléctricos inescapables durante la adolescencia (Aga-Mizrachi et al. 2014; Li et al. 2015; Lyttle et al. 2015; Kumamoto et al. 2018). Sin embargo, los resultados aquí presentados no son enteramente concordantes con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio utilizando el mismo diseño experimental que en el presente estudio. Sanchís-Ollé (2018) observó un descenso en el número de deambulaciones en el grupo UST respecto al NS, pero esta reducción no fue evidente el grupo CST, lo que sugería que la posibilidad de control reducía el impacto de los choques. También se observó, a diferencia del presente estudio, un descenso en el número de alzamientos que afectó por igual a los grupos CST y UST, aunque las diferencias entre los CST y los NS fueron solo marginalmente significativas. Parece existir un mayor impacto global de los choques en el estudio mencionado, con un efecto amortiguador parcial de la controlabilidad. Hay algunas diferencias entre el estudio previo de nuestro grupo y el presente, en el primer caso se utilizó la plancha con agujeros (*hole-board*) mientras que en el presente trabajo utilizamos un OF circular y varió ligeramente la edad de inicio y finalización de la exposición a choques. Sin embargo, es muy probable que otros factores, como las diferencias individuales entre tandas de animales en la ejecución de la tarea y en las consecuencias del estrés, hayan podido contribuir en mayor medida.

Para detectar si aún se mantenían efectos de la exposición a choques a más largo plazo, evaluamos la respuesta de los animales a la prueba de hiponeofagia 30 días después de finalizada la exposición a los choques. No observamos cambios en la latencia para iniciar el consumo de pellets o en el número de entradas a la placa con los pellets, que son las medidas más clásicas para detectar cambios en ansiedad (v.g. Bodnoff et al. 1988; 1989). No obstante, en los CST se redujo en los primeros 5 min la distancia recorrida en el centro, en tanto que en los UST la distancia recorrida en el centro solo se redujo marginalmente, pero la distancia en la periferia se redujo significativamente. El descenso en actividad podría deberse a la “*generalización cognitiva de miedo condicionado al contexto*” ya comentada. Que los efectos perduren en el tiempo no es sorprendente ya que, un solo choque eléctrico provoca cambios duraderos en

hipoactividad en distintos tipos de campos abiertos (Daviu et al. 2010). El hecho de que los efectos sean más potentes en el grupo UST que en el CST va en línea con la idea de que la posibilidad de control podría reducir esta generalización, observándose mejor las diferencias entre ambos grupos cuando ya el impacto se ha amortiguado con el tiempo.

La idea subyacente al uso de la FST era que la posibilidad de control durante la exposición a choques podría favorecer la conducta de afrontamiento activo frente a nuevas situaciones de estrés como el nado forzado, mientras la ausencia de control tendría el efecto opuesto. La prueba se llevó a cabo 4 días después de finalizar la exposición a choques en el primer experimento y 8 días después en el segundo. En el primer experimento observamos un incremento en el uso de estrategias de afrontamiento activo en los dos grupos expuestos a choques eléctricos, independientemente de la controlabilidad. Sin embargo, en el experimento 2 no se observaron diferencias entre grupos. En trabajos previos de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé 2018) tan solo se observó un incremento en la latencia a adoptar inmovilidad en el grupo CST (un aspecto menor), sin cambios en el resto de los parámetros. En nuestros dos experimentos no hemos observado diferencias entre grupos en la latencia a adoptar inmovilidad (datos no mostrados).

Estudios previos indican que una sola sesión de choques eléctricos en las patas en animales jóvenes (PND29 o 30) no parece afectar a la conducta en la FST en la adultez (Lovelock y Deak 2019); en cambio, la exposición repetida durante la adolescencia favorece las estrategias de afrontamiento pasivas en esta prueba una vez alcanzada la edad adulta (Lyttle et al. 2015). Un factor a tener en cuenta es la configuración del contexto en el cual los sujetos recibieron el choque eléctrico. En nuestro caso, a diferencia de los métodos estándar de exposición a choques eléctricos en las patas, el animal no está recluido en un compartimento durante los choques sino que puede cruzar de uno a otro y esto podría tener consecuencias sobre los efectos de la exposición a los choques, reduciendo su impacto.

En animales adultos, los resultados son también contradictorios. Usando el modelo TWAA, la posibilidad de controlar el choque eléctrico (CST) incrementa el uso de estrategias de afrontamiento activo

en el CST pero las reduce en el UST (Lucas et al. 2014). En contraposición, y en claro contraste con la teoría de la indefensión aprendida, una exposición aguda de ratas adultas a choques en la cola incrementó el afrontamiento activo frente a una inmovilización en tubo en los animales que no podían escapar de los choques, pero no tuvo efecto alguno en los que sí podían escapar (Weinberg et al. 2010). Los autores interpretan el efecto como un signo de sensibilización conductual en los animales previamente expuestos a choques inescapables pero no en los expuestos a choques escapables, a pesar de una similar sensibilización del eje HPA en los dos grupos. Aunque los pocos estudios existentes dificultan generar hipótesis, el impacto de la experiencia previa de control sobre el desarrollo de estrategias de afrontamiento en nuevas situaciones podría depender tanto de las características de las situaciones aversivas previas como de las de la nueva situación. La posibilidad de una mayor sensibilización conductual como explicación alternativa al concepto de indefensión aprendida merece ser tomada en cuenta.

Por otro lado, el incremento en la conducta de escape se ha asociado con un estilo de afrontamiento activo, sin que este hecho tenga en sí mismo connotaciones siempre positivas. Un incremento en las conductas de escape por la exposición previa a estrés podría indicar una exacerbación de las conductas perseverantes. De hecho, datos previos de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé et al. 2019) indican que la exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia favorece las conductas perseverantes en un paradigma de aprendizaje (*probabilistic reversal learning*). En cualquier caso, la interpretación clásica de esta prueba indicaría un incremento, al menos bajo ciertas condiciones, en el uso de estrategias de afrontamiento activo. El origen de las inconsistencias en nuestros estudios y entre estudios, más allá de la existencia de diferencias individuales, se desconoce y es complejo de investigar dada la simplicidad de la prueba, en lo concerniente al contexto (tanque) que no permite elaborar estrategias alternativas, por lo que el repertorio conductual es muy limitado.

2.3. Consecuencias sobre el SNC

En el primer experimento, estudiamos cómo la historia previa de estrés había afectado de forma diferencial a la expresión basal de IEGs en áreas críticas del SNC. Para ello, valoramos a corto (4 días) y a largo plazo (30 días) la expresión de Δ FosB y Arc.

Activación del SNC durante la exposición a estrés adolescente: Δ FosB

A diferencia de la mayoría de proteínas de la familia Fos que se expresan y degradan rápidamente, la proteína Δ FosB es muy estable en el tiempo y se va acumulando con exposiciones repetidas a estímulos como drogas y estrés (Hope et al. 1994; Nestler 2001; 2015). Esta estabilidad podría deberse a la ausencia de dos dominios de degradación en la región C-terminal de Δ FosB, dominio que sí está presente en el resto de proteínas de la familia Fos, incluido el FosB (Carle et al. 2007). La valoración del número de neuronas Δ FosB positivas podría permitir identificar poblaciones neuronales y áreas en las que ha habido una activación diferencial en función de la posibilidad de control sobre el estrés. La cuantificación de Δ FosB se llevó cabo mediante IHQ.

De todas las áreas estudiadas (Cg1, PrL, IL, DMS, VMS, NAcC, NAcSh, NAcSh Vertex, y LSv), solo encontramos diferencias significativas en el LSv donde a corto plazo ambos grupos expuestos a choques (CST y US) incrementaron el número de neuronas Δ FosB positivas. A largo plazo no se observó ninguna diferencia entre grupos.

Estos resultados son consonantes con datos previos de nuestro laboratorio (Pastor-Ciurana 2019) en los que se ha observado que la exposición de ratas adultas a 9 días de IMO crónica solo incrementó, tres días después de finalizar la exposición, el número de células Δ FosB positivas en NAcC, LSv y PVNmpd, sin efecto alguno en la mayoría de las áreas estudiadas. En cambio, tras la exposición a CUS la mayoría de las estructuras investigadas mostraban un incremento en la expresión de Δ FosB. En esta misma línea se sitúan los resultados de Flak y colaboradores (2012), quienes encontraron que los niveles de Δ FosB se incrementaban en numerosas áreas tras 14 días de exposición a CUS, pero no tras los mismos días de exposición a inmovilización en tubo, donde solo se observó incremento en el giro dentado y en el DMH. Estos

resultados sugieren que la exposición repetida a un estímulo homotípico provoca una menor activación del SNC que la exposición a CUS, con la consiguiente reducción en la acumulación de Δ FosB. La única excepción a este patrón es el trabajo de Perrotti y colaboradores (2004) que sí observaron acumulación de Δ FosB en muchas áreas del SNC tras la exposición repetida a inmovilización en tubo. Aun así, no encontraron diferencias entre los niveles acumulados en cinco días respecto a 10 días de exposición, lo que sugeriría que durante estos últimos cinco días la acumulación de proteína nueva fue muy baja. De hecho, Stamp y Herbert (1999), aunque no evaluaron Δ FosB, observaron una adaptación generalizada de la respuesta de *c-fos* y de FosB en diferentes áreas del SNC tras la exposición repetida a inmovilización en tubo, con la salvedad del LSv donde la adaptación fue solo parcial. Esta menor adaptación del LSv explicaría por qué se encuentra incremento de la expresión de Δ FosB de forma consistente tras exposición repetida a los mismos estímulos estresantes en la casi totalidad de los estudios en animales adultos y también por qué es la única área donde se han observado diferencias en el presente estudio.

Otro factor que podría contribuir a eliminar las diferencias entre grupos es el protocolo utilizado. En nuestro caso, el grupo NS, aunque no recibió choque eléctrico, sí se expuso a la caja lanzadera, a la luz y al sonido y por lo tanto experimentó un cierto nivel de estrés. Este hecho es importante puesto que la mayoría de áreas estudiadas, con la excepción del LSv, no muestran un patrón de expresión de *c-fos* acorde a la intensidad del estímulo estresante, evaluada por los niveles plasmáticos de ACTH (Úbeda-Contreras et al. 2018). De hecho, usando distintos marcadores de activación neuronal no hay diferencias entre un OF y una IMO en la respuesta de la mPFC y el estriado (Ons et al. 2004; Rotllant et al. 2013; Úbeda-Contreras et al. 2018). Apoyando esta posibilidad, en un estudio de estrés crónico en rata en el que evaluaban Δ FosB, la derrota social incrementaba los niveles de la proteína en diversas áreas cuando se comparaban con el grupo que no recibió ningún tipo de manipulación, permaneciendo siempre en sus jaulas, mientras que si se comparaban con un grupo que recibían el mismo nivel de manipulación exceptuando la exposición al animal agresivo, las diferencias solo aparecían en la IL (Hinwood et al. 2011). Por

consiguiente, el grupo NS podría experimentar una acumulación de Δ FosB fruto de la manipulación y la exposición a la caja lanzadera.

En general la variabilidad dentro de un mismo grupo fue muy elevada en cuanto al número de neuronas Δ FosB positivas, lo que dificultó la posibilidad de observar diferencias estadísticamente significativas. La expresión de Δ FosB podría ser sensible a las diferencias individuales en la susceptibilidad a las consecuencias de la exposición al estrés. Lobo y colaboradores (2013) observaron, tras la exposición a derrota social, una mayor acumulación de esta proteína en neuronas D1 del estriado en animales resilientes, mientras que en los vulnerables se acumulaban en las D2. Por consiguiente, las diferencias individuales podrían afectar al número de neuronas positivas en áreas concretas y al fenotipo particular de las neuronas.

Finalmente, se observó, independientemente del grupo, un descenso en el número de células Δ FosB positivas a largo plazo respecto a los niveles a corto plazo, con la excepción del DMS, el VMS y el NAcC. Esto podría explicarse por el mantenimiento de los animales durante un largo periodo sin exposición a ningún tipo de situación estresante. A pesar de que el Δ FosB tiene una vida media más larga que el resto de las proteínas de la familia Fos, no se ha detectado acumulación más allá de 14 días después de la última exposición a estrés ni en la mPFC ni en el estriado (Nikulina et al. 2008). No obstante, tampoco podemos descartar una influencia de la edad, dado que no hay ningún estudio al respecto.

Actividad constitutiva del SNC: Arc

Para evaluar de forma complementaria cómo el estrés crónico adolescente podía afectar a la funcionalidad del SNC, evaluamos en condiciones basales la expresión del IEG *Arc*, que a diferencia de otros IEGs (v.g. *c-fos*) muestra niveles notables de expresión constitutiva (Link et al. 1995; Lyford et al. 1995; Ons et al. 2004). El IEG *Arc* no es un factor de transcripción, sino que codifica una proteína asociada al citoesqueleto que responde a diferentes vías de señalización neuronal y es clave para el funcionamiento sináptico (Shepherd y Bear 2011). El mRNA de *Arc* se expresa rápidamente cuando hay actividad neuronal, y es transportado a las dendritas una vez sintetizado (Steward y Worley 2002). Su activación está asociada a procesos de plasticidad sináptica y

aprendizaje, especialmente a la potenciación a largo plazo, aunque también está vinculada a la depresión a largo plazo (Bramham et al. 2010). De hecho, los ratones “*knock out*” para *Arc* (*Arc*^{-/-}) presentan déficits de memoria a largo plazo (entre ellos miedo condicionado al tono y al contexto), sin problemas en la adquisición a corto plazo (Plath et al. 2006), y este déficit se refleja en la depresión sináptica a largo plazo.

En nuestro caso, observamos un descenso generalizado de la expresión de *Arc* a corto plazo en la mPFC del grupo CST, y la misma tendencia, aunque no significativa en el UST. En cambio, en las diferentes subdivisiones del estriado, salvo en el DMS, ambos grupos de estrés (CST y UST) mostraron niveles inferiores que el grupo NS. Por otro lado, los resultados en el estriado indicaron una reducción de la expresión de *Arc* más marcada en el estriado lateral que en el medial. Todas estas diferencias entre grupos desaparecieron a largo plazo.

Estudios previos en adultos también han observado una reducción en la expresión constitutiva de *Arc* tras exposición a estrés crónico. La exposición repetida a derrota social (5 días de enfrentamiento seguido de exposición al agresor a través de una barrera) reduce la expresión de *Arc* en la mPFC en los ratones susceptibles, pero no en los resilientes, cuando son clasificados en función de la evitación en la prueba de IS (Covington et al. 2010). Esta reducción de *Arc* en la mPFC también se ha observado en ratones tras la exposición a 6 semanas de CUS (Elizalde et al. 2010) o 28 días de aislamiento social (Ieraci et al. 2016). Sin embargo, otros autores no han encontrado cambios en ratas tras 12 días de exposición a IMO (Ons et al. 2010) o 2 semanas de CUS (Jett et al. 2017) o tras 3 semanas de CUS en ratón (Jaggar et al. 2017). El impacto del estrés crónico sobre la expresión de *Arc* parece depender del área telencefálica concreta dado que se han observado incrementos en la expresión basal en la HF (Bouille et al. 2014; Pacheco et al. 2017) y tras administración crónica de corticosterona en la amígdala lateral (Monsey et al. 2014).

La exposición a estrés crónico reduce la complejidad dendrítica en la mPFC (McEwen et al. 2016) y en la parte medial del estriado, en contraposición al incremento observado en la parte dorsolateral del estriado (Dias-Ferreira et al. 2009). Esta reducción de la complejidad

dendrítica tras la exposición a estrés crónico podría justificar el descenso en la actividad basal de *Arc* en el mPFC. Sin embargo, no existe un paralelismo similar entre expresión de *Arc* y cambios en la arborización dendrítica en el estriado, dado que la reducción en la actividad de *Arc* fue más marcada en el estriado lateral, que en el medial, al contrario de lo que ocurrió con la arborización dendrítica en el estudio de Dias-Ferreira y colaboradores. En cualquier caso, el patrón observado a corto plazo no se observó en el grupo estudiado a largo plazo, indicando la transitoriedad del efecto.

El cambio en la expresión constitutiva de *Arc*, especialmente el hecho de que afectara sobre todo al grupo CST nos resultó sorprendente. Aunque no existen precedentes en la literatura al respecto, lo que dificulta la discusión de los datos, sí decidimos estudiar si el impacto de la exposición previa a CST afectaba de manera similar a otros IEG de expresión constitutiva como es *zif268* (Worley et al. 1991; MacGibbon et al. 1995; Ishida et al. 2000). Con este IEG no se detectaron diferencias entre los grupos experimentales en la mPFC ni a corto ni a largo plazo (datos no mostrados). Por consiguiente, el descenso en la expresión constitutiva de *Arc* no parece deberse a un cambio en la actividad tónica de las neuronas, sino a modificaciones que afectan específicamente a *Arc*.

Independientemente de los posibles mecanismos y consecuencias de los cambios en la expresión tónica de *Arc* en mPFC, era importante estudiar si el déficit de expresión se limitaba a la actividad constitutiva o también afectaba a la respuesta de *Arc* a un estrés agudo.

Activación del SNC en respuesta a un estímulo heterotípico

Se utilizó *c-fos* como marcador clásico de activación neuronal, pero al estudio de la expresión de *c-fos* se añadió el de la expresión de *Arc* por las razones anteriormente expuestas. Evaluamos la respuesta del SNC a FST 4 días después de finalizar la exposición a los choques, en los mismos animales en los que se evaluó la conducta.

Los niveles de *c-fos* no difirieron entre grupos en ninguna de las áreas estudiadas (mPFC, DMS, LSv y PVNmpd), lo que indica que no ha habido ni adaptación cruzada ni sensibilización frente a nuevos

estímulos estresantes. Respecto a *Arc*, el patrón resultante fue distinto al observado en condiciones basales. En la *Cg1* y en las cuatro subdivisiones del estriado estudiadas, los niveles de *Arc* estaban más elevados en el grupo UST que en los otros dos grupos. En cambio, no se observaron diferencias entre los grupos CST y NS. Estos últimos resultados indican una clara disociación entre la actividad constitutiva de *Arc* y su expresión tras la exposición a un estímulo estresante, aunque desconocemos la razón de esta disociación. Parece evidente que existen diferencias en función de la controlabilidad cuyo alcance está por establecer. La expresión de *Arc* en corteza frontal y HF, parece depender en gran medida de la activación de los receptores NMDA de glutamato (Steward y Worley 2001; Ren et al. 2014), cuya liberación parece venir determinada fundamentalmente por la actividad neuronal en mPFC tanto en condiciones basales como en respuesta a estrés (Moghaddam 1993; Hascup et al. 2010). Sin embargo, no conocemos como el estrés crónico altera la liberación basal o inducida por el estrés de glutamato ya que hay un solo estudio cuyos datos son difíciles de interpretar (Jett et al. 2017) y es, como los anteriores, en animales adultos.

Los datos en la literatura referentes a la expresión de IEG en respuesta a estímulos heterotípicos son contradictorios. Mientras algunos estudios indican que la exposición a estrés crónico incrementa la expresión de IEG en ciertas áreas tras la exposición a la inmovilización en tubo (Bhatnagar y Dallman 1998; Weinberg et al. 2009; Elizalde et al. 2010), otros estudios indican que la expresión está amortiguada (Chung et al. 1999; Singewald et al. 2009; Ostrander et al. 2009; Radley y Sawchenko 2015). No obstante, si nos centramos en la expresión de Fos en la mPFC y en las distintas divisiones del estriado dorsal y ventral, la respuesta de la mPFC y el NAc a la inmovilización en tubo no se ve modificada tras exposición previa durante 7 días (4 h/día) al frío (Bhatnagar y Dallman 1998). Tampoco la respuesta de la mPFC a la derrota social tras 10 días de inmovilización en tubo (Chung et al. 1999), ni la de mPFC o el NAc a la exposición a los brazos abiertos de un EPM tras 17 días de subordinación crónica (Singewald et al. 2009). Sin embargo, la exposición a 7 días de CUS da lugar a una reducción de la expresión de *c-fos* en la PrL en respuesta a un EPM (Ostrander et al. 2009), y la

exposición a 14 días de olor de hurón incrementa la respuesta (*c-fos*) de la mPFC a la inmovilización en tubo (Weinberg et al. 2009).

Tan solo hemos detectado un trabajo en el que se estudie la expresión basal y la inducida por un estímulo estresante agudo en animales con una historia previa de estrés (Elizalde et al. 2010). Los autores observaron en ratones expuestos a 6 semanas de CUS un descenso en la expresión basal de *Arc* en mPFC pero no en HF. Aunque la respuesta a un ambiente nuevo se mantuvo, expresada en porcentaje del basal respectivo (lo que sugiere una menor respuesta en valor absoluto), la respuesta de la HF se redujo tras el CUS.

Expresión de c-fos en neuronas D2+ del estriado

El sistema dopaminérgico es susceptible a la exposición a estrés y a glucocorticoides durante los periodos críticos del desarrollo (Rodrigues et al. 2011). Estrés y glucocorticoides podrían modular los profundos cambios madurativos de esta etapa en el sistema dopaminérgico (Brenhouse y Andersen 2011; Sinclair et al. 2014). Asimismo, en animales adultos la actividad dopaminérgica en el estriado está implicada en el desempeño de la TWAA (McCullough et al. 1993; Darvas et al. 2011) siendo posible que ocurra igual en animales jóvenes. Por todo ello, quisimos estudiar si la historia previa de exposición a choques (controlables o no) era capaz de modificar el patrón de activación (*c-fos*) de los dos tipos principales de neuronas del estriado tras la exposición a la FST. Para ello realizamos una doble FISH para detectar la expresión de *c-fos* y del receptor D2 en las neuronas del estriado dorsal y el NAc. En concreto estudiamos las tres subdivisiones del estriado dorsal en las que se observaba expresión de *c-fos* (dorsolateral, dorsomedial y ventromedial) y las dos subdivisiones del NAc (*Core* y *Shell*).

Si nos limitamos al número de neuronas *c-fos* positivas, no se observaron cambios como consecuencia de la historia previa de estrés en ninguna de las subdivisiones estudiadas. Los resultados del doble marcaje indican, en línea con lo observado previamente en nuestro laboratorio (Ortega-Sánchez 2018), que la mayoría de las neuronas que expresan *c-fos* en respuesta a la FST en las regiones estriatales son D2 positivas, aunque también se activa un número relevante de neuronas

D2 negativas, y por tanto presumiblemente D1 positivas. Estos resultados están en la misma línea de estudios previos que han observado activación en ambas poblaciones en el estriado tras la exposición a un OF (Badiani et al. 1999; Uslaner et al. 2001), siendo mayoritaria en las neuronas D2 positivas tras la exposición a choque eléctrico incontrolable (Clark et al. 2014). Respecto a la influencia de la historia previa de estrés crónico, en DMS el número de neuronas D1 positivas activadas fue estadísticamente superior en el grupo CST respecto al grupo NS, aunque la tendencia fue similar en el grupo UST. Un patrón similar se observó en el VMS, aunque en este caso la estadística mostró efecto significativo en el grupo UST y solo marginal en el CST. Ni en el DSL ni en las dos subdivisiones del NAc se detectaron diferencias en función del estrés crónico previo.

Puesto que la activación D2 favorecería el circuito indirecto, y por lo tanto la inmovilidad, y la activación D1 la actividad, es posible que tras la exposición prolongada al nado (15-30 min), etapa en la que predomina claramente la inmovilidad, se vayan activando más las neuronas D2 que las D1. De hecho, los psicoestimulantes, como la anfetamina, que actúan sobre todo sobre las neuronas D1 (Badiani et al. 1999), incrementan en paralelo la actividad en la FST (Porsolt et al. 1977; Duncan et al. 1985; Gómez-Román et al. 2016). Datos de nuestro laboratorio (Ortega-Sánchez 2018), indican igualmente un incremento en la actividad en la FST por la administración de anfetaminas que está asociado a una mayor activación de las D1. El cambio positivo en el balance de activación D1/D2 en la parte medial del estriado (DMS y VMS) en los animales expuestos a estrés adolescente podría estar vinculado con el cambio en la respuesta conductual (incremento en la conducta de escape) observado en esta prueba en los mismos animales en los que se ha llevado a cabo el estudio histológico.

Aunque datos previos de nuestro laboratorio indicaban que la exposición a estrés incontrolable durante la adolescencia incrementa moderadamente el número total de neuronas D2 positivas en el DMS (Sanchís-Ollé et al. 2019), este efecto no se ha replicado en el presente estudio. No obstante, el efecto citado fue pequeño y el marcaje

histológico diferente (ISH cromógena en lugar de fluorescente), lo que podría explicar la ausencia de efecto en el presente estudio.

2.4. Administración de antagonistas dopaminérgicos

Puesto que los datos histológicos en estriado indicaban una alteración en activación de la población de neuronas presumiblemente D1 tras la exposición a la FST en animales con una historia previa de estrés crónico, decidimos llevar a cabo estudios farmacológicos en el experimento 2. El objetivo era conocer hasta qué punto el estrés crónico adolescente había alterado funcionalmente el balance entre las poblaciones D1 y D2, utilizando dos antagonistas dopaminérgicos, uno selectivo de D1 (SCH23390) y otro de D2 (Eticlopride), administrados sistémicamente.

Antes de evaluar el impacto sobre animales expuestos a estrés adolescente, estudiamos si la dosis escogida (0,025 mg/kg de ambos) eran suficientes para alterar la conducta en la FST en animales adultos sin ningún tratamiento previo de estrés. También estudiamos si los fármacos modificaban la respuesta del eje HPA. Ambos antagonistas redujeron la conducta activa e incrementaron la pasiva durante la prueba, aunque los efectos fueron más marcados en los animales administrados con el antagonista D2. Las dosis utilizadas no alteraron esencialmente la respuesta de la ACTH ni la de corticosterona a la FST. No obstante, en condiciones basales el antagonista D2 incrementó los niveles de ACTH y corticosterona a los 45 y a los 75 min (tiempos correspondientes a las tomas de muestra después del nado R0 y R30) de su administración (datos no publicados). Estudios previos de nuestro laboratorio (Belda y Armario 2009) también han observado un incremento en la actividad del eje HPA tras la administración en condiciones basales de Eticlopride, pero no de SCH23390, aunque las dosis utilizadas por Belda y Armario (2009) fueron muy superiores a las utilizadas en este trabajo. Además, ambos antagonistas aceleraron la recuperación del eje HPA (evaluada por los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona) una vez finalizada la exposición a la IMO, que es un estímulo de elevada intensidad. La implicación del sistema dopaminérgico en la respuesta del eje HPA a situaciones de estrés es aún

un tema controvertido, como repasamos en el apartado 3 de la introducción.

Una vez comprobado que las dosis de antagonistas seleccionadas eran suficientes para provocar cambios en el patrón conductual en la FST, evaluamos en el experimento 2 el efecto de los fármacos en animales con historia previa de estrés adolescente expuestos 8 días después de la última sesión de estrés adolescente a la FST.

Observamos que en el grupo NS la administración de los antagonistas dopaminérgicos reducía la conducta activa durante los primeros 5 min, pero solo el antagonista D2 dio lugar a cambios significativos. Por consiguiente, los efectos fueron claramente inferiores a los observados en los sujetos adultos del experimento piloto anterior. Es difícil encontrar una explicación clara, pero debemos tener presente que la historia previa de los animales del grupo NS es distinta a los del experimento piloto. A pesar de no haber sido expuestos a choque eléctrico, los animales sí fueron expuestos de forma repetida a la caja lanzadera, al tono y a la luz, así como a la prueba de IS 6 días antes de la evaluación del efecto de los fármacos. Aunque estas manipulaciones son de baja intensidad, representan una estimulación superior a la recibida por las ratas del estudio previo, las cuales permanecieron en su caja de estabulación sin más manipulaciones que las correspondientes al mantenimiento y la habituación a los procedimientos experimentales una semana antes del día de la prueba.

La estimulación recibida podría interpretarse como enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental incrementa el uso de conductas activas respecto a animales criados en condiciones estándar (Brenes Sáenz et al. 2006; Mosaféri et al. 2015; Arndt et al. 2015). Asimismo, reduce el incremento en la liberación de DA en la mPFC tras la exposición a inmovilización en tubo respecto a animales estabulados individualmente (Garrido et al. 2013). Estos datos indican que una estimulación superior a la estándar puede alterar la conducta en la FST y la liberación de DA en la mPFC tras la exposición a estrés, lo que podría explicar el cambio en el efecto de los fármacos.

Al margen de los posibles cambios originados por las condiciones previas a la FST, los estudios utilizando antagonistas dopaminérgicos

no son siempre consistentes respecto a las consecuencias conductuales en la FST. El protocolo original de la FST en ratas incluía dos exposiciones (pre-test de 15 min y test de 5 min al día siguiente) y era en la segunda en la que se evaluaban los efectos de los tratamientos antidepresivos que se administraban entre el pre-test y el test (Porsolt et al. 1977). En la segunda exposición la conducta ampliamente predominante en los animales no tratados farmacológicamente es la inmovilidad y en estas condiciones es muy difícil incrementar más la inmovilidad farmacológicamente. Por ello no es sorprendente que en la mayoría de los estudios los antagonistas D1 o D2 no hayan tenido efecto (Borsini et al. 1981; 1984; 1985; Berettera et al. 1986; Evangelista et al. 1987). Sin embargo, cuando la conducta activa de los animales es potenciada por la administración de antidepresivos, entonces el bloqueo dopaminérgico con antagonistas D1 o D2 sí es capaz de incrementar las conductas pasivas (Borsini et al. 1981; 1984; 1985; Berettera et al. 1986; Evangelista et al. 1987). No obstante, los pocos estudios en los que analizan los efectos sobre la conducta en la primera exposición, observan un incremento en la inmovilidad provocado por la administración de antagonistas D1 y D2 (D'Aquila y Galistu 2012; 2019), en línea con lo observado en nuestros experimentos.

En los grupos expuestos a estrés encontramos cambios interesantes en la respuesta a los antagonistas respecto a los observados en el grupo NS. En los animales expuestos a estrés controlable el antagonista D1 no tuvo efecto alguno (ni siquiera tendencia), mientras que el antagonista D2 no redujo el tiempo de escape como ocurría en el grupo NS sino la conducta de nado, con el consiguiente incremento en la inmovilidad. Parece que el bloqueo D2 en el grupo CST mantiene las conductas activas más intensas pero reduce las activas menos intensas (nado), en tanto que en el grupo NS la más afectada es el escape. El efecto es sutil pero interesante. En cambio, en los animales expuestos a estrés incontrolable (UST) el bloqueo D1 reduce el escape y el bloqueo D2 reduce tanto el escape como el nado (con el consiguiente incremento en la inmovilidad). Por consiguiente, parece potenciarse en el grupo UST el control dopaminérgico tras la conducta en la FST. Estos resultados sugieren un cambio en el funcionamiento del sistema dopaminérgico

mediado por la exposición a estrés durante la adolescencia, que sería modulado por la controlabilidad.

Además de las alteraciones en respuesta a fármacos y drogas, se han observado otros cambios en el sistema dopaminérgico producidos por la exposición a estrés adolescente. Datos previos de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé et al. 2019) han observado un incremento en el número de receptores D2 en el DMS en animales expuestos a estrés incontrolable, pero no a controlable. Asimismo, se ha observado una reducción en el número de receptores D2 en la mPFC tras la exposición repetida a olor de predador (Wright et al. 2008). También se ha observado hipoactividad dopaminérgica en la mPFC tras la exposición a derrota social durante la adolescencia (Watt et al. 2009; 2014) y un incremento en la expresión de transportador de DA en esta área (Novick et al. 2011). A nivel más funcional, estudios previos han observado cambios en la respuesta locomotora a la administración de amfetamina en animales expuestos a distintas situaciones de estrés crónico durante la adolescencia como la inestabilidad social (Mathews et al. 2008b), la inmovilización en tubo (Cruz et al. 2012b) y la derrota social (Burke et al. 2013)

Respecto a la respuesta hormonal al FST se observó una sensibilización de la respuesta inicial de la ACTH en los grupos CST y UST respecto al NS, sin diferencias entre los dos grupos de estrés. Los fármacos tampoco afectaron a la respuesta de la ACTH. A pesar de la sensibilización observada con la ACTH, la exposición previa a choques no afectó a los niveles de corticosterona aunque los dos grupos de estrés crónico mostraron una tendencia a tener niveles algo más elevados en la fase de recuperación. En dicha fase, respecto a la corticosterona se observó algún efecto de los fármacos en interacción con el tratamiento previo de estrés crónico que es difícil de interpretar sin datos adicionales. Recordemos que no se observó efecto de los fármacos en la respuesta a la FST en el estudio piloto.

En conjunto, aunque los datos histológicos y farmacológicos apuntan a que los receptores D1 y en mayor medida los D2 pueden ser relevantes para la respuesta conductual a la FST, los resultados no son consistentes respecto a la importancia cuantitativa. Ambas aproximaciones adolecen

de limitaciones. La histológica se limita a cuantificar la expresión de *c-fos* en un número limitado de áreas, lo que impide conocer su expresión en la totalidad de áreas relacionadas con el sistema dopaminérgico. Además, hemos de tener presente que los resultados obtenidos en la doble FISH reflejan las neuronas activadas a lo largo de la sesión, pero es en los minutos iniciales donde predomina la conducta activa. Por consiguiente, la predominancia de neuronas D2 positivas puede deberse a que a lo largo de la sesión predomina la conducta de inmovilidad y esta es regulada por las neuronas D2 positivas del estriado. La farmacológica provoca un efecto general que impide saber qué áreas en concreto serían claves en la mediación de los efectos encontrados. Por otro lado, la organización de los circuitos D1 y D2 es diferente en el estriado y el NAc (Soares-Cunha et al. 2016a). Mientras que en el estriado estarían claramente segregadas por los circuitos directo (D1) e indirecto (D2), en el NAc el circuito indirecto parece incluir ambas poblaciones de neuronas. Por consiguiente, las neuronas presumiblemente D1 positivas activadas tras la FST en el NAc podrían afectar tanto al circuito directo como al indirecto.

Tampoco hemos podido abordar en el presente estudio el tema de las diferencias individuales, dada la complejidad del diseño. No obstante, existen datos que implican a las áreas asociadas a la función dopaminérgica en la susceptibilidad diferencial al estrés. En un estudio de estrés crónico por derrota social en ratones, los animales resilientes tenían mayor concentración de Δ FosB en las neuronas D1 positivas del estriado dorsal y el NAc mientras que los susceptibles la tenían en las neuronas D2 positivas (Lobo et al. 2013). Otros estudios apuntan en la misma línea, implicando a las neuronas D1 en la resiliencia y las D2 en la susceptibilidad (Khibnik et al. 2016; Hamilton et al. 2018; Muir et al. 2018).

En resumen, los datos obtenidos en este estudio indican que la exposición a estrés adolescente podría alterar el proceso de maduración del sistema dopaminérgico y algunos de estos efectos podrían ser sensible a la controlabilidad.

3. Estrés adolescente controlable/ incontrolable en ratas de la cepa *Long- Evans* (Experimento 3)

3.1. Caja lanzadera y la TWAA

Los resultados obtenidos hasta ahora en el estudio de la exposición repetida a estrés controlable/incontrolable en ratas de la cepa *Sprague-Dawley* indican que el impacto global no es ni robusto ni consistente. Puesto que se ha demostrado repetidamente la importancia de la cepa utilizada en el impacto del estrés, incluyendo los cambios en el eje HPA (v.g. Gómez et al. 1996; Dhabhar et al. 1997), decidimos estudiar nuestro paradigma de estrés controlable adolescente en ratas de la cepa *Long-Evans*. Datos no publicados de nuestro laboratorio (Sanchís-Ollé en preparación) y otros (comentado en Herman y Mueller 2006) indican que las ratas *Long-Evans* presentan mayores niveles basales de corticosterona en algunas fases del ritmo circadiano que las de la cepa *Sprague-Dawley* y sobre todo en respuesta a estímulos estresantes. A nivel conductual tienen más tendencia a adoptar conductas pasivas en la FST (Sanchís-Ollé, en preparación), aunque muestran más conductas exploratorias, especialmente alzamientos, en ambientes nuevos (Padilla et al. 2009; Turner y Burne 2014). En cambio, las *Long-Evans* son más susceptibles a desarrollar indefensión aprendida (Padilla et al. 2009) y muestran más tasa de petrificación en la reexposición al contexto donde recibieron choque eléctrico (Chang y Maren 2010), lo que sugiere una susceptibilidad especial a las consecuencias de la exposición a choques eléctricos y al condicionamiento del miedo. Sin embargo, no parece haber diferencias entre cepas en las consecuencias de la exposición a CUS (Bielajew et al. 2002; Konkle et al. 2003), salvo un incremento en la inmovilidad más marcado en las *Long-Evans* durante la segunda exposición a la FST (Bielajew et al. 2003).

Al cambiar de cepa, observamos ya inicialmente una menor tasa de aprendizaje de la TWAA respecto a las *Sprague-Dawley*. En estas últimas, los estudios previos indicaban que el porcentaje de evitaciones en las últimas sesiones se situaba en torno al 60-70 % del número total de ensayos (Ilin y Richter-Levin 2009b; Lucas et al. 2014; Sanchís-Ollé et al. 2019). Sin embargo, en las ratas *Long-Evans* ha sido en torno al 30

%, en la línea de los estudios previos con la TWAA en esta cepa (Levine y Wetzel 1963; Wallace et al. 1976; Lichtenberg et al. 2014; Hatalova et al. 2017). Cabe mencionar también que las ratas *Long-Evans* parecen realizar más respuestas nulas en las primeras sesiones que las observadas en las *Sprague-Dawley* en los experimentos anteriores.

En este experimento se valoró el número de cruzamientos y el tiempo de petrificación durante el periodo de habituación a la caja lanzadera previo a la tarea como medida de miedo condicionado al contexto. El tiempo de petrificación durante la habituación en la segunda sesión fue inferior en el grupo UST que en el CST, aunque estas diferencias no aparecieron en la última sesión. Datos previos con las *Sprague-Dawley* indican que los animales CST y UST no difieren en el tiempo de petrificación ni en la segunda ni en la última sesión (Sanchís-Ollé 2018). Sin embargo, en ratones (Liu et al. 2009) y ratas (Escrig et al., datos no publicados) utilizando tareas en las que solo el escape es posible también se ha observado un mayor tiempo de petrificación en el grupo CST que en el UST, lo que ha sido interpretado como una preparación tensa para el escape en el grupo CST. Aunque en el presente trabajo la tarea permitía evitar el choque, el desempeño de las *Long-Evans* fue muy bajo, por lo que la situación real podría interpretarse como escapable más que como evitable, especialmente en la primera sesión. El hecho de no hallar diferencias en el tiempo de petrificación en la última sesión podría deberse a que el número de evitaciones había aumentado considerablemente respecto a la primera sesión, lo que implica que ya no predominaba el escape. Al igual que con la petrificación, el número de cruzamientos durante la fase de habituación de la segunda sesión fue superior en el grupo UST que en el CST, tendiendo a ser inferior en la última sesión. Los datos de la última sesión van en la misma dirección que los resultados obtenidos en nuestros estudios previos con las ratas de la cepa *Sprague-Dawley*.

Las cepas también parecen diferir en el número de cruzamientos durante el ITI a lo largo de las sesiones. En las ratas de la cepa *Sprague-Dawley* se observaba un patrón inverso en el grupo CST que en las del UST, incrementándose el número de cruzamientos a lo largo de las sesiones en el primero y descendiendo en el segundo. Sin embargo, en las *Long-*

Evans ambos grupos parten del mismo punto, pero mientras el CST sigue una progresión similar a las *Sprague-Dawley* (incrementándose en paralelo al número de evitaciones), el grupo UST parte de un número bajo de cruzamientos que se mantiene estable a lo largo de las sesiones.

3.2. Consecuencias endocrinas

Evaluamos la respuesta del eje HPA tras la primera y última sesión en la caja lanzadera. Sorprendentemente, en las ratas *Long-Evans*, los niveles de corticosterona fueron superiores en el grupo CST que en el UST tanto en la primera, como en la última sesión. Los estudios previos sobre la respuesta del eje HPA a la exposición a estímulos estresantes controlables/incontrolables indican que generalmente no hay diferencias en la respuesta del eje mediadas por la controlabilidad con la exposición aguda cuando solo hay escape (Maier et al. 1986). Pero bajo ciertos supuestos pueden aparecer diferencias en la respuesta del eje HPA que indican una amortiguación de la respuesta mediada por la controlabilidad. En concreto, estas diferencias a parecen en exposiciones agudas cuando la tarea es compleja (*lever/disk press*) o cuando hay exposiciones repetidas (ver punto 4.2 de la introducción). En nuestros estudios previos con ratas *Sprague-Dawley* las diferencias en la respuesta del eje HPA entre el grupo CST y el UST solo aparecieron en la última sesión, estando dicha respuesta amortiguada en el grupo CST (Sanchís-Ollé et al. 2019).

Analizamos también la glucosa plasmática, dado que la hiperglucemia en situaciones de estrés es un reflejo de la liberación de adrenalina (Bialik et al. 1988) y por lo tanto un marcador indirecto de la actividad del eje SMA. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos mediadas por la controlabilidad.

Las diferencias entre cepas respecto a las consecuencias de la controlabilidad sobre la respuesta del eje HPA podrían estar mediadas por el estilo de afrontamiento. Los sujetos con un estilo de afrontamiento activo/proactivo son poco reactivos en términos del eje HPA, tienen un desempeño mejor en tareas de evitación activa y mayor resistencia a la inmovilidad condicionada, mientras que los sujetos con un estilo de afrontamiento pasivo/reactivo tienen un patrón de respuesta opuesto (ver revisión en Koolhaas et al. 1999). Aunque en este

experimento no hemos hecho una comparación directa entre ambas cepas, los datos sugieren que las *Long-Evans*, en comparación a las *Sprague-Dawley*, tendrían un estilo de afrontamiento más pasivo.

El hecho de encontrar valores más bajos de respuesta de la corticosterona en el grupo UST respecto al CST es difícil de explicar. Weiss (1972) en sus estudios clásicos había planteado que la formación de úlceras gastrointestinales producidas por la exposición a estrés se verían reducidas si el estrés es predecible y controlable. No obstante, en condiciones en las que el estímulo era potencialmente controlable la retroalimentación que recibían respecto a las consecuencias de la conducta puesta en marcha (información referente a la contingencia respuesta-refuerzo) era crucial. Su teoría era que la conducta activa en ausencia de retroalimentación apropiada incrementaba el impacto del estrés respecto a una conducta pasiva cuando el impacto era valorado por el número y extensión de las lesiones gástricas (Weiss 1971). Por consiguiente, para que la controlabilidad pueda ser protectora es necesario una retroalimentación adecuada y una respuesta conductual óptima. En el caso de las *Long-Evans* pertenecientes al grupo CST la retroalimentación recibida por su conducta (fin del choque) podría no ser suficiente para ejercer los efectos protectores de la controlabilidad dada su baja eficacia en el desempeño de la tarea. Sin embargo, en el grupo UST, al hacer muy pocas respuestas y poder predecir la aparición del choque (dado que el grupo CST hace pocas evitaciones y el CS casi siempre precede al choque), el impacto del estrés sería menor.

Esta teoría puede combinarse con que la posibilidad de que el estilo de afrontamiento predominante sea el pasivo/reactivo en las ratas *Long-Evans*. Para ellas, la necesidad de dar una respuesta proactiva para evitar la aparición del choque podría ser más estresante que la falta de control, siendo el choque predecible, condición esta última que favorece adoptar una conducta pasiva y por consiguiente una menor activación de la respuesta del eje HPA (niveles plasmáticos de corticosterona). No obstante, no hay estudios específicos que apoye este supuesto y serían necesarios experimentos que permitiesen explorar esta posibilidad.

Los datos del incremento de peso de los sujetos indicaron que el procedimiento de estrés redujo el crecimiento respecto al grupo NS. En

los estudios previos de nuestro laboratorio con *Sprague-Dawley* no se observaron diferencias en el peso corporal, el tamaño de la adrenal o el tamaño del timo (Sanchís-Ollé 2018). En el presente experimento el tamaño de la adrenal y el timo no pudo ser evaluado porque decidimos darle prioridad al análisis de las consecuencias conductuales. No obstante, el hecho de que el incremento de peso sí se viese reducido refuerza la idea de que las ratas *Long-Evans* son más susceptibles al estrés que las ratas *Sprague-Dawley*. En cualquier caso, no podemos descartar que este efecto sea consecuencia del mayor número y tiempo de choque recibido por las *Long-Evans*, puesto que realizaron menos evitaciones y más respuestas nulas que las *Sprague-Dawley*. Lo que sí es evidente es que el incremento de peso no parece ser sensible a la controlabilidad, en consonancia con todos los datos previos de diferentes laboratorios.

La actividad basal del eje HPA medida mediante los niveles plasmáticos de corticosterona 3 días después de la última sesión de choques fue similar en los tres grupos experimentales, así como también lo fue la respuesta a un estímulo estresante de baja intensidad (OF) 4 días después. Sin embargo, la respuesta a un estímulo de alta intensidad (FST) 8 días después fue superior en los grupos expuestos a estrés adolescente que en el grupo NS. Estos resultados difieren parcialmente de los obtenidos utilizando la cepa *Sprague-Dawley*. No obstante, por motivos técnicos no hemos podido analizar, por el momento, la ACTH. Por consiguiente, debemos ser cautos a la hora de sacar conclusiones.

3.3. Consecuencias conductuales

A nivel conductual, se observó un descenso en la distancia recorrida en el centro pero no en la periferia del OF durante los primeros 5 min en los grupos sometidos a estrés adolescente (aunque el efecto fue solo marginal en el grupo UST). Estos resultados son menos evidentes que los observados en *Sprague-Dawley* a corto plazo. Ambas cepas difieren en la actividad en un OF, siendo las *Long-Evans* más activas (Padilla et al. 2009; Turner y Burne 2014), pero no es evidente que este sea un factor, especialmente crítico. Si nos atenemos a la hipótesis de la “*generalización cognitiva de miedo condicionado al contexto*”, el impacto de la exposición previa a choques eléctricos sobre la hipoactividad en un OF debería ser en las *Long-Evans* que en las *Sprague-Dawley*, dado que las primeras son

más sensibles al condicionamiento del miedo. Sin embargo, no sabemos si las distintas cepas de rata o ratón difieren en este aspecto ya que no ha sido estudiado.

Dos días después de la exposición al OF evaluamos la conducta social en la prueba de IS. No hubo cambios ni por la exposición a estrés ni por la controlabilidad, a pesar de que es en esta prueba en la que se han observado efectos más consistentes mediados por la controlabilidad (Kubala et al. 2012; Maier y Seligman 2016; Sanchís-Ollé 2018). Además de no observarse diferencias mediadas por la controlabilidad, la interacción social activa fue en general inferior en las *Long-Evans* que la observada previamente en las *Sprague-Dawley*, aunque no hemos hecho una comparación directa, al haber realizado los experimentos en distintos momentos. Cabe destacar, que durante la prueba de IS diferentes parejas de ratas exhibieron conducta agresiva (sin diferencias aparentes entre grupos, datos no mostrados), algo que rara vez hemos observado en ratas de la cepa *Sprague-Dawley*. Este hecho no es sorprendente considerando que las *Long-Evans* adultas son más agresivas que otras cepas (Blanchard et al. 1984; Blanchard y Blanchard 2003).

Dos días después de la prueba de IS evaluamos la conducta en la FST, en la que tampoco obtuvimos diferencias entre grupos en ninguno de los parámetros estudiados. Los resultados que hemos obtenido en la FST tras la exposición a estrés controlable/incontrolable durante la adolescencia con la cepa *Sprague-Dawley* varían entre experimentos, aunque en conjunto parece que el estrés adolescente podría incrementar en esta cepa el uso de estrategias activas. Dado que las ratas de la cepa *Long-Evans* muestran menos conducta activa que las ratas *Sprague-Dawley* en la FST (Konkle et al. 2010; Sanchís-Ollé et al., en preparación), podrían ser menos proclives al impacto del estrés para favorecer las conductas de afrontamiento activo.

Posteriormente, evaluamos el consumo de sacarina durante 4 h y durante 7 días, comenzando 5 días después de la exposición a la FST. A las 4 h se observó un consumo menor en los animales CST y UST respecto a los NS. Sin embargo durante los 7 días hubo un consumo menor de sacarina en las CST respecto a las NS que fue marginalmente

significativo en las UST. Los estudios previos de nuestro laboratorio con ratas de la cepa *Sprague-Dawley* indicaban que la exposición crónica a estrés controlable o incontrolable durante la adolescencia no afectaba a la preferencia por el consumo de sacarina (Sanchís-Ollé 2018). El descenso en el consumo preferente de sacarina se ha considerado indicativo de una conducta que podría reflejar anhedonia, lo que sugiere que esta cepa sería más susceptible a los efectos anhedónicos de la exposición a estrés que las ratas *Sprague-Dawley*. El hecho de que la situación sea controlable no parece proteger frente a las consecuencias de la exposición. La ausencia de efecto del control sobre el estrés está de acuerdo con datos de otros investigadores en ratas adultas expuestas a una sola sesión de choques escapables versus inescapables, en los que se observó un descenso de la preferencia por sacarosa similar en ambos grupos (Christianson et al. 2008).

Por último, evaluamos como la experiencia previa en la caja lanzadera afectaba a una nueva exposición a la TWAA 30 días después de la última sesión. Para ello expusimos los tres grupos experimentales a la TWAA siguiendo el mismo procedimiento que siguió el grupo CST en la adolescencia. Evaluamos la conducta durante los 5 min de habituación para observar el condicionamiento del miedo al contexto a largo plazo y su posible relación con el desempeño posterior en la tarea.

Durante el periodo de habituación previo a la tarea el tiempo de conducta de petrificación fue, como era de esperar, superior en los grupos expuestos a estrés adolescente y ligeramente superior en el grupo UST respecto al CST. Sin embargo, no se observaron durante la habituación diferencias entre los dos grupos expuesto a estrés durante la adolescencia ni en el número de cruzamientos ni en el de alzamientos. En los estudios previos con las ratas *Sprague-Dawley* también se había observado una reducción en el tiempo de petrificación en el grupo CST respecto al UST (Sanchís-Ollé 2018). Sin embargo, las diferencias entre los dos grupos se extendieron al número de cruzamientos y alzamientos. Estas diferencias entre las dos cepas en el impacto de CST versus UST no son sorprendentes considerando que la tasa de petrificación en las *Long-Evans* fue muy superior a la observada por Sanchís-Ollé (2018) en la cepa *Sprague-Dawley*. Es lógico que las conductas activas estén tan

reducidas en las *Long-Evans* expuestas a choques en la adolescencia que sea muy difícil hallar diferencias asociadas a la controlabilidad. Las diferencias entre cepas en la tasa de petrificación podrían deberse al mayor tiempo de choque recibido, aunque la razón más probable sea la mucha mayor sensibilidad de las *Long-Evans* al condicionamiento de miedo al contexto (Chang y Maren 2010; Sanchís-Ollé en preparación).

Como era de esperar en función de estudios previos en animales jóvenes (Sanchís-Ollé 2018), el desempeño en la TWAA fue claramente superior en las ratas CST que en los otros dos grupos. El mejor desempeño está probablemente relacionado con la experiencia previa de control y con el hecho de ser expuestos a la misma tarea que en la etapa adolescente. Lo que es más sorprendente es que el desempeño del grupo UST no fuese inferior al del grupo NS. De hecho se observó una tendencia no significativa a mayor número de evitaciones en el grupo UST que en el NS, aunque el número de respuestas nulas (bajo en general) fue también más elevado en el grupo UST que en el NS. Según la teoría de la indefensión aprendida (Maier y Seligman 2016), el desempeño del grupo UST debería haber sido inferior al del grupo NS. Aunque podría argumentarse que el desempeño fue muy malo en el grupo NS y eso impediría ver las diferencias con el UST, ya hemos comentado que el número de evitaciones fue en el sentido contrario al esperado. Por otro lado, siguiendo el mismo protocolo que en el presente estudio, en las ratas *Sprague-Dawley* el desempeño de las UST fue claramente superior a las NS (Sanchís-Ollé 2018). Por lo tanto, el patrón tiende a ser el mismo, pero muy amortiguado por el mal desempeño de las *Long-Evans* respecto a las *Sprague-Dawley* en la TWAA.

La razón de que nuestros resultados vayan en contra de la teoría de la indefensión aprendida puede ser múltiple. En nuestro caso los animales CST tenían la posibilidad de evitar la aparición de los choques y no solo escapar de los mismos, en tanto que en modelo clásico de la indefensión aprendida solo tienen la opción de escapar (parar el choque). El modelo clásico implica una sola exposición y en animales adultos mientras que en nuestro modelo los animales son adolescentes y la exposición es repetida. Finalmente, la exposición a los choques tuvo lugar en nuestro modelo en el mismo lugar y condiciones en las que se llevó a cabo

posteriormente la TWAA y no es descartable una cierta adaptación al estrés por choque eléctrico en las patas.

En resumen, las ratas de la cepa *Long-Evans* tienen más dificultades para aprender la TWAA y no parecen beneficiarse de los posibles efectos protectores de la controlabilidad. Las consecuencias conductuales y endocrinas difieren de las observadas en las *Sprague-Dawley*, siendo en algunos aspectos más sensibles y en otros menos. Por otro lado, debemos ser cautos en las conclusiones extraídas, debido a que no comparamos ambas cepas de forma directa. En cualquier caso, los datos conductuales y endocrinos parecen indicar un estilo de afrontamiento pasivo/reactivo en esta cepa por lo que la TWAA podría no ser una tarea adecuada para estudiar los efectos de la controlabilidad en las *Long-Evans*.

4. Conclusiones e Implicaciones teóricas y clínicas

4.1. Conclusiones

Los resultados de la presente tesis indican que la exposición a choques eléctricos en condiciones en las que los animales pueden evitarlos (tarea TWAA, grupo CST) respecto a choques sobre los que no se ejercen control (grupo UST) muestra algunos efectos comunes y otros dependientes de la controlabilidad. Sin embargo, las diferencias conductuales y endocrinas son sutiles y el impacto general de la exposición a choques en la adolescencia fue moderada. Es mucho más probable encontrar diferencias robustas cuando la conducta o las consecuencias endocrinas y centrales se analizan en los dos días posteriores a la exposición al estrés crónico. El caso más evidente es el de la sensibilización de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes heterotípicos. En la medida en que se prolonga el tiempo entre la exposición al estrés crónico y las variables estudiadas, es más probable que muchos de los efectos se disipen o sean menos consistentes debido a las diferencias entre tandas de animales. En este sentido, el uso de la cepa *Sprague-Dawley* en los primeros estudios y la cepa *Long-Evans* en el último, indican claramente que la cepa utilizada, reflejo de diferencias individuales, es claramente determinante y podría explicar muchos de los datos controvertidos de la literatura.

Aunque los resultados respecto al impacto del estrés en la etapa adolescente en las estrategias de afrontamiento en la FST no han sido muy consistentes, sí podemos concluir que la controlabilidad sobre el estrés tiene poco impacto y más concretamente que la ausencia de control no favorece las estrategias de afrontamiento pasivas, sino más bien las activas. Por consiguiente, no hemos obtenido evidencias de una generalización de la posibilidad de control sobre el estrés, o su ausencia, trasladable a situaciones estresantes de una naturaleza diferente.

En paralelo a los cambios conductuales y endocrinos, hemos estudiado el impacto del estrés adolescente sobre la inducción, constitutiva o en respuesta al nado, de IEG que no solo sirven de marcadores de neuronas activadas por el estrés (*c-fos*) sino también otros que parecen implicados en procesos de plasticidad sináptica y cambios funcionales como el Δ FosB y el *Arc*. Esperábamos encontrar efecto del estrés y de la posibilidad de control. Respecto a Δ FosB, que permite identificar neuronas que se han activado repetidamente, solo se observó un incremento de su expresión en el LSV, siendo dicha expresión independiente de la controlabilidad, razón por la cual aporta poco respecto a áreas sensibles al control sobre el estrés. En el caso de *Arc*, los resultados han sido sorprendentes dado que se ha observado un descenso significativo de su expresión constitutiva en la mPFC del grupo CST y una tendencia similar en el grupo UST, en tanto que el descenso ha sido evidente en ambos grupos en el estriado. Aunque no está claro el papel específico de la controlabilidad en el descenso de *Arc*, este descenso debería repercutir en los procesos de plasticidad sináptica de estas áreas. Sin embargo, tras la exposición a la FST, que dio lugar a un notable incremento de la expresión del gen (esperable por ser un IEG), no se observaron diferencias en el grupo CST respecto al NS y el grupo UST mostró una mayor respuesta que el NS. Desconocemos las implicaciones funcionales concretas de estos cambios en la expresión de *Arc* por la falta de estudios al respecto.

Finalmente, no se observaron efectos de la exposición al estrés en la inducción de *c-fos* por la FST, lo que indica poco impacto de la experiencia previa de estrés sobre la respuesta del SNC a estímulos estresantes heterotípicos. No obstante, la historia previa de estrés podría

modificar el equilibrio entre las poblaciones D1 (circuito directo) y D2 (circuito indirecto) de algunas subdivisiones del estriado y afectar también a la respuesta conductual a la administración sistémica de antagonistas D1 y D2, aunque el efecto de la controlabilidad es difícil de caracterizar con precisión.

En contraposición a las dificultades para observar efectos claros en conductas no relacionadas con la exposición a los choques, es evidente que en las ratas *Long-Evans* la experiencia de control en la tarea TWAA durante la adolescencia (grupo CST) mejora claramente la ejecución de la misma tarea en la etapa adulta y que la experiencia previa de incontrolabilidad (grupo UST) no tiene un impacto negativo sobre la tarea adulta, en contra de la idea de la indefensión aprendida. Los datos previos de nuestro laboratorio con ratas *Sprague-Dawley* confirman la gran mejora en la ejecución de la tarea durante la adultez en el grupo CST, pero además demuestran una clara mejora en el grupo UST respecto al grupo NS. Por consiguiente, nuestros resultados no apoyan la idea de la indefensión aprendida, al menos cuando el estímulo aversivo es el mismo (choque eléctrico en las patas).

4.2. Implicaciones teóricas

Se han elaborado diferentes modelos teóricos para explicar cómo afectan las exposiciones tempranas a situaciones estresantes en la reactividad al estrés durante la edad adulta (ver revisión en Chaby 2016). Entre ellas, la teoría de los *2/3 hits* plantea que las consecuencias negativas de la exposición en etapa tempranas a estrés se sumarían a las de la exposición en adultos (McEwen 1998; 2000). La teoría del *match/mismatch* plantea que la exposición en etapas tempranas prepararía frente a las exposiciones adultas, y el problema vendría cuando el contexto en la edad adulta no coincide con el de las etapas tempranas (Schmidt 2011; Santarelli et al. 2014). El modelo de “inoculación” plantea que tanto la falta de exposición a experiencias estresantes leves como la exposición a situaciones muy intensas, tendrían consecuencias negativas, mientras que un nivel de exposición intermedio sería el óptimo para ejercer efectos protectores, existiendo por lo tanto una “U” invertida (Romeo 2015). Una última teoría que queremos resaltar, es la teoría de la “sensibilidad diferencial al contexto”, que plantea que un individuo que

es susceptible a los efectos negativos de la exposición a estrés durante las etapas tempranas también lo es a los efectos protectores, mientras que el que es resistente a las consecuencias negativas lo es a la vez a las positivas (Ellis et al. 2011). Dicho de otra forma, existirían en una población determinada de sujetos unos de elevada susceptibilidad a influencias ambientales y otros muy resistentes, que probablemente representan una combinación que tiene valor adaptativo para la población en conjunto. Como vemos, hay diferentes enfoques y planteamientos de cara a predecir cómo afectarán las experiencias tempranas en el sujeto adulto y de hecho se han hecho esfuerzos por integrarlos dentro de una teoría unitaria (Shakiba et al. 2019).

Los resultados obtenidos en el presente estudio no permiten apoyar a ninguna de las diferentes teorías. Uno de los problemas de estos planteamientos teóricos es que el diseño de experimentos concretos para apoyarlas o refutarlas es muy complejo por varias razones. En primer lugar, no es obvio que todas las consecuencias del estrés que podemos valorar (conductuales o endocrinas) vayan en la misma dirección. El ejemplo de las dos cepas estudiadas en el presente estudio ilustra el problema: las *Long-Evans* parecen mucho más sensibles al impacto del estrés adolescente que las *Sprague-Dawley* en cuanto al condicionamiento del miedo generado por la exposición a choques o a la anhedonia, pero parecen menos sensibles en cuanto a la interacción social. En segundo lugar, es difícil determinar qué situaciones podemos considerar como leves, óptimas o intensas para estudiar la teoría de la “U” invertida. Finalmente, la combinación de las tres primeras teorías con la de la sensibilidad diferencial al contexto no se ha investigado aún en modelos animales, entre otras razones porque no hay una definición operacional para caracterizar ambas poblaciones de animales antes de que sean expuestos al estrés en etapas tempranas (incluyendo la adolescencia). No obstante, las teorías mencionadas son de gran valor y han de servir como guía para el futuro desarrollo de diseños experimentales apropiados.

El presente estudio, como cualquier otro, está sujeto a importantes limitaciones. La primera de ellas va ligada inevitablemente al estímulo estresante utilizado durante la adolescencia. El choque eléctrico provoca

efectos condicionados, como el miedo condicionado al contexto o la generalización cognitiva, que son muy duraderos en el tiempo, aunque como contrapartida permite regular su intensidad y es el más adecuado para el estudio de la implicación de la controlabilidad en la respuesta de estrés. La segunda limitación va ligada a las pruebas utilizadas para evaluar las consecuencias de la exposición a estrés. Todas las pruebas utilizadas tienen asociado un componente estresante de mayor o menor intensidad, el cual provoca que las diferencias pueden deberse a la interacción de la experiencia previa de estrés con la nueva situación estresante o, alternativamente, a consecuencias fenotípicas estables causadas por la exposición a estrés. En otros términos, la reducción en la conducta exploratoria puede ser fruto de un incremento en la ansiedad rasgo o deberse a una sensibilización de la percepción de estrés fruto de la experiencia previa. Esta disyuntiva es muy complicada de solucionar, debido a la dificultad para diseccionar el peso de cada componente. La última limitación vendría ligada a los sujetos experimentales. Las consecuencias de la exposición a estrés controlable o incontrolable podrían estar mediadas por diferencias individuales en el estilo de afrontamiento o en la sensibilidad a los efectos protectores o dañinos de la exposición. En futuros estudios sería necesario abordar las diferencias individuales, basándonos tanto en la conducta en la TWAA como en el impacto del choque (controlable o incontrolable) a nivel conductual y fisiológico.

Los datos generados en el presente estudio, así como los datos previos en roedores y humanos indican que la controlabilidad (o la percepción de esta) son importantes en la mediación de las consecuencias de la exposición a estrés. Es muy probable que el impacto sea mayor en humanos que en animales con mucha menos capacidad de procesamiento cognitivo, lo que implica más dificultad para distinguir entre situaciones controlables e incontrolables y probablemente menos impacto diferencial en roedores. En humanos la percepción de control no solo se ha estudiado en situaciones de laboratorio, sino también en situaciones reales. Como hemos comentado en la introducción (apartado 4.3) un indicador de la capacidad de control del contexto ha sido el estatus socioeconómico. Las personas con un estatus socioeconómico bajo (contexto incontrolable) tienen mayor tendencia a

desarrollar trastornos del estado de ánimo y de abuso de sustancias relacionados con las experiencias de estrés (Moscarello y Hartley 2017). Asimismo, la percepción de control protege frente a las consecuencias negativas (sintomatología del trastorno de estrés postraumático) tras sufrir algún tipo de agresión física (Kushner et al. 1993), mientras que la percepción de indefensión (falta de control) empeora las consecuencias de sufrir violencia doméstica (Salcioglu et al. 2017), los desastres naturales (Başoğlu et al. 2002), las guerras (Letica-Crepulja et al. 2011) y la tortura (Le et al. 2018). En concreto, si ponemos el foco en la adolescencia, los sujetos que tienden a atribuir los estados de ánimo negativos a causas incontrolables son más susceptibles de desarrollar depresión que si estos son atribuidos a causas controlables (Brown y Siegel 1988).

La adolescencia es el último estadio evolutivo previo a la edad adulta, está repleta de cambios y ofrece una oportunidad para potenciar las habilidades de los sujetos a la hora de afrontar situaciones adversas. Entre las estrategias para fomentar la resiliencia, estaría la exposición a situaciones estresantes o retos de intensidad asumible, en los cuales el individuo pueda controlar y resolver la situación (Rutter 2013) y de esta forma incrementar la percepción de control. A ello hemos de añadir otras aproximaciones orientadas a incrementar las herramientas de afrontamiento activo (resolución de problemas) o modificar la emoción subyacente al evento estresante. Es de esperar que en un futuro los estudios neurocientíficos nos permitan profundizar en humanos en los mecanismos diferenciales a través de los que actúa el estrés controlable versus el incontrolable.

Conclusiones

1. La controlabilidad sobre el estrés en la adolescencia no se reflejó en la acumulación de corticosterona en pelo, indicando una liberación similar de corticosterona en los dos grupos expuestos a estrés respecto al grupo NS.
2. No hubo alteraciones significativas entre grupos en los niveles basales de ACTH o corticosterona. Sin embargo, a corto plazo la liberación de ACTH estuvo sensibilizada en los animales UST en respuesta a estímulos estresantes de baja intensidad (OF), mientras que en la respuesta a un estímulo de alta intensidad (FST) se observó sensibilización de la respuesta de ACTH en los dos grupos expuestos a estrés y en la de corticosterona en el UST (FST).
3. En los casos en los que se observaron mayores niveles de corticosterona en respuesta a un nuevo estímulo estresante agudo, el efecto no pareció deberse a cambios en la capacidad máxima de respuesta de la corteza adrenal a la ACTH.
4. A nivel conductual la controlabilidad protegió frente al impacto a corto plazo del estrés adolescente sobre la interacción social, pero no frente al descenso moderado en la actividad exploratoria en un OF a corto y largo plazo, y al incremento del uso de estrategias de afrontamiento activo en la FST a corto plazo.
5. La exposición repetida a estrés adolescente tan solo incrementó el número de neuronas Δ FosB+ en el LSv a corto plazo, sin cambios entre grupos en la mayoría de áreas estudiadas (v.g. mPFC, estriado o NAc). Por tanto, no se detectaron áreas actividades diferencialmente por la controlabilidad.
6. La exposición a estrés controlable redujo a corto plazo la expresión basal de *Arc* en el mPFC, observándose la misma tendencia en el grupo UST. En la misma línea se observó un descenso en todas las subdivisiones del estriado, salvo en el DMS, tanto en el grupo CST, como en el UST, sin diferencias entre estos. Estos efectos no se observaron a largo plazo, indicando que es un efecto transitorio.

7. La exposición a estrés durante la adolescencia no produjo cambios en la respuesta de *c-fos* a un estímulo heterotípico (FST) en ninguna de las áreas estudiadas. Sin embargo, se observó sensibilización de la respuesta de *Arc* en los animales expuestos a estrés incontrolable (UST), pero no al controlable (CST).
8. A pesar de no incrementar globalmente la respuesta de *c-fos* a la FST, la exposición a estrés adolescente modificó el patrón de *c-fos* en los dos tipos de neuronas dopaminérgicas del estriado, incrementándose el número de neuronas D1+/*c-fos*+ en la parte medial del estriado en los animales expuestos a estrés adolescente. Este incremento vino asociado a un incremento en el uso de estrategias de afrontamiento activo.
9. La administración de antagonistas D1 y D2 favoreció las conductas pasivas en la FST. Sin embargo, en los animales CST no hubo prácticamente efecto de los fármacos, mientras que en los UST los efectos se vieron potenciados. Estos resultados indican que aunque no haya cambios visibles mediados por la controlabilidad en la conducta en la FST, sí que hay cambios sutiles en la regulación de ésta por el sistema dopaminérgico.
10. Las ratas *Long-Evans* presentan una tasa de adquisición de la TWAA inferior que las *Sprague-Dawley*. Las *Long-Evans* UST presentaron menos miedo condicionado que las CST en los 5 min de habituación de la segunda sesión, pero se equipararon en la última sesión.
11. La respuesta del eje HPA (corticosterona) fue más elevada en los animales CST que en los UST, indicando una influencia de la controlabilidad diferente en las *Long-Evans* respecto a las *Sprague-Dawley*.
12. La exposición a estrés durante la adolescencia redujo a corto plazo la distancia recorrida en el centro de un OF y el consumo de sacarina en las ratas *Long-Evans*. No se observó ningún efecto sobre la conducta en la prueba de IS ni en la FST. Estos datos

indican que el impacto sobre la conducta es distinto del observado en las *Sprague-Dawley*.

13. En el grupo CST se redujo a largo plazo la respuesta de miedo condicionado al contexto respecto al UST. Asimismo, favoreció la realización de la TWAA en la edad adulta. En menor medida también favoreció el desempeño en los animales UST respecto a los NS. Estos datos no apoyan la idea de la indefensión parendida.
14. La exposición a estrés repetido durante la adolescencia provoca cambios en la respuesta endocrina, conductual y del SNC posterior, que en algunos casos son modulados por la controlabilidad. El impacto de la exposición a estrés controlable/incontrolable varía según la cepa utilizada en el estudio.

Referencias

- Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ (1989). Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 52:1655-1658.
- Adriani W, Chiarotti F, Laviola G (1998). Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience* 112:1152-1166.
- Aga-Mizrachi S, Cymerblit-Sabba A, Gurman O, Balan A, Shwam G, Deshe R, Miller L, Gorodetsky N, Heinrich N, Tzezana O, Zubedat S, Grinstein D, Avital A (2014). Methylphenidate and desipramine combined treatment improves PTSD symptomatology in a rat model. *Translational Psychiatry* 4:e447-449.
- Aguilera G (2012). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuroendocrine responses to stress. Fink G, Pfaff D, Levine JE (Eds.) in: *Handbook of Neuroendocrinology* 175-196. Elsevier
- Amat J, Alekseyev RM, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2010). Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience* 165:1031-1038.
- Andersen SL, Rutstein M, Benzo JM, Hostetter JC, Teicher MH (1997). Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *NeuroReport* 8:1495-1497.
- Andersen SL (2003). Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:3-18.
- Andersen SL, Teicher MH (2008). Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends in Neurosciences* 31:183-191.
- Andersen SL, Teicher MH (2009). Desperately driven and no brakes: Developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33:516-524.
- Andersen SL (2015). Exposure to early adversity: Points of cross-species translation that can lead to improved understanding of depression. *Development and Psychopathology* 27:477-491.
- Anisman H, Matheson K (2005). Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:525-546.
- 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. *Endocrine Reviews* 7:351-378.
- Arakawa H (2003). The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Developmental Psychobiology* 43:11-19.
- Arakawa H (2019). Age and sex differences in the innate defensive behaviors of C57BL/6 mice exhibited in a fear conditioning paradigm and upon exposure to a predatory odor. *Physiology and Behavior* 204:264-274.

- Armario A, Retrepo C, Castellanos JM, Balasch J (1985). Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sciences* 36:2085-2092.
- Armario A, Restrepo C, Hidalgo J, Lopez-Calderon A (1987). Differences in prolactin and LH responses to acute stress between peripuberal and adult male rats. *Journal of Endocrinology* 112:9-13.
- Armario A, Hidalgo J, Giralt M (1988b). Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47:263-267.
- Armario A, Gavaldà A, Martí O (1988a). Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *European Journal of Pharmacology* 158:207-212.
- Armario A, Martí J, Gil M (1990). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15:341-347.
- Armario A, Gil M, Martí J, Pol O, Balasch J (1991). Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 39:373-377.
- Armario A (2006b). The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressors. *Immediate Early Genes in Sensory Processing, Cognitive Performance and Neurological Disorders*: 199-221.
- Armario A (2006a). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS & neurological disorders drug targets* 5:485-501.
- Armario A, Daviu N, Muñoz-Abellán 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? *Cellular and Molecular Neurobiology* 32:749-758.
- Armario A, Nadal R (2013). Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: A strong challenge and a good opportunity. *Frontiers in Pharmacology* 4:1-13.
- Armario A (2015). Studying chronic stress in animals: purposes, models and consequences. Russell J, Shipston M (Eds). In: *Neuroendocrinology of Stress* 143-168. John Wiley & Sons.
- Arndt DL, Peterson CJ, Cain ME (2015). Differential rearing alters forced swim test behavior, fluoxetine efficacy, and post-test weight gain in male rats. *PLoS ONE* 10:1-21.
- Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1995). Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiology and Behavior* 57:165-169.
- Badanich KA, Adler KJ, Kirstein CL (2006). Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi. *European Journal of Pharmacology* 550:95-106.

- 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. *Behavioral Brain Research* 103:203-209.
- Baird AA, Fugelsang JA (2004). The emergence of consequential thought: Evidence from neuroscience. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359:1797-1804.
- Bale TL, Vale WW (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44:525-557.
- Baratta MV, Christianson JP, Gomez DM, Zarza CM, Amat J, Masini CV, Watkins LR, Maier SF (2007). Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. *Neuroscience* 146:1495-1503.
- Baratta MV, Leslie NR, Fallon IP, Dolzani SD, Chun LE, Tamalunas AM, Watkins LR, Maier SF (2018.) Behavioural and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. *European Journal of Neuroscience* 47:959-967.
- Baratta MV, Gruene TM, Dolzani SD, Chun LE, Maier SF, Shansky RM (2019). Controllable stress elicits circuit-specific patterns of prefrontal plasticity in males, but not females. *Brain Structure and Function* 224: 1831-43.
- Barbayannis G, Franco D, Wong S, Galdamez J, Romeo RD, Bauer EP (2017). Differential effects of stress on fear learning and activation of the amygdala in pre-adolescent and adult male rats. *Neuroscience* 360:210-219.
- Başoğlu M, Şalçıoğlu E, Livanou M (2002). Traumatic stress responses in earthquake survivors in Turkey. *Journal of Traumatic Stress* 15:269-276.
- Bauer RH (1978). Ontogeny of two-way avoidance in male and female rats. *Developmental Psychobiology* 11:103-116.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011). The physiology, signalling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacology Review* 63:182-217.
- Begg DP, Woods SC (2013). The endocrinology of food intake. *Nature Reviews Endocrinology* 9:584-597.
- 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. *Behavioural Brain Research* 154:399-408.
- Belda X, Armario A (2009). Dopamine D1 and D2 dopamine receptors regulate immobilization stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychopharmacology* 206:355-365.
- Belda X, Fuentes S, Daviu N, Nadal R, Armario A (2015). Stress-induced sensitization: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* 18:269-279.
- Belda X, Nadal R, Armario A (2016). Critical features of acute stress-induced cross-sensitization identified through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis output. *Scientific Reports* 6:1-12.

- Bentivoglio M, Morelli M (2005). The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. Dunnet SB, Bentivoglio, Björklund A, Hökfelt T (Eds.). In: Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier.
- Bereiter DA, De Maria EJ, Engeland WC, Gann DS (1988). Endocrine response to multiple sensory input related to injury. Chrousos, GP, Loriaus DL, Gold, PW (Eds.) in Mechanisms of physical and emotional stress, 251-264. Springer Science + Business Media, LLC.
- Berettera C, Invernizzi R, Pulvirenti L, Samanin R (1986). Chronic treatment with iprindole reduces immobility of rats in the behavioural 'despair' test by activating dopaminergic mechanisms in the brain. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38:313-315.
- Bessa JM, Morais M, Marques F, Pinto L, Palha JA, Almeida OFX, Sousa N (2013). Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens. *Translational Psychiatry* 3:1-7.
- 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.
- Bialik RJ, Smythe JM, Roberts DCS (1988). Alpha2-adrenergic receptors mediate the increase in blood glucose levels induced by epinephrine and brief footshock stress. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 12:307-314.
- Bielajew C, Konkle ATM, Merali Z (2002). The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behavioural Brain Research* 136:583-592.
- Bielajew C, Konkle ATM, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Hutchins AA, Santa-Maria Barbagallo L, Fouriez G (2003). Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress* 6:269-280.
- Björklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences* 30:194-202.
- Blakemore SJ, Burnett S, Dahl RE (2010). The role of puberty in the developing adolescent brain. *Human Brain Mapping* 31:926-933.
- Blanchard RJ, Flannelly KJ, Layng M, Blanchard DC (1984). The effects of age and strain on aggression in male rats. *Physiology and Behavior* 33:857-861.
- Blanchard R, Blanchard D (2003). Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. *Physiology and Behavior* 79:515-524.
- Blasco-Serra A, González-Soler EM, Cervera-Ferri A, Teruel-Martí V, Valverde-Navarro AA (2017). A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. *Neuroscience Letters* 658:73-78.
- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ (1988). The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 95:298-302.

- Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ (1989). A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology* 97:277-279.
- Boeke EA, Moscarello JM, LeDoux JE, Phelps EA, Hartley CA (2017). Active avoidance: neural mechanisms and attenuation of Pavlovian conditioned responding. *The Journal of Neuroscience* 37:4808-4818.
- Borowsky B, Kuhn CM (1992). D1 and D2 dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacology* 31:671-678.
- Borsini F, Bendotti C, Velkov V, Rech R, Samamin R (1981). Immobility test: effects of 5-hydroxytryptaminergic drugs and role of catecholamines in the activity of some antidepressants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 33:33-37.
- Borsini F, Nowakowska E, Samanin R (1984). Effect of repeated treatment with desipramine in the behavioral "despair" test in rats: Antagonism by "atypical" but not "classical" neuroleptics or antiadrenergic drugs. *Life Sciences* 34:1171-1176.
- Borsini F, Pulvirenti L, Samanin R (1985). Evidence of dopamine involvement in the effect of repeated treatment with various antidepressants in the behavioural "despair" test in rats. *European journal of pharmacology* 110:253-256.
- Boulle F, Massart R, Stragier E, Païzanis E, Zaidan L, Marday S, Gabriel C, Mocaer E, Mongeau R, Lanfumey L (2014). Hippocampal and behavioural dysfunctions in a mouse model of environmental stress: normalization by agomelatine. *Translational Psychiatry* (4), e485.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K (2010). The Arc of synaptic memory. *Experimental Brain Research* 200:125-140.
- Brenes Sáenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trías J (2006). Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research* 169:57-65.
- Brenhouse HC, Sonntag KC, Andersen SL (2008) Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: Relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. *Journal of Neuroscience* 28:2375-2382.
- Brenhouse HC, Andersen SL (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:1687-1703.
- Brown J, Siegel J (1988). Attributions for negative life events and depression: the role of perceived control. *Journal of personality and social psychology* 54:316-322.
- Brujnzeel AW, Stam R, Wiegant VM (2001). Effect of a benzodiazepine receptor agonist and corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on long-term foot-shock-induced increase in defensive withdrawal behavior. *Psychopharmacology* 158:132-139.
- Brunell SC, Spear LP (2005). Effect of stress on the voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29:1641-1653.

- Burke AR, Watt MJ, Forster GL (2011). Adolescent social defeat increases adult amphetamine conditioned place preference and alters D2 dopamine receptor expression. *Neuroscience* 197:269-279.
- Burke AR, Forster GL, Novick AM, Roberts CL, Watt MJ (2013). Effects of adolescent social defeat on adult amphetamine-induced locomotion and corticoaccumbal dopamine release in male rats. *Neuropharmacology* 67:359-369.
- Burke AR, Miczek KA (2015). Escalation of cocaine self-administration in adulthood after social defeat of adolescent rats: Role of social experience and adaptive coping behavior. *Psychopharmacology* 232:3067-3079.
- Burke AR, McCormick CM, Pellis SM, Lukkes JL (2017). Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 76:280-300.
- Cain DW, Cidlowski JA (2015). Specificity and sensitivity of glucocorticoid signalling in health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 29:545-556.
- Campmany L, Pol O, Armario A (1996). The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol Biochem Behav* 53:517-523.
- Cándido A, Maldonado A, Rodríguez A, Morales A (2002). Successive positive contrast in one-way avoidance learning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 55:171-184.
- Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Dao JM, Chen YL, Leslie FM (2010). Locomotor and stress responses to nicotine differ in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96:82-90.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ (2007). Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: Identification of FosB degron domains and implications for Δ FosB stability. *European Journal of Neuroscience* 25:3009-3019.
- Casey BJ, Duhoux S, Cohen MM (2010). Adolescence: What do transmission, transition, and translation have to do with it? *Neuron* 67:749-760.
- Casey BJ, Caudle K (2013). The teenage brain: self control. *Current Directions in Psychological Science* 22:82-87.
- Casey BJ (2015). Beyond simple models of self-control to circuit-based accounts of adolescent behavior. *Annual reviews of psychology* 66:295-319.
- Chaby LE, Cavigelli SA, White A, Wang K, Braithwaite VA (2013). Long-term changes in cognitive bias and coping response as a result of chronic unpredictable stress during adolescence. *Frontiers in Human Neuroscience* 7:1-10.
- Chaby LE, Cavigelli SA, Hirrlinger AM, Caruso MJ, Braithwaite VA (2015b). Chronic unpredictable stress during adolescence causes long-term anxiety. *Behavioural Brain Research* 278:492-495.

- Chaby LE, Cavigelli SA, Hirrlinger AM, Lim J, Warg KM, Braithwaite VA (2015a). Chronic stress during adolescence impairs and improves learning and memory in adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9:1-11.
- Chaby LE, Sheriff MJ, Hirrlinger AM, Lim J, Fetherston TB, Braithwaite VA (2015c). Does chronic unpredictable stress during adolescence affect spatial cognition in adulthood? *PLoS ONE* 10:1-12.
- Chaby LE (2016). Why are there lasting effects from exposure to stress during development? An analysis of current models of early stress. *Physiology and Behavior* 164:164-181.
- Chang Ch, Maren S (2010). Strain difference in the effect of infralimbic cortex lesions on fear extinction in rats. *Behavioral Neuroscience* 124:391-397.
- Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, Ferguson D, Tsai HC, Pomeranz L, Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han MH (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 493:532-536.
- Chen YW, Rada PV, Bützler BP, Leibowitz SF, Hoebel BG (2012). Corticotropin-releasing factor in the nucleus accumbens shell induces swim depression, anxiety, and anhedonia along with changes in local dopamine/acetylcholine balance. *Neuroscience* 206:155-166.
- 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. *The Journal of Neuroscience* 27:2025-2034.
- Christianson JP, Paul ED, Irani M, Thompson BM, Kubala KH, Yirmiya R, Watkins LR, Maier SF (2008). The role of prior stressor controllability and the dorsal raphe nucleus in sucrose preference and social exploration. *Behavioural Brain Research* 193:87-93.
- Christianson JP, Fernando ABP, Kazama AM, Jovanovic T, Ostroff LE, Sangha S (2012). Inhibition of Fear by Learned Safety Signals: A Mini-Symposium Review. *Journal of Neuroscience* 32:14118-14124.
- Christianson JP, Greenwood BN (2014). Stress-protective neural circuits: not all roads lead through the prefrontal cortex. *Stress* 17:1-12.
- Chung KKK, Martinez M, Herbert J (1999). c-fos expression, behavioural, endocrine and autonomic responses to acute social stress in male rats after chronic restraint: modulation by serotonin. *Neuroscience* 95:453-463.
- Clark PJ, Ghasem PR, Mika A, Day HE, Herrera JJ, Greenwood BN, Fleshner M (2014). Wheel running alters patterns of uncontrollable stress-induced c-fos mRNA expression in rat dorsal striatum direct and indirect pathways: A possible role for plasticity in adenosine receptors. *Behavioural Brain Research* 272:252-263.
- Cordero MI, Ansermet F, Sandi C (2013). Long-term programming of enhanced aggression by peripuberty stress in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 38:2758-2769.

- Cordero MI, Just N, Poirier GL, Sandi C (2016). Effects of paternal and peripubertal stress on aggression, anxiety, and metabolic alterations in the lateral septum. *European Neuropsychopharmacology* 26:357-367.
- Cordón-Morillas I (2019) Taking control to cope with stress: Consequences of controllability on behavior & gene expression. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universidad Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona).
- Cotella EM, Gómez AS, Lemen P, Chen C, Fernández G, Hansen C, Herman JP, Paglini MG (2019)- Long-term impact of chronic variable stress in adolescence versus adulthood. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 88:303-310.
- Covington HE, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, LaPlant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, Nestler EJ (2010). Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 30:16082-16090.
- Cruz FC, Marin MT, Leão RM, Planeta CS (2012a) Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 30:19-23.
- Cruz FC, Marin MT, Leão RM, Planeta CS (2012b) Stress-induced cross-sensitization to amphetamine is related to changes in the dopaminergic system. *Journal of Neural Transmission* 119:415-424.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:547-569.
- Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology* 332:1-20.
- 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.
- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (2008). Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain structure & function* 213:63-72.
- Cumming MJ, Thompson MA, McCormick CM (2014). Adolescent social instability stress increases aggression in a food competition task in adult male Long-Evans rats. *Developmental Psychobiology* 56:1575-1588.
- Da Silva NL, Moares Ferreira VM, Carobrez ADEP, Morato GS (1996). Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. *Physiology & Behavior* 60:1391-1396.
- Daftry SS, Panksepp J, Dong Y, Saal DB (2009). Stress-induced, glucocorticoid-dependent strengthening of glutamatergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons. *Neuroscience Letters* 452:273-276.

- Dallman MF, Jones MT (1973). Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92:1367.
- Dalton VS, Zavitsanou K (2010). Differential treatment regimen-related effects of cannabinoids on D1 and D2 receptors in adolescent and adult rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 40:272-280.
- 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. *Behavioural Brain Research* 114:175-181.
- D'Aquila PS, Willner P (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & Behavior* 56:861-867.
- D'Aquila PS, Galistu A (2012). Possible role of dopamine D1-like and D2-like receptors in behavioural activation and evaluation of response efficacy in the forced swimming test. *Neuropharmacology* 62:1717-1729.
- D'Aquila PS, Galistu A (2019). Imipramine administered before the first of two forced swim sessions results in reduced immobility in the second session 24 h later. *Behavioural Brain Research* 373:112088.
- Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD (2011). Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learning and Memory* 18:136-143.
- Daviu N, Fuentes S, Nadal R, Armario A (2010). A single footshock causes long-lasting hypoactivity in unknown environments that is dependent on the development of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 94:183-190.
- Daviu N, Andero R, Armario A, Nadal R (2014). Sex differences in the behavioural and hypothalamic-pituitary-adrenal response to contextual fear conditioning in rats. *Hormones and Behavior* 66:713-723.
- 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. *European Journal of Neuroscience* 14:1143-1152.
- de Goeij DCE, Jezova D, Tilders FJH (1992). Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Research* 577:165-168.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M (1998). Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 19:269-301.
- De Kloet ER (2013). Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: Mediating, multitasking, coordinating, integrating. *European Journal of Pharmacology* 719:53-62.
- Den ML, Richardson R (2013). Enhanced sensitivity to learning fearful associations during adolescence. *Neurobiology of Learning and Memory* 104:92-102.

- Deroche V, Marinelli M, Maccari S, Le Moal M, Simon H, Piazza PV (1995). Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. *The Journal of Neuroscience* 15:7181-88.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL (1997). Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65:360-368.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of Neuroscience* 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. *The Journal of Neuroscience* 29:393-401.
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ, Costa RM, Sousa N (2009). Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science* 325:621-625.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71:469-480.
- 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. *The Journal of Neuroscience* 13:3839-3847.
- Doherty MD, Gratton A (1996). Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: An electrochemical study in freely-behaving rats. *Brain Research* 715:86-97.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiology & Behavior* 97:484-494.
- Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2016). Reward-centricity and attenuated aversions: An adolescent phenotype emerging from studies in laboratory animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 70:121-134.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2003). Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: Effects of social isolation. *Physiology and Behavior* 80:317-325.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: Impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Developmental Psychobiology* 45:153-162.
- Drysdale AT, Hartley CA, Pattwell SS, Ruberry EJ, Somerville LH, Compton SN, Lee FS, Casey BJ, Walkup JT (2014). Fear and anxiety from principle to practice: Implications for when to treat youth with anxiety disorders. *Biological Psychiatry* 75:e19-e20.

- Duarte JO, Cruz FC, Leão RM, Planeta CS, Crestani CC (2015). Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. *Psychosomatic Medicine* 77:186-199.
- Duncan GE, Paul IA, Harden TK, Mueller RA, Stumpf WE, Breese GR (1985). Rapid down regulation of beta adrenergic receptors by combining antidepressant drugs with forced swim: A model of antidepressant-induced neural adaptation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 234:402-408.
- Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 37:39-47.
- Elizalde N, Pastor PM, Garcia-García ÁL, Serres F, Venzala E, Huarte J, Ramírez MJ, Del Rio J, Sharp T, Tordera RM (2010). Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: Chronic mild stress and decreased expression of VGLUT1. *Journal of Neurochemistry* 114:1302-1314.
- Ellis BJ, Boyce WT, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ, Van Ijzendoorn MH (2011). Differential susceptibility to the environment: An evolutionary- neurodevelopmental theory. *Development and Psychopathology* 23:7-28.
- Engeland WC, Arnhold MM (2005). Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28:325-332.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic- pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25:132-149.
- Ernst M, Fudge JL (2009). A developmental neurobiological model of motivated behavior: Anatomy, connectivity and ontogeny of the triadic nodes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33:367-382.
- Ernst M, Romeo RD, Andersen SL (2009). Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: A window into a neural systems model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 93:199-211.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Zapata A, Núñez JF, Tobeña A (1993). Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacological Research* 28:53-58.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P (1999) Inbred roman high- and low- avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiology & Behavior* 67:19-26.
- Evangelista S, Borsini F, Meli A (1987) Evidence that muscimol acts in the forced swimming test by activating the rat dopaminergic system. *Life Sciences* 41:2679-2684.
- Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG (2010). Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *Journal of Neuroendocrinology* 22:846-861.
- Falco AM, McDonald CG, Bachus SE, Smith RF (2014). Developmental alterations in locomotor and anxiety-like behavior as a function of D1 and D2 mRNA expression. *Behavioural Brain Research* 260:25-33.

- Fendt M, Fanselow MS (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23:743-760.
- Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *European Journal of Neuroscience* 18:2357-2364.
- File SE, Seth P (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology* 463:35-53.
- Finlay JM, Zigmond MJ (1997). The effects of stress on central dopaminergic neurons: Possible clinical implications. *Neurochemical Research* 22:1387-1394.
- Flak JN, Solomon MB, Jankord R, Krause EG, Herman JP (2012). Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 36:2547-2555.
- Foilib AR, Lui P, Romeo RD (2011). The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *Journal of Endocrinology* 210:391-398.
- Fontes MAP, Xavier CH, de Menezes RCA, DiMicco JA (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184:64-74.
- Fox ME, Chandra R, Menken MS, Larkin EJ, Nam H, Engeln M, Francis TC, Lobo MK (2018). Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior. *Molecular Psychiatry*.
- Francis TC, Chandra R, Friend DM, Finkel E, Dayrit G, Miranda J, Brooks JM, Iñiguez SD, O'Donnell P, Kravitz A, Lobo MK (2015). Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biological Psychiatry* 77:212-222.
- Francis TC, Chandra R, Gaynor A, Konkalmatt P, Metzbower SR, Evans B, Engeln M, Blanpied TA, Lobo MK (2017). Molecular basis of dendritic atrophy and activity in stress susceptibility. *Molecular Psychiatry* 22:1512-1519.
- Friemel CM, Spanagel R, Schneider M (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4:1-10.
- Galatzer-Levy IR, Moscarello J, Blessing EM, Klein JA, Cain CK, LeDoux JE (2014). Heterogeneity in signaled active avoidance learning: Substantive and methodological relevance of diversity in instrumental defensive responses to threat cues. *Frontiers in Systems Neuroscience* 8:1-12.
- García A, Martí O, Vallès A, Dal-Zotto S, Armario A (2000). Recovery of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress. *Neuroendocrinology* 72:114-125.
- García-Marquez C, Armario A (1987a). Interaction between chronic stress and clomipramine treatment in rats. Effects on exploratory activity, behavioral despair, and pituitary-adrenal function. *Psychopharmacology* 93:77-81.

- García-Marquez C, Armario A (1987b). Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiology and Behavior* 40:33-38.
- Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, Santos A, Del Arco A, Segovia G, Mora F (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: Relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission* 120:829-843.
- Goble KH, Bain ZA, Padow VA, Lui P, Klein ZA, Romeo RD (2011). Pubertal-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity and cytokine secretion in response to an immunological stressor. *Journal of Neuroendocrinology* 23:129-135.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent III Tf, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *PNAS* 101:8147-8179.
- Goldman L, Winget C, Hollingshead GW, Levine S (1973). Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology* 12:199-211.
- Goldstein DS, Kopin IJ (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress* 10:109-120.
- Gomes FV, Grace AA (2017). Prefrontal cortex dysfunction increases susceptibility to schizophrenia-like changes induced by adolescent stress exposure. *Schizophrenia Bulletin* 43:592-600.
- Gomez F, Houshyar H, Dallman MF (2002). Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. *Endocrinology* 143:2852-2862.
- Gómez F, Lahmame A, De Kloet R, Armario A (1996). Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: Differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 63:327-337.
- Gómez-Román A, Ortega-Sánchez JA, Rotllant D, Gagliano H, Belda X, Delgado-Morales R, Marín-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.
- Green MR, Barnes B, McCormick CM (2013). Social instability stress in adolescence increases anxiety and reduces social interactions in adulthood in male long-evans rats. *Developmental Psychobiology* 55:849-859.
- Grønli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiology and Behavior* 84:571-577.
- Gruss M, Abraham A, Schäble S, Becker S, Braun K (2010). Cognitive training during infancy and adolescence accelerates adult associative learning: Critical impact of age,

stimulus contingency and training intensity. *Neurobiology of Learning and Memory* 94:329-340.

Guyer AE, Silk JS, Nelson EE (2016). The neurobiology of the emotional adolescent: From the inside out. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 70:74-85.

Hale MW, Lowry CA (2015). Brain monoaminergic systems in stress neuroendocrinology. Russell J, Shipston M (Eds). In: *Neuroendocrinology of Stress* 19-42. John Wiley & Sons

Hall FS (1998). Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology* 12:129-162.

Hamilton PJ, Burek DJ, Lombroso SI, Neve RL, Robison AJ, Nestler EJ, Heller EA (2018). Cell-type-specific epigenetic editing at the *fosb* gene controls susceptibility to social defeat stress. *Neuropsychopharmacology* 43:272-284.

Hardin J, Hilbe JM (2003). *Generalized Estimating Equations*. 2nd ed. Chapman and Hall/CRC, 1-277.

Harris JR (1995). Where is the child's environment? A group socialisation theory of development. *Psychological Review* 102:458-489.

Harris RBS, Zhou JUN, Youngblood BD, Smagin GN, Ryan DH (1998). Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiology & behavior* 63:91-100.

Hartley CA, Gorun A, Reddan MC, Ramirez F, Phelps EA (2014). Stressor controllability modulates fear extinction in humans. *Neurobiology of Learning and Memory* 113:149-156.

Hascup ER, Hascup KN, Stephens M, Pomerleau F, Huettl P, Gratton A, Gerhardt GA (2010). Rapid microelectrode measurements and the origin and regulation of extracellular glutamate in rat prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 115:1608-1620.

Hatalova H, Radostova D, Pistikova A, Vales K, Stuchlik A (2017). Detrimental effect of clomipramine on hippocampus-dependent learning in an animal model of obsessive-compulsive disorder induced by sensitization with d2/d3 agonist quinpirole. *Behavioural Brain Research* 317:210-217.

Hefner K, Holmes A (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research* 176:210-215.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:555-579.

Helmreich D, Watkins L, Deak T, Maier S, Akil H, Watson SJ (1999). The effect of stressor controllability on stress-induced neuropeptide mRNA expression within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* 11:1-8.

Henckens MJAG, Deussing JM, Chen A (2016). Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nature Reviews Neuroscience* 17:636-651.

Henderson RK, Snyder HR, Gupta T, Banich MT (2012). When does stress help or harm? The effects of stress controllability and subjective stress response on Stroop performance. *Frontiers in Psychology* 3:1-15.

- Herman JP, Cullinan WE, Morano MI, Akil H, Watson SJ (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Journal of Neuroendocrinology* 7:475-482.
- Herman JP, Cullinan WE (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in neurosciences* 20:78-84.
- Herman JP, Dolgas C, Carlson S (1998). Ventral subiculum regulates HPA and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86:449-459.
- 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. *Frontiers Neuroendocrinology* 24:151-180.
- Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H, Cullinan WE (2005). Neurocircuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress response - an overview. Steckler T, Kalin NH, Reul JM (Eds) in: *Handbook of stress and the brain* 15:405-418.
- Herman JP, Mueller NK (2006). Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behavioural Brain Research* 174:215-224.
- Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology* 6:603-621.
- Hetzel A, Rosenkranz JA (2014). Distinct effects of repeated restraint stress on basolateral amygdala neuronal membrane properties in resilient adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 39:2114-2130.
- Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi Shigetada S (2010). Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896-907.
- Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Sasaoka T, Wang Y, Nakanishi S (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:342-347.
- Hinwood M, Tynan RJ, Day TA, Walker FR (2011). Repeated social defeat selectively increases Δ fosB expression and histone h3 acetylation in the infralimbic medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 21:262-271.
- Hodges TE, Green MR, Simone JJ, McCormick CM (2014). Effects of social context on endocrine function and Zif268 expression in response to an acute stressor in adolescent and adult rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 35:25-34.
- Hol T, Van Den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behavioural Brain Research* 100:91-97.
- Holly EN, Debold JF, Miczek KA (2015). Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress: Modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 232:4469-4479.

- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-1244.
- Horii Y, Kawaguchi M, Ohta R, Hirano A, Watanabe G, Kato N, Himi T, Taya K (2012). Male hatano high-avoidance rats show high avoidance and high anxiety-like behaviors as compared with male low-avoidance rats. *Experimental Animals* 61:517-524.
- Horovitz O, Tsoory MM, Yovell Y, Richter-Levin G (2014). A rat model of pre-puberty (Juvenile) stress-induced predisposition to stress-related disorders: Sex similarities and sex differences in effects and symptoms. *World Journal of Biological Psychiatry* 15:36-48.
- Horvitz JC (2000). Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96:651-656.
- Humphries MD, Prescott TJ (2010). The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Progress in neurobiology* 90:385-417.
- Hunt PS, Barnet RC, Shea ME, Baker EM (2006). Cholinergic modulation of trace conditioning trained in serial compound: A developmental analysis. *Neurobiology of Learning and Memory* 86:311-321.
- Ieraci A, Mallei A, Popoli M (2016). Social isolation stress induces anxious-depressive-like behavior and alterations of neuroplasticity-related genes in adult male mice. *Neural Plasticity* 2016.
- Ilin Y, Richter-Levin G (2009b). Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by Juvenile stress. *PLoS ONE* 4.
- Ilin Y, Richter-Levin G (2009a). ERK2 and CREB activation in the amygdala when an event is remembered as "fearful" and not when it is remembered as "instructive". *Journal of Neuroscience Research* 87:1823-1831.
- 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 Research* 538:111-117.
- Inglis FM, Moghaddam B (1999). Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry* 72:1088-1094.
- Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14:636-648.
- Ishida Y, Hashiguchi H, Ishizuka Y, Todaka K, Kuwahara I, Mitsuyama Y, Nishimori T (2000). Basal expression of c-Fos and Zif268 in the rat basal ganglia: Immunohistochemical characterization of striatal Zif268-positive neurons. *European Journal of Neuroscience* 12:771-775.
- Ito W, Pan BX, Yang C, Thakur S, Morozov A (2009). Enhanced generalization of auditory conditioned fear in juvenile mice. *Learning and Memory* 16:187-192.

- Jaggar M, Weisstaub N, Gingrich JA, Vaidya VA (2017). 5-HT_{2A} receptor deficiency alters the metabolic and transcriptional, but not the behavioral, consequences of chronic unpredictable stress. *Neurobiology of Stress* 7:89-102.
- Jankord R, Herman JP (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148:64-73.
- Jankord R, Solomon MB, Alibert J, Flak JN, Zhang R, Herman JP (2011). Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology* 152:629-638.
- Jett JD, Bulin SE, Hatherall LC, McCartney CM, Morilak DA (2017). Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 346:284-297.
- Jiao X, Pang KC, Beck KD, Minor TR, Servatius RJ (2011). Avoidance perseveration during extinction training in Wistar-Kyoto rats: An interaction of innate vulnerability and stressor intensity. *Behavioral brain research* 221:98-107.
- Joëls M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, Van Riel E, Verkuyl M, Lucassen PJ, Krugers HJ (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress* 7:221-231.
- Johnson DC, Casey BJ (2015). Extinction during memory reconsolidation blocks recovery of fear in adolescents. *Scientific Reports* 5:1-5.
- Joseph MH, Datla K, Young AMJ (2003). The interpretation of the measurement of nucleus accumbens dopamine by in vivo dialysis: The kick, the craving or the cognition? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:527-541.
- Kabbaj M, Isgor C, Watson SJ, Akil H (2002). Stress during adolescence alters behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience* 113:395-400.
- Karanges EA, Ramos L, Dampney B, Suraev AS, Li KM, McGregor IS, Hunt GE (2016). Contrasting regional Fos expression in adolescent and young adult rats following acute administration of the antidepressant paroxetine. *Brain Research Bulletin* 121:246-254.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrinology Review* 5:1-24.
- Kellogg CK, Awatramani GB, Piekut DT (1998). Adolescent development alters stressor-induced Fos immunoreactivity in rat brain. *Neuroscience* 83:681-689.
- Kern S, Oakes TR, Stone CK, McAuliff EM, Kirschbaum C, Davidson RJ (2008). Glucose metabolic changes in the prefrontal cortex are associated with HPA axis response to a psychosocial stressor. *Psychoneuroendocrinology* 33:517-529.
- Kerr DL, McLaren DG, Mathy RM, Nitschke JB (2012). Controllability modulates the anticipatory response in the human ventromedial prefrontal cortex. *Frontiers in Psychology* 3:1-11.
- Khibnik LA, Beaumont M, Doyle M, Heshmati M, Slesinger PA, Nestler EJ, Russo SJ (2016). Stress and cocaine trigger divergent and cell type-specific regulation of synaptic transmission at single spines in nucleus accumbens. *Biological Psychiatry* 79:898-905.

- Kim JH, Li S, Richardson R (2011). Immunohistochemical analyses of long-term extinction of conditioned fear in adolescent rats. *Cerebral Cortex* 21:530-538.
- King D, Zigmond MJ, Finlay JM (1997). Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on the stress-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 77:141-153.
- Klein ZA, Padow VA, Romeo RD (2010). The effects of stress on play and home cage behaviors in adolescent male rats. *Developmental Psychobiology* 52:62-70.
- Konkle ATM, Baker SL, Kentner AC, Barbagallo LSM, Merali Z, Bielajew C (2003). Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: Sex and strain compared. *Brain Research* 992:227-238.
- Konkle ATM, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C (2010). Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49:427-436.
- Koolhaas JM, Schuurman T, Wiepkema PR (1980). The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. *Progress in Neurobiology* 15:247-268.
- 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. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23:925-935.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wöhr M, Fuchs E (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:1291-1301.
- Korosi A, Baram TZ (2008). The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European Journal of Pharmacology* 583:204-214.
- Kovács KJ, Miklós IH, Bali B (2005). Psychological and physiological stressors. Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM (Eds) in: *Handbook of stress and the brain* 15:775-792. Elsevier
- Kubala KH, Christianson JP, Kaufman RD, Watkins LR, Maier SF (2012). Short- and long-term consequences of stressor controllability in adolescent rats. *Behavioural Brain Research* 234:278-284.
- Kumamoto H, Yamaguchi T, Konno K, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M (2018). Repeated fluvoxamine treatment recovers early postnatal stress-induced hypersociability-like behavior in adult rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 136:1-8.
- Kushner MG, Riggs DS, Foa EB, Miller SM (1993). Perceived controllability and the development of posttraumatic stress disorder (PTSD) in crime victims. *Behaviour Research and Therapy* 31:105-110.
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiological Reviews* 89:535-606.

- Lahmame A, del Arco C, Pazos A, Yritia M, Armario A (1997). Are Wistar-Kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants? *European Journal of Pharmacology* 337:115-123.
- Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Cigarroa I, Gagliano H, Fuentes S, Armario A, Capdevila L, Escorihuela RM (2015). Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in Male and female rats. *Scientific Reports* 5:1-11.
- Land C, Spear NE (2004). Fear conditioning is impaired in adult rats by ethanol doses that do not affect periadolescents. *International Journal of Developmental Neuroscience* 22:355-362.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:19-31.
- Lazarus R (1993). From Psychological Stress to the Emotions: A History of Changing Outlooks. *Annual Review of Psychology* 44:1-21.
- Le L, Morina N, Schnyder U, Schick M, Bryant RA, Nickerson A (2018). The effects of perceived torture controllability on symptom severity of posttraumatic stress, depression and anger in refugees and asylum seekers: A path analysis. *Psychiatry Research* 264:143-150.
- LeDoux J (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology* 46:209-235.
- LeDoux JE, Moscarello J, Sears R, Campese V (2017). The birth, death and resurrection of avoidance: A reconceptualization of a troubled paradigm. *Molecular Psychiatry* 22:24-36.
- Lee TTY, Hill MN (2013). Age of stress exposure modulates the immediate and sustained effects of repeated stress on corticolimbic cannabinoid CB1 receptor binding in male rats. *Neuroscience* 249:106-114.
- Lenroot RK, Gogtay N, Greenstein DK, Wells EM, Wallace GL, Clasen LS, Blumenthal JD, Lerch J, Zijdenbos AP, Evans AC, Thompson PM, Giedd JN (2007). Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. *NeuroImage* 36:1065-1073.
- Letica-Crepulja M, Salcioglu E, Frančišković T, Basoglu M (2011). Factors associated with posttraumatic stress disorder and depression in war survivors displaced in Croatia. *Croatian Medical Journal* 52:709-717.
- Leussis MP, Andersen SL (2008). Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse* 62:22-30.
- Levine S, Wetzel A (1963). Infantile experiences, strain differences and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 56:879-881.
- Levine S (2005). Stress: an historical perspective. Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM (Eds.), *Handbook of Stress and the Brain*, vol 15:3-23. Elsevier B.V.
- Li C, Liu Y, Yin S, Lu C, Liu D, Jiang H, Pan F (2015). Long-term effects of early adolescent stress: Dysregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central corticotropin releasing factor receptor 1 expression in adult male rats. *Behavioural Brain Research* 288:39-49.

- Lichtenberg NT, Kashtelyan V, Burton AC, Bissonette GB, Roesch MR (2014). Nucleus accumbens core lesions enhance two-way active avoidance. *Neuroscience* 258:340-346.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5734-5738.
- Liu X, Tang X, Sanford LD (2009). Stressor controllability and Fos expression in stress regulatory regions in mice. *Physiology and Behavior* 97:321-326.
- Lobo MK, Zaman S, Damez-Werno DM, Koo JW, Bagot RC, DiNieri JA, Nugent A, Finkel E, Chaudhury D, Chandra R, Riberio E, Rabkin J, Mouzon E, Cachepe R, Cheer JF, Han MH, Dietz DM, Self DW, Hurd YL, Vialou V, Nestler EJ (2013). Δ FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *Journal of Neuroscience* 33:18381-18395.
- Lovelock DF, Deak T (2019). Acute stress imposed during adolescence yields heightened anxiety in Sprague Dawley rats that persists into adulthood: Sex differences and potential involvement of the Medial Amygdala. *Brain Research* 1723:146392.
- Lucas M, Ilin Y, Anunu R, Kehat O, Xu L, Desmedt A, Richter-Levin G (2014). Long-term effects of controllability or the lack of it on coping abilities and stress resilience in the rat. *Stress* 17:423-430.
- Luciana M (2013). Adolescent brain development in normality and psychopathology. *Development and Psychopathology* 25:1325-1345.
- Lui P, Padow VA, Franco D, Hall BS, Park B, Klein ZA, Romeo RD (2012). Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. *Physiology and Behavior* 107:104-111.
- Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL (2009). Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Hormones and Behavior* 55:248-256.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Review Neuroscience* 10:434-445.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
- Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M (2015). Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Research* 1616:88-100.
- MacGibbon GA, Lawlor PA, Hughes P, Young D, Dragunow M (1995). Differential expression of inducible transcription factors in basal ganglia neurons. *Molecular Brain Research* 34:294-302.
- Magalhães R, Barrière DA, Novais A, Marques F, Marques P, Cerqueira J, Sousa JC, Cachia A, Boumezeur F, Bottlaender M, Jay TM, Mériaux S, Sousa N (2018). The dynamics of

stress: a longitudinal MRI study of rat brain structure and connectome. *Molecular Psychiatry* 23:1998-2006.

Maier SF (1970). Failure to escape traumatic electric shock: Incompatible skeletal-motor responses or learned helplessness? *Learning and Motivation* 1:157-169.

Maier SF, Ryan SM, Barksdale CM, Kalin NH (1986). Stressor Controllability and the Pituitary-Adrenal System. *Behavioral Neuroscience* 100:669-674.

Maier SF, Watkins LR (1998). Stressor controllability, anxiety and serotonin. *Therapy* 22:595-613.

Maier SF (2001). Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biological Psychiatry* 49:763-773.

Maier SF (2015). Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: Medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiology of Stress* 1:12-22.

Maier SF, Seligman MEP (2016). Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. *Psychological Review* 123:349-367.

Marcolin ML, Hodges TE, Baumbach JL, McCormick CM (2019). Adolescent social stress and social context influence the intake of ethanol and sucrose in male rats soon and long after the stress exposures. *Developmental Psychobiology* 61:81-95.

Marín-Blasco I, Muñoz-Abellán C, Andero R, Nadal R, Armario A (2018). Neuronal activation after prolonged immobilization: Do the same or different neurons respond to a novel stressor? *Cerebral Cortex* 28:1233-1244.

Markus R, Panhuysen G, Tuiten A, Koppeschaar H (2000). Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiology and Behavior* 70:333-342.

Marquez C, Nadal R, Armario A (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123:601-612.

Márquez C, Poirier GL, Cordero MI, Larsen MH, Groner A, Marquis J, Magistretti PJ, Trono D, Sandi C (2013). Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Translational psychiatry* 3.

Marti O, Armario A (1998). Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Devl Neuroscience* 16:241-260.

Martí J, Armario A (1993). Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. *European Journal of Pharmacology* 236:295-299.

Masini CV, Sauer S, Campeau S (2005). Ferret odor as a processive stress model in rats: neurochemical, behavioral, and endocrine evidence. *Brain, behavior, and immunity* 22:629.

- Maslova LN, Bulygina VV, Markel AL (2002a). Chronic stress during prepubertal development: Immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology* 27:549-561.
- Maslova LN, Bulygina VV, Popova NK (2002b). Immediate and long-lasting effects of chronic stress in the prepubertal age on the startle reflex. *Physiology and Behavior* 75:217-225.
- Mason JW (1971). A re-evaluation of the concept of 'non-specificity' in stress theory. *Journal of Psychiatric Research* 8:323-333.
- Mathews IZ, Mills RG, McCormick CM (2008b). Chronic social stress in adolescence influenced both amphetamine conditioned place preference and locomotor sensitization. *Developmental Psychobiology* 50:451-459.
- Mathews IZ, Wilton A, Styles A, McCormick CM (2008a). Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. *Behavioural Brain Research* 190:33-40.
- McCormick CM, Robarts D, Gleason E, Kelsey JE (2004). Stress during adolescence enhances locomotor sensitization to nicotine in adulthood in female, but not male, rats. *Hormones and Behavior* 46:458-466.
- McCormick CM, Robarts D, Kopeikina K, Kelsey JE (2005). Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Hormones and behavior* 48:64-74.
- McCormick CM, Merrick A, Secen J, Helmreich DL (2007). Social instability in adolescence alters the central and peripheral hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a repeated homotypic stressor in male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 19:116-126.
- McCormick CM, Smith C, Mathews IZ (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research* 187:228-238.
- McCormick CM, Nixon F, Thomas C, Lowie B, Dyck J (2010). Hippocampal cell proliferation and spatial memory performance after social instability stress in adolescence in female rats. *Behavioural Brain Research* 208:23-29.
- McCormick CM, Thomas CM, Sheridan CS, Nixon F, Flynn JA, Mathews IZ (2012). Social instability stress in adolescent male rats alters hippocampal neurogenesis and produces deficits in spatial location memory in adulthood. *Hippocampus* 22:1300-1312.
- McCormick CM, Mongillo DL, Simone JJ (2013b). Age and adolescent social stress effects on fear extinction in female rats. *Stress* 16:678-688.
- McCormick CM, Green MR, Cameron NM, Nixon F, Levy MJ, Clark RA (2013a). Deficits in male sexual behavior in adulthood after social instability stress in adolescence in rats. *Hormones and Behavior* 63:5-12.
- McCormick CM, Cameron NM, Thompson MA, Cumming MJ, Hodges TE, Langett M (2017b). The sexual preference of female rats is influenced by males' adolescent social stress history and social status. *Hormones and Behavior* 89:30-37.

- McCormick CM, Green MR, Simone JJ (2017a). Translational relevance of rodent models of hypothalamic-pituitary-adrenal function and stressors in adolescence. *Neurobiology of Stress* 6:31-43.
- McCulloch C, Searle S (2010). *Generalized, linear and mixed models*. John Wiley & Sons, New York.
- McCullough LD, Sokolowski JD, Salamone JD (1993). A neurochemical and behavioral investigation of the involvement of nucleus accumbens dopamine in instrumental avoidance. *Neuroscience* 52:919-925.
- McEwen BS, Stellar E (1993) Stress and the Individual. *Arch Intern Med* 153:2093-2101.
- McEwen BS (1998) Protective and damaging effects of stress mediators. *The New England Journal of Medicine* 338:171-179.
- McEwen BS (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 886:172-189.
- McEwen BS, Nasca C, Gray JD (2016). Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 41:3-23.
- McKlveen JM, Myers B, Herman JP (2015). The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. *Journal of Neuroendocrinology* 27:446-456.
- Merali Z, Levac C, Anisman H (2003). Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. *Biological Psychiatry* 54:552-565.
- Miklós IH, Kovács KJ (2002). Gabaergic Innervation of Corticotropin-Releasing Hormone (Crh)-Secreting Parvocellular Neurons and Its Plasticity As Demonstrated By Quantitative Immunoelectron Microscopy. *Neuroscience* 113:581-592.
- Moghaddam B (1993). Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *Journal of Neurochemistry* 60:1650-1657.
- Molendijk ML, de Kloet ER (2015). Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 62:389-391.
- Moll GH, Mehnert C, Wicker M, Bock N, Rothenberger A, Rüter E, Huether G (2000). Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. *Developmental Brain Research* 119:251-257.
- Monahan KC, Guyer AE, Silk J, Fitzwater T, Steinberg L (2016). Integration of developmental neuroscience and contextual approaches to the study of adolescent psychopathology. Cicchetti D (Eds). In: *Developmental Psychopathology, Third Edition* 720-765. John Wiley & Sons.
- Monsey MS, Boyle LM, Zhang ML, Nguyen CP, Kronman HG, Ota KT, Duman RS, Taylor JR, Shafe GE (2014). Chronic corticosterone exposure persistently elevates the expression of memory-related genes in the lateral amygdala and enhances the consolidation of a pavlovian fear memory. *PLoS ONE* 9 (3): e91530.

- Morgan MJ, Einon D, Morris RGM (1977). Inhibition and isolation rearing in the rat: Extinction and satiation. *Physiology and Behavior* 18:1-5.
- Mormede P, Dantzer R, Michaud B, Kelley KW, Le Moal M (1988). Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats. *Physiology and Behavior* 43:577-583.
- Morrissey MD, Mathews IZ, McCormick CM (2011). Enduring deficits in contextual and auditory fear conditioning after adolescent, not adult, social instability stress in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 95:46-56.
- Mosaferi B, Babri S, Ebrahimi H, Mohaddes G (2015). Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. *Physiology and Behavior* 142:131-136.
- Moscarello JM, Hartley CA (2017). Agency and the calibration of motivated behavior. *Trends in Cognitive Sciences* 21:725-735.
- Mueller NK, Dolgas CM, Herman JP (2004). Stressor-selective role of the ventral subiculum in regulation of neuroendocrine stress responses. *Endocrinology* 145:3763-3768.
- Muir J, Lorsch ZS, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Nestler EJ, Calipari ES, Bagot RC (2018). In vivo fiber photometry reveals signature of future stress susceptibility in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 43:255-263.
- Müller MJ (2011). Helplessness and perceived pain intensity: Relations to cortisol concentrations after electrocutaneous stimulation in healthy young men. *BioPsychoSocial Medicine* 5:17-20.
- Murua VS, Gomez RA, Andrea ME, Molina VA (1991). Shuttle-box deficits induced by chronic variable stress: Reversal by imipramine administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 38:125-130.
- 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 Structure and Function* 219:1287-1303.
- Myers B, Scheimann JR, Franco-Villanueva A, Herman JP (2017). Ascending mechanisms of stress integration: Implications for brainstem regulation of neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 74:366-375.
- Naber PA, Witter MP (1998). Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 297:284-297.
- Naneix F, Marchand AR, Di Scala G, Pape J-R, Coutureau E (2012). Parallel Maturation of Goal-Directed Behavior and Dopaminergic Systems during Adolescence. *Journal of Neuroscience* 32:16223-16232.
- Naneix F, Marchand AR, Pichon A, Pape JR, Coutureau E (2013). Adolescent stimulation of D2 receptors alters the maturation of dopamine-dependent goal-directed behavior. *Neuropsychopharmacology* 38:1566-1574.

- Nestler EJ (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature Reviews Neuroscience* 2:119-128.
- Nestler EJ (2015). Δ fosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *European Journal of Pharmacology* 753:66-72.
- Nikulina EM, Arrillaga-Romany I, Miczek KA, Hammer RP (2008). Long-lasting alteration in mesocorticolimbic structures after repeated social defeat stress in rats: Time course of μ -opioid receptor mRNA and FosB/ Δ FosB immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience* 27:2272-2284.
- Nostramo R, Sabban EL (2015) Stress and Sympathoadrenomedullary Mechanisms. Russell J, Shipston M (Eds.) in: *Neuroendocrinology of Stress* 95-120. John Wiley & Sons.
- Novak CM, Parfitt DB, Sisk CL, Smale L (2007). Associations between behavior, hormones, and Fos responses to novelty differ in pre- and post-pubertal grass rats. *Physiology and Behavior* 90:125-132.
- Novick AM, Forster GL, Tejani-Butt SM, Watt MJ (2011). Adolescent social defeat alters markers of adult dopaminergic function. *Brain Research Bulletin* 86:123-128.
- Novick AM, Miiller LC, Forster GL, Watt MJ (2013). Adolescent social defeat decreases spatial working memory performance in adulthood. *Behavioral and Brain Functions* 9:1-11.
- Novick AM, Mears M, Forster GL, Lei Y, Tejani-Butt SM, Watt MJ (2016). Adolescent social defeat alters N-methyl-d-aspartic acid receptor expression and impairs fear learning in adulthood. *Behavioural Brain Research* 304:51-59.
- Ons S, Marti O, Armario A (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry* 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. *European Journal of Neuroscience* 31:2043-2052.
- Ortega-Sánchez JA (2018) Interacción entre estímulos estresantes emocionales y psicoestimulantes: Activación de poblaciones neuronales específicas en áreas clave del sistema nervioso central. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona).
- Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Flak JN, Richtand NM, Herman JP (2009). Chronic stress produces enduring decreases in novel stress-evoked c-fos mRNA expression in discrete brain regions of the rat. *Stress* 12:469-477.
- Otteweller JE, Servatius RJ, Tapp WN, Drastal SD, Bergen MT, Natelson BH (1992). A chronic stress state in rats: Effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. *Physiology and Behavior* 51:689-698.
- Overmier JB, Seligman MEP (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 63:28-33.
- Oztan O, Aydin C, Isgor C (2011). Chronic variable physical stress during the peripubertal-juvenile period causes differential depressive and anxiogenic effects in the novelty-seeking

phenotype: Functional implications for hippocampal and amygdalar brain-derived neurotrophic factor and the mossy fibre plasticity. *Neuroscience* 192:334-344.

Pacák K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 275:R1247-R1255.

Pacák K, Palkovits M (2001). Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews* 22:502-548.

Pacheco A, Aguayo FI, Aliaga E, Muñoz M, García-Rojo G, Olave FA, Parra-Fiedler NA, García-Pérez A, Tejos-Bravo M, Rojas PS, Parra CS, Fiedler JL (2017). Chronic stress triggers expression of immediate early genes and differentially affects the expression of AMPA and NMDA subunits in dorsal and ventral hippocampus of rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:1-20.

Padilla E, Barrett D, Shumake J, Gonzalez-Lima F (2009). Strain, sex, and open-field behavior: Factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. *Behavioural Brain Research* 201:257-264.

Padival MA, Blume SR, Vantrease JE, Rosenkranz JA (2015). Qualitatively different effect of repeated stress during adolescence on principal neuron morphology across lateral and basal nuclei of the rat amygdala. *Neuroscience* 291:128-145.

Papp M, Willner P, Muscat R (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104:255-259.

Pascucci T, Ventura R, Latagliata EC, Cabib S, Puglisi-Allegra S (2007). The medial prefrontal cortex determines the accumbens dopamine response to stress through the opposing influences of norepinephrine and dopamine. *Cerebral Cortex* 17:2796-2804.

Pastor-Ciurana J, Rabasa C, Ortega-Sánchez JA, Sanchís-Ollé M, Gabriel-Salazar M, Ginesta M, Belda X, Daviu N, Nadal R, Armario A (2014). Prior exposure to repeated immobilization or chronic unpredictable stress protects from some negative sequels of an acute immobilization. *Behavioural Brain Research* 265:155-162.

Pastor-Ciurana J (2019). Impacto de la historia previa de eestrés en la respuesta central y periférica a estímulos estresantes: adaptación versus sensibilización. Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona).

Pattwell SS, Bath KG, Casey BJ, Ninan I, Lee FS (2011). Selective early-acquired fear memories undergo temporary suppression during adolescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:1182-1187.

Pattwell SS, Duhoux S, Hartley CA, Johnson DC, Jing D, Elliott MD, Ruberry EJ, Powers A, Mehta N, Yang RR, Soliman F, Glatt CE, Casey BJ, Ninan I, Lee FS (2012). Altered fear learning across development in both mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:16318-16323.

- Pattwell SS, Bath KG (2017). Emotional learning, stress, and development: An ever-changing landscape shaped by early-life experience. *Neurobiology of Learning and Memory* 143:36-48.
- Paxinos G, Watson C (2014) Paxinos and Watson's the rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edn, Academic, San Diego.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004). Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *Journal of Neuroscience* 24:10594-10602.
- Piazza PV, Barrot M, Rouge-Pont F, Marinelli M, Maccari S, Abrous DN, Simon H, Le Moal M (1996b). Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effects on the mesolimbic dopaminergic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:15445-15450.
- Piazza PV, Rouge-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M (1996a). Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8716-8720.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SFF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bösl MRR, Lipp HP, Grant SGGN, Bliss TVP, Wolfer DP, Kuhl D (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444.
- Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, Harkness K, Menard JL (2007). Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behavioral Neuroscience* 121:462-474.
- Pol O, Campmany L, Gil M, Armario A (1992). Behavioral and neurochemical changes in response to acute stressors: Influence of previous chronic exposure to immobilization. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 42:407-412.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Prince CR, Anisman H (1990). Situation specific effects of stressor controllability on plasma corticosterone changes in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 37:613-621.
- Rabasa C, Muñoz-Abellán C, Daviu N, Nadal R, Armario A (2011). Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiology and Behavior* 103:125-133.
- 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. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 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. *The Journal of Neuroscience* 26:12967-12976.

- Radley JJ (2012). Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6:1-10.
- Radley JJ, Sawchenko PE (2015). Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *Journal of Comparative Neurology* 523:2769-2787.
- Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J (1998). Generalization of fear responses in C57BL/6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behavioural brain research* 95:179-189.
- Raineki C, Chew L, Mok P, Ellis L, Weinberg J (2016). Short- and long-term effects of stress during adolescence on emotionality and HPA function of animals exposed to alcohol prenatally. *Psychoneuroendocrinology* 74:13-23.
- Ran X, Yang Y, Meng Y, Li Y, Zhou L, Wang Z, Zhu J (2019). Distribution of D1 and D2 receptor- immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 98:97-103.
- Ren M, Cao V, Ye Y, Manji HK, Wang KH (2014). Arc regulates experience-dependent persistent firing patterns in frontal cortex. *The Journal of Neuroscience* 34:6583-6595.
- Rescorla R (1968). Pavlovian conditioned fear in Sidman avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 65:55-60.
- Rescorla R (1988). Behavioral studies of pavlovian conditioning. *Annual Review Neuroscience* 11:329-52.
- Reul JM, de Kloet ER (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.
- Rincón-Cortés M, Herman JP, Lupien S, Maguire J, Shansky RM (2019). Stress: influence of sex, reproductive status and gender. *Neurobiology of Stress* 10:1-6.
- Robinson-Drummer PA, Stanton ME (2014). Using the context preexposure facilitation effect to study long-term context memory in preweanling, juvenile, adolescent, and adult rats. *Physiology and Behavior* 148:22-28.
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annual Review of Neuroscience* 32:289-313.
- Rodrigues AJ, Leão P, Carvalho M, Almeida OFX, Sousa N (2011). Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology* 214:107-120.
- Roland, Sawchenko (1993). Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 332:123-143.
- Romeo RD, Lee SJ, Chhua N, McPherson CR, McEwen BS (2004a). Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology* 79:125-132.
- Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS (2004b). Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 80:387-393.

- Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS (2006a). Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 147:1664-1674.
- Romeo RD, Karatsoreos IN, McEwen BS (2006b). Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Hormones and Behavior* 50:463-468.
- Romeo RD, Minhas S, Svirsky SE, Hall BS, Savenkova M, Karatsoreos IN (2014). Pubertal shifts in adrenal responsiveness to stress and adrenocorticotrophic hormone in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 42:146-152.
- Romeo RD (2015). Perspectives on stress resilience and adolescent neurobehavioral function. *Neurobiology of Stress* 1:128-133.
- Rotllant D, Pastor-Ciurana J, Armario A (2013). Stress-induced brain histone H3 phosphorylation: Contribution of the intensity of stressors and length of exposure. *Journal of Neurochemistry* 125:599-609.
- Rougé-Pont F, Marinelli M, Le Moal M, Simon H, Piazza PV (1995). Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *Animals* 15:7189-7195.
- Rudy JW, Morledge P (1994). Ontogeny of contextual fear conditioning in rats: Implications for consolidation, infantile amnesia, and hippocampal system function. *Behavioral Neuroscience* 108:227-234.
- Rutter M (2013). Annual Research Review: Resilience-clinical implications. *Journal of child psychology and psychiatry* 54:474-487.
- Sadler AM, Bailey SJ (2016). Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiology & Behavior* 167:313-323.
- Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews* 83:803-834.
- Salamone JD (1994). The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behavioural Brain Research* 61:117-133.
- Salcioglu E, Urhan S, Pirinccioglu T, Aydin S (2017). Anticipatory fear and helplessness predict PTSD and depression in domestic violence survivors. *Psychological Trauma: Theory, Research, Practice, and Policy* 9:117-125.
- Salomons TV, Johnstone T, Backonja MM, Davidson RJ (2004). Perceived controllability modulates the neural response to pain. *Journal of Neuroscience* 24:7199-7203.
- Salomons TV, Johnstone T, Backonja M-m, Shackman AJ, Davidson RJ (2007). Individual differences in the effects of perceived controllability on pain perception: critical role of the prefrontal cortex. *Journal of Cognitive Neuroscience* 19:993-1003.
- Sanchís-Ollé M (2018). Caracterización del impacto diferencial de la exposición al estrés crónico controlable e incontrolable en ratas adolescentes. *Institut de Neurociències*,

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona).

Sanchís-Ollé M, Fuentes S, Úbeda-Contreras J, Lalanza JF, Ramos-Prats A, Armario A, Nadal R (2019). Controllability affects endocrine response of adolescent male rats to stress as well as impulsivity and behavioral flexibility during adulthood. *Scientific Reports* 9:1-12.

Santarelli S, Lesuis SL, Wang XD, Wagner KV, Hartmann J, Labermaier C, Scharf SH, Müller MB, Holsboer F, Schmidt MV (2014). Evidence supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology* 24:907-918.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Preparative actions. *Endocrine Reviews* 21:55-89.

Sawyer SM, Azzopardi PS, Wickremarathne D, Patton GC (2018). The age of adolescence. *The Lancet Child and Adolescent Health* 2:223-228.

Scheggi S, Leggio B, Masi F, Grappi S, Gambarana C, Nanni G, Rauggi R, De Montis MG (2002) Selective modifications in the nucleus accumbens of dopamine synaptic transmission in rats exposed to chronic stress. *Journal of Neurochemistry* 83:895-903.

Schmidt MV (2011). Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology* 36:330-338.

Schneider M (2008). Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addiction Biology* 13:253-263.

Schramm-Sapota NL, Cha YM, Chaudhry S, Wilson WA, Swartzwelder HS, Kuhn CM (2007). Differential anxiogenic, aversive, and locomotor effects of THC in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 191:867-877.

Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A (2015). Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB Journal* 29:859-867.

Seiglie MP, Smith KL, Blasio A, Cottone P, Sabino V (2015). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a depressive-like phenotype in rats. *Psychopharmacology* 232:3821-3831.

Seligman MEP, Maier SF (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology* 74:1-9.

Seligman ME, Maier SF, Geer JH (1968). Alleviation of learned helplessness in the dog. *Journal of Abnormal Psychology* 73:256-262.

Seligman MEP (1972). Learned helplessness. *Annual reviews medicine* 23:407-412.

Selye H (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138:32.

Selye H (1950). Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal* 17:1383-1392.

Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH, Biggio G (2000). Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 75:732-740.

- Servatius RJ, Ottenweller JE, Bergen MT, Soldan S, Natelson BH (1994). Persistent stress-induced sensitization of adrenocortical and startle responses. *Physiology & behavior* 56:945-954.
- Servatius RJ, Jiao X, Beck KD, Pang KCH, Minor TR (2008). Rapid avoidance acquisition in Wistar-Kyoto rats. *Behavioural Brain Research* 192:191-197.
- Shakiba N, Ellis BJ, Bush NR, Boyce WT (2019). Biological sensitivity to context: A test of the hypothesized U-shaped relation between early adversity and stress responsivity. *Development and Psychopathology* 1-20.
- Shepherd JD, Bear MF (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature Neuroscience* 14:279-284.
- Short KR, Maier SF (1993). Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 45:827-835.
- Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW (1989). A complete protocol for in situ Hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labelled single-stranded RNA probes. *Journal of Histochemistry* 12:169-181.
- Sinclair D, Purves-Tyson TD, Allen KM, Weickert CS (2014). Impacts of stress and sex hormones on dopamine neurotransmission in the adolescent brain. *Psychopharmacology* 231:1581-1599.
- Singewald GM, Nguyen NK, Neumann ID, Singewald N, Reber SO (2009). Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. *Stress* 12:58-69.
- Sisk CL, Foster DL (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience* 7:1040-1047.
- Smith BL, Morano RL, Ulrich-Lai YM, Myers B, Solomon MB, Herman JP (2018). Adolescent environmental enrichment prevents behavioral and physiological sequelae of adolescent chronic stress in female (but not male) rats. *Stress* 21:464-473.
- Snyder KP, Barry M, Valentino RJ (2015b). Cognitive impact of social stress and coping strategy throughout development. *Psychopharmacology* 232:185-195.
- Snyder K, Barry M, Plona Z, Ho A, Zhang XY, Valentino RJ (2015a). The impact of social stress during adolescence or adulthood and coping strategy on cognitive function of female rats. *Behavioural Brain Research* 286:175-183.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, David-Pereira A, Borges S, Pinto L, Costa P, Sousa N, Rodrigues AJ (2016b). Activation of D2 dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens increases motivation. *Nature Communications* 7:1-11.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, Sousa N, Rodrigues AJ (2016a). Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 68:370-386.
- Sokolowski JD, Salamone JD (1994). Effects of dopamine depletions in the medial prefrontal cortex on DRL performance and motor activity in the rat. *Brain Research* 642:20-28.
- Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24:417-463.

- Spear LP (2013). Adolescent neurodevelopment. *Journal of Adolescent Health* 52:S7-S13.
- Spencer SJ, Ebner K, Day TA (2004). Differential involvement of rat medial prefrontal cortex dopamine receptors in modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to different stressors. *European Journal of Neuroscience* 20:1008-1016.
- Spröwitz A, Bock J, Braun K (2013). Sex-specific positive and negative consequences of avoidance training during childhood on adult active avoidance learning in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:1-11.
- Stamp JA, Herbert J (1999). Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. *Neuroscience* 94:1313-1322.
- Stansfield KH, Kirstein CL (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Developmental Psychobiology* 48:10-15.
- Staples LG, McGregor IS, Apfelbach R, Hung GE (2008). Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience* 151:937-947.
- Steimer T, Driscoll P (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6:87-100.
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis, a new paradigm to explain arousal pathology. Fisher S, Reason J (Eds.) In: *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, pp 629-650. John Wiley & Sons.
- Stevenson CW, Gratton A (2003). Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 17:1287-1295.
- Steward O, Worley P (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227-240.
- Steward O, Worley P (2002). Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: Role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiology of Learning and Memory* 78:508-527.
- Sugaya N, Izawa S, Kimura K, Ogawa N, Yamada KC, Shiotsuki K, Mikami I, Hirata K, Nagano Y, Nomura S, Shimada H (2012). Adrenal hormone response and psychophysiological correlates under psychosocial stress in individuals with irritable bowel syndrome. *International Journal of Psychophysiology* 84:39-44.
- Sullivan RM, Dufresne MM (2006). Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain research* 1076:49-59.
- Suo L, Zhao L, Si J, Liu J, Zhu W, Chai B, Zhang Y, Feng J, Ding Z, Luo Y, Shi H, Shi J, Lu L (2013). Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. *Neuropsychopharmacology* 38:1387-1400.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW, Rho JH (1987). The CRH Motoneuron: Differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 512:12-23.

- Swenson RM, Vogel WH (1983). Plasma catecholamine and corticosterone as well as brain catecholamine changes during coping in rats exposed to stressful footshock. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 18:689-693.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147:5549-5556.
- Tavares RF, Corrêa FMA, Resstel LBM (2009). Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *Journal of Neuroscience Research* 87:2601-2607.
- Taylor SB, Taylor AR, Koenig JI (2013). The interaction of disrupted Type II Neuregulin 1 and chronic adolescent stress on adult anxiety- and fear-related behaviors. *Neuroscience* 249:31-42.
- Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC (1995). Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Developmental Brain Research* 89:167-172.
- Tirelli E, Laviola G, Adriani W (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:163-178.
- Toledo-Rodriguez M, Sandi C (2007). Stress before puberty exerts a sex- and age- related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. *Neural Plasticity* 2007:1-12.
- Toledo-Rodriguez M, Sandi C (2011). Stress during Adolescence Increases Novelty Seeking and Risk-Taking Behavior in Male and Female Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5:1-10.
- Toledo-Rodriguez M, Pitiot A, Paus T, Sandi C (2012). Stress during puberty boosts metabolic activation associated with fear-extinction learning in hippocampus, basal amygdala and cingulate cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 98:93-101.
- Torres C, Cándido A, Escarabajal MD, De La Torre L, Maldonado A, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2005). Successive negative contrast in one-way avoidance learning in female roman rats. *Physiology and Behavior* 85:377-382.
- Toth E, Avital A, Leshem M, Richter-Levin G, Braun K (2008). Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behavioural Brain Research* 190:135-139.
- Tsoory M, Richter-Levin G (2006). Learning under stress in the adult rat is differentially affected by 'juvenile' or 'adolescent' stress. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 9:713-728.
- Tsoory M, Cohen H, Richter-Levin G (2007). Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *European Neuropsychopharmacology* 17:245-256.
- Tsoory M, Guterma A, Richter-Levin G (2008). Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 33:378-393.

- Tsuda A, Tanaka M (1985). Differential changes in noradrenaline turnover in specific regions of rat brain produced by controllable and uncontrollable shocks. *Behavioral Neuroscience* 99:802-817.
- Turner KM, Burne THJ (2014). Comprehensive behavioural analysis of Long-Evans and Sprague-Dawley rats reveals differential effects of housing conditions on tests relevant to neuropsychiatric disorders. *PLoS ONE* 9(3): e93411.
- Tye SJ, Miller AD, Blaha CD (2009). Differential corticosteroid receptor regulation of mesoaccumbens dopamine efflux during the peak and nadir of the circadian rhythm: A molecular equilibrium in the midbrain? *Synapse* 63:982-990.
- Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493:537-541.
- Tzanoulinou S, García-Mompó C, Castillo-Gómez E, Veenit V, Nacher J, Sandi C (2014b). Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by gabaergic- related alterations in the amygdala. *PLoS ONE* 9.
- Tzanoulinou S, Riccio O, De Boer MW, Sandi C (2014a). Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. *Translational Psychiatry* 4:e410-419.
- Úbeda-Contreras J, Marín-Blasco I, Nadal R, Armario A (2018). Brain c-fos expression patterns induced by emotional stressors differing in nature and intensity. *Brain Structure and Function* 223:2213-2227.
- Uematsu A, Matsui M, Tanaka C, Takahashi T, Noguchi K, Suzuki M, Nishijo H (2012). Developmental trajectories of amygdala and hippocampus from infancy to early adulthood in healthy individuals. *PLoS ONE* 7.
- Ulrich-Lai YM, Engeland WC (2000). Hyperinnervation during adrenal regeneration influences the rate of functional recovery. *Neuroendocrinology* 71:107-123.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 291:965-973.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 10:397-409.
- Ungless MA (2004). Dopamine: The salient issue. *Trends in Neurosciences* 27:702-706.
- Ungless MA, Argilli E, Bonci A (2010). Effects of stress and aversion on dopamine neurons: Implications for addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:151-156.
- Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HEW, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001) Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *European Journal of Neuroscience* 13:1977-1983.

- 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. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 289:E823-E828.
- Van den Berg CL, Lamberts RR, Wolterink G, Wiegant VM, Van Ree JM (1998). Emotional and footshock stimuli induce differential long-lasting behavioural effects in rats; involvement of opioids. 799:6-15.
- Van Den Berg CL, Hol T, Van Ree JM, Spruijt BM, Everts H, Koolhaas JM (1999a). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental Psychobiology* 34:129-138.
- Van Den Berg CL, Pijlman FTA, Koning HAM, Diergaarde L, Van Ree JM, Spruijt BM (1999c). Isolation changes the incentive value of sucrose and social behaviour in juvenile and adult rats. *Behavioural Brain Research* 106:133-142.
- Van Den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM (1999b). Sequential analysis of juvenile isolation-induced decreased social behavior in the adult rat. *Physiology and Behavior* 67:483-488.
- van Dijken HH, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ (1992b). Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiology & Behavior* 52:945-951.
- Van Dijken HH, Van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ (1992a). Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiology and Behavior* 51:787-794.
- Vanderschuren LJM, Achterberg EJM, Trezza V (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 70:86-105.
- Varlinskaya EI, Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2010). Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96:228-235.
- Varlinskaya EI, Truxell EM, Spear LP (2013b). Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol differentially in early and late adolescent rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 113:38-45.
- Varlinskaya EI, Vogt BA, Spear LP (2013a). Social context induces two unique patterns of c-Fos expression in adolescent and adult rats. *Developmental Psychobiology* 55:684-697.
- Varlinskaya EI, Spear LP, Diaz MR (2018). Stress alters social behavior and sensitivity to pharmacological activation of kappa opioid receptors in an age-specific manner in Sprague Dawley rats. *Neurobiology of Stress* 9:124-132.
- Veenit V, Cordero MI, Tzanoulinou S, Sandi C (2013). Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:1-10.
- Veenit V, Riccio O, Sandi C (2014). CRHR1 links peripuberty stress with deficits in social and stress-coping behaviors. *Journal of Psychiatric Research* 53:1-7.

- Ver Hoeve ES, Kelly G, Luz S, Ghanshani S, Bhatnagar S (2013). Short-term and long-term effects of repeated social defeat during adolescence or adulthood in female rats. *Neuroscience* 249:63-73.
- Vertes RP (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M (2005). Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 146:137-146.
- Vicens-Costa E, Martínez-Membrives E, López-Aumatell R, Guitart-Masip M, Cañete T, Blázquez G, Tobeña A, Fernández-Teruel A (2011). Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: A dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. *Physiology and Behavior* 103:148-156.
- Vidal J, Buwalda B, Koolhaas JM (2011). Male Wistar rats are more susceptible to lasting social anxiety than Wild-type Groningen rats following social defeat stress during adolescence. *Behavioural Processes* 88:76-80.
- Vigas M (1980). Contribution to the understanding of the stress concept. Usdin, Kvetnansky R, Kopin IJ (Eds.). In: *Catecholamines and stress: Recent advances* 573-578: Elsevier North Holland, Inc.
- Voorn P, Vanderschuren LJMJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences* 27:468-474.
- Wallace RB, Kaplan RF, Werboff J (1976). Behavioral correlates of focal hippocampal x-irradiation in rats. *Experimental Brain Research* 24:343-349.
- Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL (2009). Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. *Behavioral Neuroscience* 123:564-576.
- Watt MJ, Roberts CL, Scholl JL, Meyer DL, Müller LC, Barr JL, Novick AM, Renner KJ, Forster GL (2014). Decreased prefrontal cortex dopamine activity following adolescent social defeat in male rats: Role of dopamine D2 receptors. *Psychopharmacology* 231:1627-1636.
- Watts AG (2005). Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Frontiers in Neuroendocrinology* 26:109-130.
- Weathington JM, Arnold AR, Cooke BM (2012). Juvenile social subjugation induces a sex-specific pattern of anxiety and depression-like behaviors in adult rats. *Hormones and Behavior* 61:91-99.
- Weinberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HEW, Campeau S, Spencer RL (2009). Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor

habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology* 150:749-761.

Weinberg MS, Grissom N, Paul E, Bhatnagar S, Maier SF, Spencer RL (2010). Inescapable but not escapable stress leads to increased struggling behavior and basolateral amygdala c-fos gene expression in response to subsequent novel stress challenge. *Neuroscience* 170:138-148.

Weiss JM (1971). Effects of coping behavior with and without a feedback signal on stress pathology in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 77:1-13.

Weiss JM (1972) Psychological factors in stress and disease. *Scientific American* 104-113.

Weiss JM, Glazer HI, Pohorecky LA, Brick JB, Miller NE (1975) Effects of chronic exposure to stressors on avoidance-escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosomatic Medicine* 37:522-534.

Weiss JM (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology* 134:368-370.

Wenzel JM, Oleson EB, Gove WN, Cole AB, Gyawali U, Dantrassy HM, Bluett RJ, Dryanovski DI, Stuber GD, Deisseroth K, Mathur BN, Patel S, Lupica CR, Cheer JF (2018) Phasic dopamine signals in the nucleus accumbens that cause active avoidance require endocannabinoid mobilization in the midbrain. *Current Biology* 28:1392-1404.e1395.

Wilcock J, Fulker DW (1973). Avoidance learning in rats: Genetic evidence for two distinct behavioral processes in the shuttle box. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 82:247-253.

Wiley AR, Anderson RI, Morales M, Ramirez RL, Spear L (2012). Effects of ethanol administration on corticosterone levels in adolescent and adult rats. *Alcohol* 46:29-36.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93:358-364.

Willner P (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress* 6:78-93.

Woods SC, Begg DP (2015). Regulation of the motivation to eat. Simpson E, Balsam P (Eds) In: *Behavioral Neuroscience of Motivation. Current topics in behavioral neurosciences* 15-34. Springer, Cham.

Worley, PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Barbaran JM (1991). Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:5106-5110.

Wright LD, Hébert KE, Perrot-Sinal TS (2008). Periadolescent stress exposure exerts long-term effects on adult stress responding and expression of prefrontal dopamine receptors in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:130-142.

Wulsin AC, Wick-Carlson D, Packard BA, Morano R, Herman JP (2016). Adolescent chronic stress causes hypothalamo-pituitary-adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology* 65:109-117.

Yamato T, Yamasaki S, Misumi Y, Kino M, Obata T, Aomine M (2002). Modulation of the stress response by coffee: An in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neuroscience Letters* 332:87-90.

Yetnikoff L, Reichard RA, Schwartz ZM, Parsely KP, Zahm DS (2014). Protracted maturation of forebrain afferent connections of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 522:1031-1047.

Zhang W, Rosenkranz JA (2013). Repeated restraint stress enhances cue-elicited conditioned freezing and impairs acquisition of extinction in an age-dependent manner. *Behavioural Brain Research* 248:12-24.

Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 448:217-229.