



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

UAB



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Institut de Neurociències, Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular,

Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències

NOVIEMBRE 2015

¿PUEDE EL METILFENIDATO ATENUAR EL IMPACTO DEL ESTRÉS?:

UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

HUMBERTO ANTONIO GAGLIANO

Tesis doctoral dirigida por:

Antonio Armario García

Institut de Neurociències
Unitat de Fisiologia Animal
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Roser Nadal i Alemany

Institut de Neurociències
Unitat de Psicobiologia
Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut
Facultat de Psicologia
Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

SAF2005-0358
SAF2008-O1175
SAF2011-28313
SAF2014-53876-R

Instituto de Salud Carlos III

RD06/0001/0015 y RD12/008/0014
Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo

Generalitat de Catalunya

SGR2009-16, SGR2014-1020

Plan Nacional sobre Drogas

DROG2011/021

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, Humberto Antonio Gagliano se desempeñó como Profesor Asociado en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona: 2005-2008 y se desarrolla actualmente como Técnico de soporte a la investigación (TSR) en el mismo Departamento desde 2008.

Resumen

Resumen

Estudios previos han puesto de manifiesto en rata que la administración de anfetamina seguida inmediatamente después de la exposición a distintas situaciones de estrés reduce la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), así como la hiperglucemia (índice de activación del sistema simpático-médulo-adrenal) causada por los estímulos estresantes. El efecto se localiza a nivel de SNC. Los objetivos de la presente tesis han sido ampliar el estudio de la interacción entre estrés y anfetamina y, sobre todo, demostrar que el metilfenidato (MPH), el psicoestimulante de uso mayoritario en el tratamiento del trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), es también capaz de reducir, a dosis terapéuticamente relevantes, la respuesta biológica y conductual al estrés de tipo emocional.

Los estudios se han realizado en ratas macho adultas (2-3 meses de edad), excepto en un experimento destinado a comparar los efectos del MPH en animales jóvenes y adultos. Los resultados con la anfetamina indican, de acuerdo con los datos previos, que la droga reduce de forma dosis dependiente la respuesta fisiológica a la natación forzada. Pero además, esta interacción negativa entre los dos estímulos también actúa en el sentido contrario, de tal manera que la exposición al estrés reduce la activación del eje HPA causada por la anfetamina. En una serie de experimentos posteriores con el MPH hemos demostrado que el fármaco por sí mismo no afecta al eje HPA, pero como la AMPH, es capaz de reducir la respuesta fisiológica al estrés (natación forzada) cuando el fármaco se administra inmediatamente antes del estrés. El efecto es evidente a nivel de SNC (expresión del gen del CRF, el principal factor regulador del eje HPA), se manifiesta tanto en animales jóvenes como adultos y es también observable cuando el fármaco se administra 30 min antes de la exposición al estrés. Los efectos protectores del MPH se observan no solo a nivel fisiológico sino también conductual en una tarea activa de evitación-escape, con una mejora de la eficacia del aprendizaje y un menor condicionamiento del miedo al contexto. Considerados en conjunto, los resultados muestran, por vez primera, un efecto protector del MPH frente a los efectos del estrés, lo que tiene importantes implicaciones clínicas.

Summary

Previous studies evidenced in rats that amphetamine administration immediately after the exposure to different stressors decreases the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), as well as the hyperglycemia (index of activation of the sympathetic medullary adrenal axis) caused by exposure to stress. The effect is located at the CNS level.

The purposes of the present Thesis have been to extend the study of the interaction between stress and amphetamine and specially to demonstrate that methylphenidate (MPH), the most used stimulant in the treatment of the attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD), is also able to reduce, at relevant therapeutic doses, the biological and behavioral response to emotional stress.

The studies have been conducted in male adult rats (2-3 months of age), except in one experiment aimed to compare the effects of MPH in young and adult animals. Results with amphetamine indicate, in agreement with previous data, that the drug reduces in a dose-dependent way, the physiological response to the forced swim. But, moreover, this negative interaction between both stimuli also acts in the opposite manner, in a way that the exposure to stress reduces the HPA activation caused by amphetamine. In a series of experiments conducted with MPH we have demonstrated that the drug by itself does not modify the HPA axis, but, in the same way than amphetamine, is able to reduce the physiological response to stress (forced swim) when the drug is given immediately before stress. The effect is evidenced at the CNS level (CRF gene expression, the main factor that regulates the HPA axis), is observed in both young and adult animals and it is also detected when the drug is administered 30 min before exposure to stress. The protective effects of MPH are observed not only at the physiological level but also at the behavioral level in a two-way active avoidance/escape task, with an improvement in the learning and with lower levels of contextual fear conditioning. All together, the results show, for the first time, a protective effect of MPH in front of the effects of stress, having important clinical implications.

“Cuando se tiene que esperar, se tiene que esperar”

“En la vida, todo es una metáfora”

Haruki Murakami

A mi Padre

Índice

Introducción [17]

1. Concepto de estrés y respuesta neuroendocrina general [19]
2. El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) [23]
 - 2.1. Procesamiento central de los estímulos estresantes y activación del PVN [24]
 - 2.2. El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) [27]
 - 2.3. Factores hipotalámicos liberadores de ACTH: CRH (CRF) y AVP [28]
 - 2.4. La hipófisis y la ACTH [30]
 - 2.5. La glándula adrenal y la corticosterona [30]
 - 2.6. Dinámica de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes [32]
 - 2.7. Marcadores de intensidad de estrés [34]
- 3- Prolactina y estrés [36]
- 4- Genes de expresión temprana [36]
 - 4.1- Genes de expresión temprana y estrés [38]
 - 4.2- Genes de expresión temprana y psicoestimulantes [40]
5. Interacción entre estrés y psicoestimulantes [42]
6. Metilfenidato (MPH): opción terapéutica de elección para el TDAH en humanos [46]
7. Efectos fisiológicos del MPH en animales de experimentación a nivel del SNC [48]
8. MPH y conducta en animales de experimentación [50]
 - 8.1. Efectos psicoestimulantes y reforzantes [50]
 - 8.2. Efectos sobre las funciones ejecutivas [51]
 - 8.2.1. Efectos sobre la atención y la memoria de trabajo [51]
 - 8.2.2. Efectos sobre la inhibición conductual [52]
 - 8.3. Impacto del metilfenidato sobre los efectos del estrés [54]

Hipótesis [55]

Objetivos [59]

Materiales y métodos [63]

1. Animales de experimentación y procedimientos generales [65]
2. Obtención de muestras de sangre [65]
3. Administración de fármacos [65]
4. Perfusiones [66]
5. Técnicas y variables bioquímicas utilizadas [66]
 - 5.1. Radioinmunoanálisis [66]
 - 5.2. ISH (hibridación *in situ*) para mRNA de *c-fos* y hnRNA de CRF [67]
 - 5.2.1. Obtención de la ribsonda radiactiva [67]
 - 5.2.2. Protocolo de hibridación *in situ* [67]
 - 5.2.3. Captura y análisis de imágenes [68]
 - 5.3. Valoración enzimática de la glucemia [69]
6. Pruebas y variables de conducta utilizadas [69]
 - 6.1. Prueba de natación forzada (FST: *Forced swim test*) [69]
 - 6.2. Prueba de campo abierto rectangular (OF: *open field*) [69]
 - 6.3. Prueba del laberinto elevado en cruz (EPM) [70]
 - 6.4. Prueba de evitación activa en dos sentidos y condicionamiento del miedo al contexto [71]
7. Análisis estadístico de datos [73]

Resultados [75]

- Experimento "0":** Respuesta periférica del eje HPA a un estímulo estresante emocional moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con anfetamina (Estudio dosis/respuesta) [77]
- Experimento 1:** Respuesta periférica del eje HPA a un estímulo estresante moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con metilfenidato [82]
- Experimento 2:** Respuesta central del eje HPA a un estímulo estresante moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con metilfenidato [88]
- Experimento 3:** Efecto de metilfenidato sobre la evitación activa en dos sentidos (Exposición a la *Shuttle-box*) [95]
- Experimento 4:** Replicación del efecto del metilfenidato sobre la evitación activa en dos sentidos (Exposición a la *Shuttle-box*) [105]
- Experimento 5:** Efecto de la inyección de metilfenidato 30 minutos antes de la natación forzada sobre la respuesta periférica del eje HPA [110]
- Experimento 6:** Influencia de la edad en la interacción metilfenidato-estrés [112]

Discusión [115]

1. Importancia de la dosis en la interacción entre anfetamina y estrés (**Experimento 0**) [117]
2. Interacción entre metilfenidato y natación forzada a nivel periférico (**Experimento 1**) [120]
3. Interacción entre metilfenidato y natación forzada a nivel central (**Experimento 2**) [122]
4. Efecto del metilfenidato sobre la conducta de afrontamiento de situaciones aversivas (**Experimentos 3 y 4**) [124]
5. ¿Aparece interacción negativa entre metilfenidato y estrés cuando el fármaco se administra con antelación? (**Experimento 5**) [128]
6. Diferencias entre ratas jóvenes y adultas respecto a la interacción entre el metilfenidato y la natación forzada (**Experimento 6**) [129]
7. Consideraciones respecto a los efectos de la administración crónica de metilfenidato [131]

Conclusiones [133]

Abreviaturas [137]

Bibliografía [141]

Agradecimientos [173]

Introducción

1. Concepto de estrés y respuesta neuroendocrina general

Considerado como una de las enfermedades de nuestro tiempo, dados el ritmo, los requerimientos, las ambiciones y el estilo de vida contemporáneos, estar expuesto a estrés significa hoy en día experimentar situaciones capaces de alterar fisiológica o psicológicamente a un individuo. El estar “estresado” es considerado sinónimo de enfermedad física o mental. Es así como una reacción fisiológica natural desde el punto de vista individual ha pasado a ser considerada una reacción patológica desde el punto de vista colectivo. Esto ha provocado un enorme interés y aumento de la información disponible en la literatura acerca del estrés y de su vinculación con las funciones cognitivas y las emociones. Por otro lado, la posibilidad de atenuar farmacológicamente la respuesta al estrés ante situaciones patológicas como el estrés post-traumático (PTSD) o el estrés crónico es objeto de gran interés, aunque las opciones terapéuticas disponibles no son del todo adecuadas o eficaces.

Walter Cannon, basándose en el concepto “*Milieu Interieur*” de Claude Bernard, definió el concepto de homeostasis a principios del siglo XX como el mantenimiento del equilibrio fisiológico interno a pesar de las perturbaciones causadas por los cambios en el medio ambiente. Destacó además al sistema simpático-medulo-adrenal (SMA) como clave para el mantenimiento de la homeostasis, al observar cambios en este sistema ante la exposición a diferentes situaciones de emergencia como frío, dolor o hemorragia. También introdujo el concepto de reacción de alarma o de “lucha-huida” (*figth or fligth*) ante situaciones amenazantes. No definió el concepto de “estrés” directamente pero sí se refirió a agentes externos que ponían en peligro el equilibrio homeostático de los organismos (Goldstein y McEwen, 2002; Goldstein y Kopin, 2007).

A partir de 1936 Hans Selye definió y popularizó el concepto de estrés como “*la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda sobre él*”. Puso en evidencia que la exposición a diversas situaciones adversas físicas daba lugar a una respuesta estereotipada común que incluía pérdida de peso, hipertrofia adrenal, ulceración gastrointestinal y reducción del tamaño del timo. Denominó a este cuadro general como un “*síndrome general de adaptación*” que se desarrollaría en tres etapas, primero una “*reacción de alarma*” caracterizada por una descarga adrenérgica del SMA, luego una “*etapa de adaptación o resistencia*” donde entrarían en juego cambios fisiológicos adaptativos y por último una “*etapa de agotamiento*” si la situación estresante perdurara, llevando a la muerte del organismo en cuestión. (Goldstein y Kopin, 2007). Posteriormente, Selye definió la diferencia entre “*stress*” y “*stressor*”, adjudicando al primer término la respuesta inespecífica del organismo frente a un desequilibrio causado por un estímulo estresante y al segundo al agente que da lugar a ese desequilibrio. Actualmente la terminología más apropiada distingue entre estímulo estresante (*stressor*), estrés (*stress*, estado del organismo) y respuesta de estrés (respuesta del organismo) (Armario, 2006a).

Mientras que Cannon hizo especial énfasis en la participación del SMA para el mantenimiento de la homeostasis, Selye lo hizo en el sistema hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), adjudicándole un papel relevante a los glucocorticoides de la corteza adrenal en los cambios fisiológicos que se producían frente a situaciones adversas. Esa liberación de glucocorticoides no solo contribuiría a los cambios adaptativos del organismo, sino que en determinadas condiciones podría

ser responsable de patologías asociadas al estrés. Consideramos a estos dos autores fundamentales para comprender lo que hoy entendemos como estrés.

A mediados del siglo XX, Richard Lazarus comenzó a desarrollar sus teorías centradas en el estrés psicológico, afirmando que el estrés psicológico es una relación particular entre el individuo y el entorno que es evaluado por éste como amenazante o desbordante de sus recursos y que pone en peligro su bienestar (Lazarus y Folkman, 1986). Por consiguiente las situaciones estresantes solo se perciben como amenazadoras, peligrosas e incontrolables si sobrepasan las estrategias de afrontamiento individuales previa evaluación cognitiva de éstas, y que esa evaluación puede ser consciente o no (Lazarus, 1993). La respuesta a una situación estresante estaría determinada por el procesamiento cognitivo de la situación (*appraisal*) y por las estrategias de afrontamiento (*coping styles*), es decir, por el repertorio conductual utilizado por el sujeto para escapar de la fuente de experiencias aversivas o para reducir el impacto de la situación. En animales se han definido dos tipos de estrategias de afrontamiento: las proactivas (o activas) y reactivas (o pasivas) en función de la conducta desarrollada frente a la situación (Koolhaas et al, 1999). El modo en que se evalúa y afronta una situación estresante puede modificar las consecuencias que esa situación acarrea. Tener o no tener control efectivo sobre la situación parece ser un factor crucial en la aparición de numerosos efectos negativos del estrés (Korte, 2005). Actualmente, está bien reconocido, que la exposición a un estímulo estresante severo o una exposición crónica, particularmente cuando no son previsibles o se perciben como incontrolables, pueden causar a largo plazo una enorme variedad de efectos psicológicos, contribuyendo de esta manera al desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos (Hollon, Burgento y Phillips, 2015).

La respuesta a un estímulo estresante agudo es generalmente adaptativa, beneficia al individuo y es potencialmente crítica para su supervivencia (Hollon, Burgento y Phillips, 2015). Aun así, la idea popular de que el estrés es perjudicial deriva de la evidencia de que una respuesta exagerada o duradera parece estar ligada a alteraciones fisiológicas y psicológicas, lo que ha generado un enorme interés por el estudio e investigación del estrés. Las situaciones estresantes pueden influir en la aparición y desarrollo de problemas cardiovasculares (Wiersma et al, 1993; Guerra et al 2015), trastornos del sueño (Kant et al, 1995), depresión (Yang et al, 2015), alteraciones de la conducta alimentaria (Brambilla et al, 2001), predisposición a desarrollar Alzheimer (Johansson et al, 2013), esquizofrenia (Walker et al, 2008, Raune et al, 2009) o consumo de drogas (Piazza y Le Moal, 1997; Mantsch et al, 2015), entre otras patologías. Se estima que en el año 2020, los trastornos neuropsicológicos sustituyan en importancia a las enfermedades infecciosas en los mapas de salud global y que, las enfermedades psiquiátricas y neurológicas podrían aumentar su participación en la carga de morbilidad mundial total casi en un 50%, lo que representa un porcentaje de crecimiento superior al de las enfermedades cardiovasculares (Aguiló et al, 2015).

Sterling y Eyre definieron el concepto de “*alostasis*” a fines de la década de los 80 basándose en la regulación cardiovascular y haciendo referencia a la idea de que el mantenimiento de la homeostasis frente a los cambios internos o externos requiere del cambio continuo en ciertas variables reguladoras. McEween (2000) utilizó este concepto aplicado al campo del estrés: la idea básica es que el mantenimiento de la estabilidad en ciertos variables críticas como pH, presión osmótica, niveles de glucemia o temperatura depende de un gran número de factores (v.g. niveles hormonales), factores que se ven continuamente alterados en distintas condiciones fisiológicas y

también en respuesta a estímulos estresantes. El costo de mantener esos parámetros en situaciones de estrés se denomina “*carga alostática*”. Si dicha carga es grande y se prolonga en el tiempo da lugar a consecuencias patológicas vinculadas con el estrés. Recientemente, McEwen (2015) considera que la respuesta fisiológica de adaptación incluye no solo los ejes HPA y SMA, sino también a sus interacciones no-lineales con los sistema metabólico e inmune (pro y anti-inflamatorios). Alostasis, carga alostática y sobrecarga alostática son conceptos biológicos más precisos que estrés para describir la adaptación o mala adaptación a estímulos estresantes.

No hay consenso en la literatura sobre la definición más adecuada del término estrés. En nuestro laboratorio, consideramos la definición de Vigas (1984) como la más apropiada. Entiende por estrés la situación creada en el organismo por la exposición a agentes (estímulos estresantes) que puedan alterar real o simbólicamente la integridad del organismo. Dicha respuesta, desarrollada en el curso de la filogenia, tiene como objetivo mantener el equilibrio homeostático frente a una perturbación real o simbólica capaz de poner en peligro su integridad, que no puede afrontarse con los mecanismos homeostáticos normales.

Muchos autores han analizado el concepto “estrés”. Algunos (Mason, 1971; Pacák and Palkovits, 2001), criticando la idea de “no especificidad” propuesta por Selye; otros como Weiss y Maier (Weiss 1972; Maier y Watkins 2005) atribuyendo a la falta de control y a lo impredecible de la situación un peso crítico en los cambios y efectos negativos de la exposición a situaciones estresantes. De hecho una de las revisiones del tema destaca la necesidad de definir el concepto de estrés en base a la percepción de las situaciones aversivas como incontrolables e impredecibles más que sobre la base de las respuestas típicas como la liberación de glucocorticoides (Koolhaas et al, 2011).

En la actualidad se reconocen dos tipos básicos de estímulos estresantes, sistémicos y emocionales, aunque muchos poseen propiedades de ambos (mixtos). Los estímulos sistémicos representan una auténtica amenaza homeostática que es reconocida a través de vías sensoriales somáticas, viscerales o circunventriculares. Son ejemplos los cambios pronunciados en el tono cardiovascular, la hipoxia y la hipoglucemia, así como señales químicas y humorales indicadoras de infección o inflamación. También podrían incluirse algunos fármacos y las drogas de abuso. Los estímulos emocionales, anticipatorios o procesativos no causan una alteración homeostática directa. Incluyen los de tipo social (derrota social, aislamiento o privación materna), el miedo a situaciones desconocidas o un peligro inminente (presencia de depredador, exposiciones orales ante público desconocido, miedo a volar). Representan situaciones en las que el organismo desarrolla una respuesta anticipatoria de una posible alteración homeostática. Esta respuesta puede ser innata para una especie (reconocimiento de un depredador, peligro asociado a las alturas o a los espacios abiertos) o adquirida por condicionamiento clásico (aprendizaje basado en asociaciones de estímulos). Por último los estímulos mixtos tienen características de ambos, siendo en muchos casos de naturaleza emocional con algún componente físico, entre ellos nado forzado, choque eléctrico o inmovilización. El balance entre la componente emocional y la física puede cambiar según las condiciones particulares. Por ejemplo el choque eléctrico de gran intensidad puede provocar dolor, inflamación y daño, pero a baja intensidad puede considerarse como un estímulo básicamente emocional.

Los estímulos estresantes, independientemente de su naturaleza son procesados y evaluados en el SNC. En términos evolutivos, es posible que la activación de los ejes SMA y HPA apareciera primero como respuesta a estímulos estresantes sistémicos y posteriormente para responder a estímulos estresantes emocionales. La respuesta al estrés se desarrolló a partir de sistemas fisiológicos muy involucrados en la regulación cardiovascular y metabólica; aunque está por determinar estos dos sistemas juegan un papel adaptativo frente a todo tipo de situaciones de estrés (Armario, 1998). Cuando estos dos ejes se activan frente a una situación particular es muy probable que nos encontremos frente a una situación de estrés, aunque esta idea ha sido ocasionalmente cuestionada (Koolhaas et al, 2011).

Las señales asociadas a los de tipo sistémicos se reciben en neuronas localizadas en áreas desprovistas de barrera hematoencefálica como los órganos circunventriculares o en neuronas de los nervios vegetativos a través de los cuales la información llegaría al núcleo del tracto solitario (NTS) y posteriormente a otras áreas como el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Estas poblaciones neuronales activadas son restringidas y en gran medida diferentes en función del tipo particular de estímulo sistémico (Kovács et al, 2005; Pacák y Palkovits, 2001). En cambio, los estímulos emocionales muestran una gran similitud aparente en el patrón general de activación (Armario, 2006a), procesándose en zonas límbicas corticales y subcorticales desde las cuales se enviaría la información a áreas efectoras como el PVN, la sustancia gris periacueductal (PAG) y las neuronas preganglionares del sistema nervioso vegetativo, especialmente las simpáticas localizadas en la médula espinal.

La diferencia fundamental entre las dos categorías de estímulos estresantes se pone claramente de manifiesto en un estudio utilizando *c-fos* como marcador de activación neuronal (Li et al, 1996). En él se realizó una sección unilateral del tronco encefálico y se estudió la inducción de *c-fos* en respuesta al choque eléctrico o a la administración de interleuquina 1 β (IL-1 β). Ante el choque eléctrico hubo una disminución de la expresión de *c-fos* en la zona ipsilateral a la lesión en el NTS y una expresión similar en las zonas contralateral e ipsilateral del PVN; ante la administración de IL-1 β hubo una disminución de la expresión en la zona ipsilateral del PVN y una expresión similar en ambos lados del NTS. Esto indica claramente que un estímulo predominantemente emocional (choque eléctrico) se procesa en áreas telencefálicas desde donde se trasmite la información al NTS y al PVN. Sin embargo, el procesamiento del estímulo sistémico (IL-1 β) tendría lugar primero a nivel del tronco encefálico (NTS) para posteriormente derivar señales a zonas diencefálicas como el PVN. Debe tenerse en cuenta la dificultad en muchos casos de clasificar un estímulo como sistémico o emocional y por ello se tiende a clasificarlos por su componente predominante. Comentaremos a continuación el procesamiento de los estímulos emocionales o predominantemente emocionales.

La exposición a situaciones estresantes sistémicos o emocionales implica la activación, en todos los vertebrados, de dos grandes sistemas fisiológicos: **(a)** El sistema nervioso vegetativo, especialmente la rama simpática, con la consiguiente liberación de adrenalina (A) y noradrenalina (NA); es lo que denominamos sistema SMA y **(b)** el eje HPA, responsable en primer término de la liberación de ACTH por la hipófisis y luego de glucocorticoides por la adrenal. Estos dos sistemas contribuirán tanto a cambios fisiológicos como conductuales/cognitivos considerados indispensables para el afrontamiento de la situación y la supervivencia del individuo. La activación del

SMA implicará un aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial así como de glucosa y ácidos grasos libres en sangre (glucogenolisis, lipólisis). Por otro lado el aumento de glucocorticoides potenciará los procesos que ayudan a sostener los niveles de glucosa frente a una demanda prolongada (gluconeogénesis) e inhibirá procesos anabólicos y funciones como el crecimiento y la reproducción, que consumirían la energía disponible necesaria para afrontar la situación de emergencia.

Aunque la activación de los dos sistemas suele ir asociada, en algunas condiciones puede disociarse, en función de las características de los distintos estímulos estresantes. Se ha sugerido que el SMA se activaría en situaciones que requieran conducta activa mientras que el HPA se activaría en las que existe incertidumbre, como novedad o frustración (Armario et al, 2012). Tampoco A y NA responde de igual manera a todos las situaciones, la primera es más sensible a activación emocional en situaciones de estrés y la segunda está más centrada en el ajuste cardiovascular y el control de la actividad del organismo (Armario, 1998).

2. El eje hipotálamo-pituitario adrenal (HPA)

El eje HPA es uno de los sistemas endocrinos mejor caracterizados, al jugar un papel crucial en la respuesta fisiológica y psicológica a los estímulos estresantes así como en las consecuencias fisiopatológicas y psicopatológicas que pueden resultar de dicha exposición (Armario, 2006a). Aunque los estímulos emocionales se procesan en estructuras encefálicas superiores como la corteza prefrontal (PFC), la amígdala, el septum o el estriado ventral y los estímulos sistémicos mediante vías más directas desde el tronco encefálico o áreas circunventriculares (Herman y Cullinam, 1997), en ambos casos la información converge en una población de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), las cuales sintetizan y liberan el factor liberador de corticotrofina (CRH o CRF) y la vasopresina (AVP) a la zona externa de la eminencia media (EM) y desde allí alcanzan la adenohipófisis, activando la síntesis y liberación a la circulación de ACTH (Figura 1).

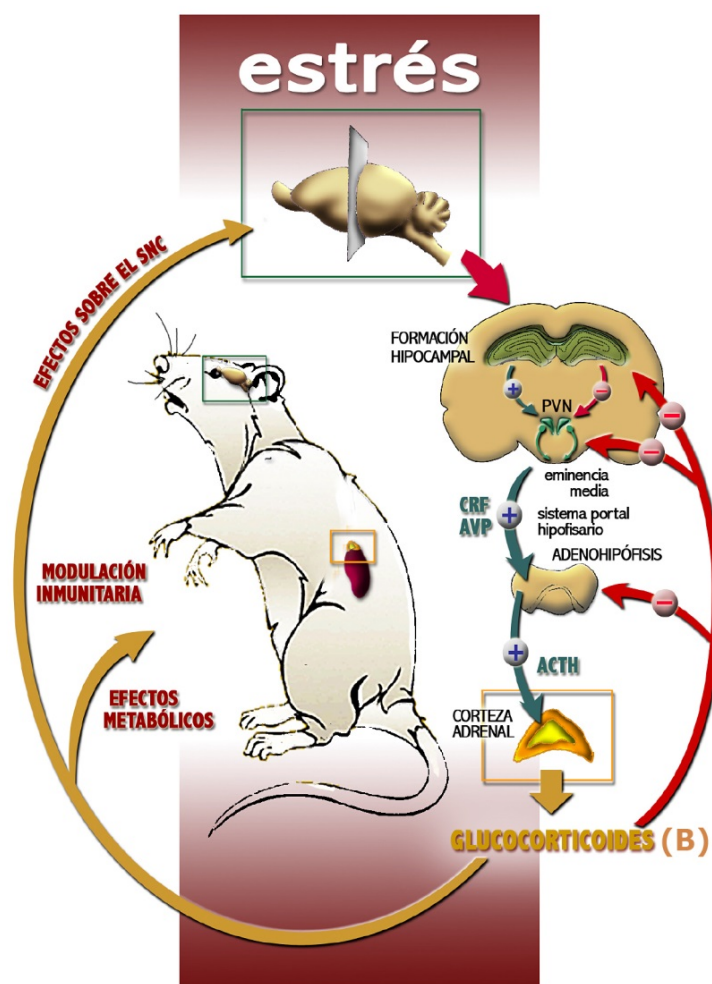


Figura 1: Esquema general del funcionamiento del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Abreviaturas: **SNC:** sistema nervioso central; **PVN:** núcleo paraventricular del hipotálamo; **CRF:** factor liberador de corticotropina; **AVP:** arginina-vasopresina; **ACTH:** hormona adrenocorticotropa.

Esta hormona, a su vez, estimula la síntesis y liberación en la adrenal de los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en rata y ratón). Finalmente, los glucocorticoides ejercen multitud de funciones en el organismo y en particular auto-regulan el eje mediante mecanismos de retroinhibición, principalmente a nivel hipocampal, hipotalámico e hipofisario (Armario, 2006a).

2.1. Procesamiento central de los estímulos estresantes y activación del PVN

Podemos considerar proyecciones directas e indirectas al PVN. Respecto a las proyecciones directas al PVN (**Figura 2**), éste recibe aferencias catecolaminérgicas excitatorias desde las regiones A2/C2 del núcleo del tracto solitario (NTS) y desde las regiones A1/C1 (bulbo ventro-lateral, VLM).

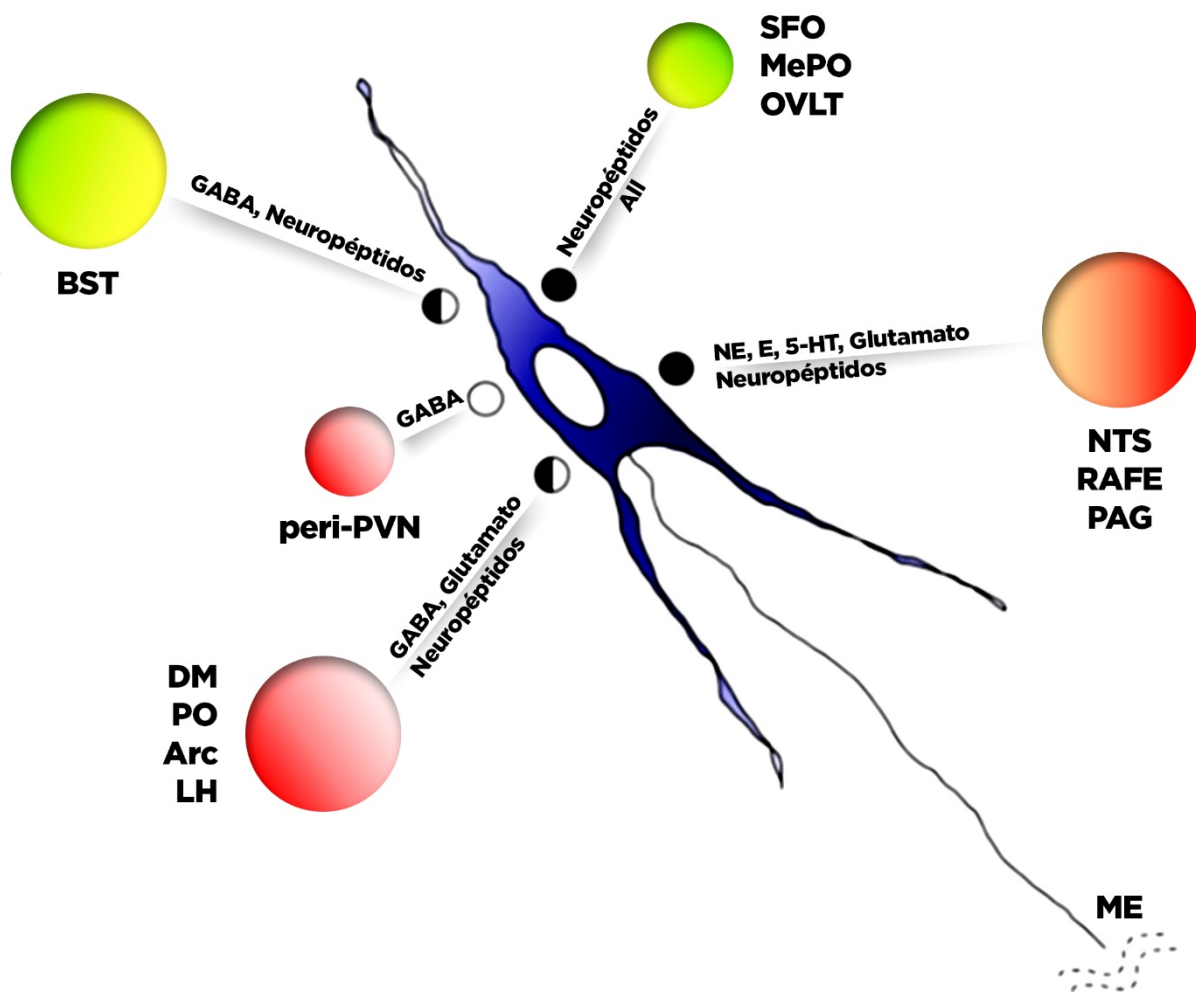


Figura 2. Principales proyecciones directas hacia las neuronas parvocelulares del núcleo para-ventricular del hipotálamo. Los círculos negros indican la naturaleza activadora de las proyecciones, los círculos blancos indican la naturaleza inhibitoria de las proyecciones. **Abreviaturas:** **Arc:** Núcleo arqueado del hipotálamo; **BST:** Núcleo del lecho de la estría terminal; **DM:** núcleo dorsomedial del hipotálamo; **LH:** Hipotálamo lateral; **ME:** Eminencia media; **MePO:** Núcleo preóptico medial; **NTS:** Núcleo del tracto solitario; **OVL:** Órgano vasculoso de la lámina terminal; **PAG:** Sustancia gris periacueductal; **peri-PVN:** región peri-PVN; **PO:** Área preóptica medial; **SFO:** Órgano subfornical (Adaptado de Herman et al., 2003).

El NTS es un lugar crítico de activación por estímulos sistémicos, habiéndose observado expresión de *c-fos* tras la exposición a dolor visceral, inflamación, hipovolemia e hipotensión (Herman et al, 2003), pero también se activa por estímulos de naturaleza mixta como nado forzado e inmovilización (Cullinan et al, 1995, Sawchenko et al, 2000).

Por otra parte, también recibe aferencias serotoninérgicas desde los núcleos dorsal y medial del Rafe (Sawchenko et al, 1983). Otras regiones, como el órgano subfornical (SFO), el núcleo preóptico medial (MePO) y el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) inervan el PVN aportando información implicada en el control cardiovascular y en el equilibrio iónico e hídrico, aspecto en el cuál la AVP juega un papel específico importante (Johnson et al, 1996, McKinley et al, 1999).

Otras regiones hipotalámicas como el núcleo dorsomedial (DM) o el área preóptica medial (PO) tienen tanto proyecciones GABAérgicas (Roland y Sawchenko, 1993) como glutamatérgicas (Ziegler et al, 2002) al PVN, por lo que podrían estar involucradas tanto en su activación como en su inhibición. La información relativa al balance energético se transmite al PVN sobre todo a través del núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) y del hipotálamo lateral, que tienen neuronas sensibles a los niveles circulantes de glucosa, leptina e insulina (Woods et al, 1998). Finalmente, el PVN está inervado por neuronas GABAérgicas situadas en su cercanía, la región peri-PVN (Boudaba et al, 1996), de modo que la activación de ésta zona podría traducirse en la inhibición del eje HPA, en tanto que su inhibición podría activarlo (Cole y Sawchenko, 2002) (**Figura 3**).

Los efectos del núcleo del lecho de la estría terminal (BST) sobre el eje HPA dependen de la subdivisión concreta de ese núcleo (Choi et al, 2007). Las lesiones del BST posterior incrementan la expresión de mRNA de CRF en el PVN, mientras que lesiones del área anterior lo disminuyen (Herman et al, 1994), sugiriendo un papel inhibitorio o estimulador, respectivamente

Las regiones cruciales en la modulación de la actividad del eje HPA en respuesta a estímulos emocionales, como PFC, septum lateral (LS), formación hipocámpal (HF), amígdala y los núcleos de la línea media del tálamo no proyectan directamente al PVN y necesitan conexiones intermedias en algunas de las zonas con proyecciones directas descritas anteriormente (**Figura 3**).

La PFC puede tener un efecto inhibitorio sobre el PVN, especialmente desde su región prefrontal (PrL) (Diorio et al, 1993; Figueiredo et al, 2003; McDougall et al, 2004), en cambio desde la región infralímbica (IL) podría tener un efecto estimulador (Radley et al, 2006). La región PrL, mediante proyecciones estimuladoras a la parte dorso-medial y fusiforme del BST, podría inhibir el PVN activando proyecciones GABAérgicas (Radley et al, 2009). Esta inhibición podría ser exclusiva de estímulos emocionales (Jones et al, 2011). El papel inhibitorio de la PFC se le ha relacionado con la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides, que en esta zona parece afectar solo a la respuesta del eje HPA a los estímulos emocionales (Diorio et al, 1993; Akana et al 2001; Radley et al, 2006).

El LS resulta claramente activado por estímulos estresantes emocionales como los ambientes nuevos, la exposición a un depredador o la interacción social, mientras que ante estímulos sistémicos esta activación es menor (Herman et al, 2003). La mayoría de las neuronas del LS son

GABAérgicas y proyectan hacia la región peri-PVN, al hipotálamo anterior y al hipotálamo lateral (LH) (Risold y Swanson, 1997 a y b) (Figura 3).

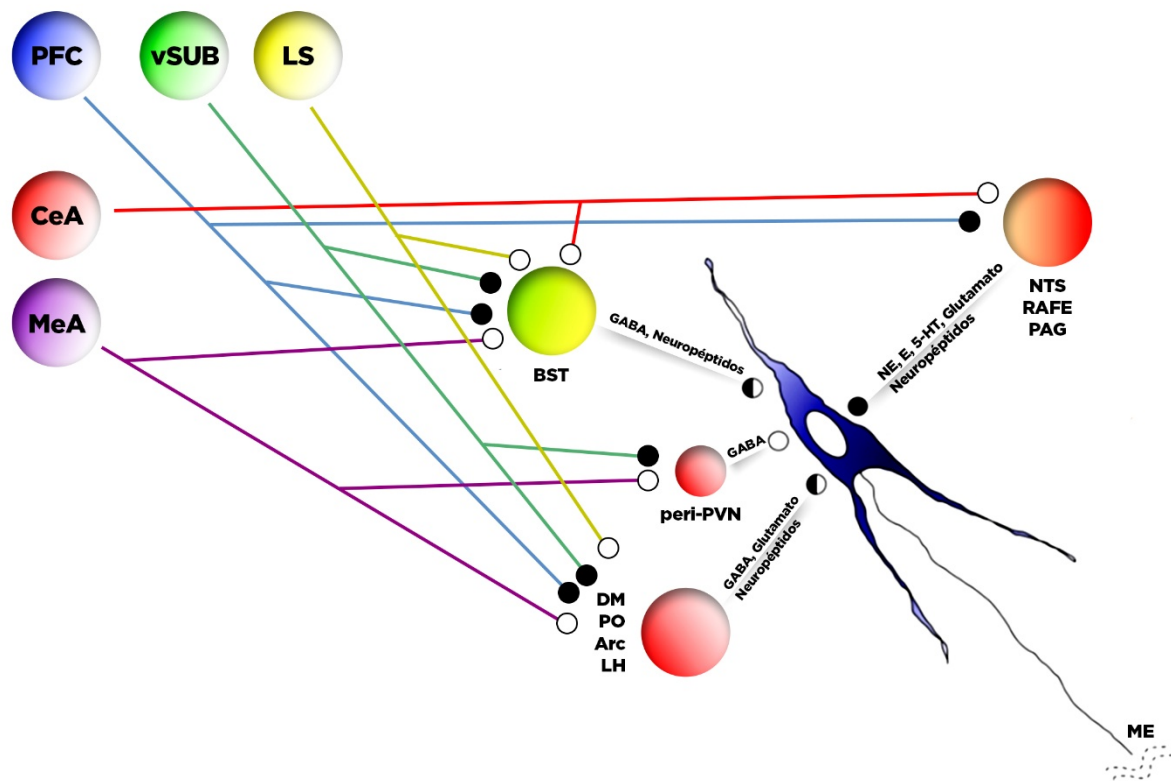


Figura 3. Principales proyecciones indirectas hacia las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Los círculos negros indican la naturaleza activadora de las proyecciones, los círculos blancos indican la naturaleza inhibidora de las proyecciones. **Abreviaturas:** **Arc:** Núcleo arqueado del hipotálamo; **BST:** Núcleo del lecho de la estría terminal; **CeA:** Amígdala, subdivisión central; **DM:** núcleo dorsomedial del hipotálamo; **LH:** Hipotálamo lateral; **LS:** Septum lateral; **ME:** Eminencia media; **MeA:** Amígdala, subdivisión medial; **MePO:** Núcleo preóptico medial; **NTS:** Núcleo del tracto solitario; **OVLt:** Órgano vasculoso de la lámina terminal; **PAG:** Sustancia gris periacueductal; **peri-PVN:** región peri-PVN; **PFC:** corteza prefrontal; **PO:** Área preóptica medial; **SFO:** Órgano subfornical; **vSUB:** subiculum ventral. (Adaptado de Herman et al.2003).

Se ha sugerido que proyecciones serotoninérgicas desde el Rafe serían responsables de la activación de LS ante situaciones estresantes; en la regulación del eje HPA por el LS parecen estar involucrados los receptores 5-HT_{1A} de serotonina (5-HT) ya que la administración local de un agonista del receptor serotoninérgico reduce la respuesta del eje HPA mientras que la administración de un antagonista la incrementa, por lo que es probable que el LS ejerza un efecto predominantemente inhibitorio sobre el eje HPA mediado por su activación a través de proyecciones serotoninérgicas (Singewald et al, 2011). El LS podría ejercer una influencia inhibitoria sobre las áreas peri-PVN y podría ejercer un rol importante tanto en la activación como en la inhibición del PVN. Sin embargo, hay un claro paralelismo entre la activación del septum lateral ventral (LSV) y del PVN en la activación del eje HPA, como se pone de manifiesto con la expresión de *c-fos* y la liberación de ACTH ante estímulos estresantes (Burow et al, 2005; Armario, 2006b). No obstante, recientemente se ha propuesto que la activación de un subgrupo de neuronas CRFR2 del LS aumenten la ansiedad inducida por el estrés y estimulan el eje HPA (Anthony et al, 2014),

lo que es más concordante con el paralelismo entre la inducción de *c-fos* en esta zona y la activación del eje HPA.

La modulación del eje HPA por la HF parece restringida a estímulos emocionales. Lesiones en la HF prolongan la secreción de ACTH y/o corticosterona tras la exposición a la inmovilización o ambientes nuevos, pero no la aumentan tras la exposición a éter o hipoxia (Herman et al, 2005). La inhibición de la HF parece hacerse en forma indirecta a través de neuronas glutamatérgicas del subículo ventral hacia el BST, el MePO, el DM y la región peri-PVN, que inervan el PVN mediante neuronas GABAérgicas (Herman y Muller, 2006; Jankord y Herman, 2008). Considerando que la HF es una zona rica en receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) (Reul y De Kloet, 1985; De Kloet et al, 1998), se la ha relacionado con la finalización de la respuesta del eje HPA al estrés a través del retro-inhibición ejercida por los glucocorticoides (Herman y Cullinan, 1997), pero existen datos contradictorios al respecto (Jacobson y Sapolsky, 1991; Tuvnes et al, 2003).

La amígdala parece tener un efecto activador del eje HPA (Herman et al, 2005). La amígdala central (CeA) se ha relacionado con la respuesta a estímulos sistémicos (Herman y Cullinan, 1997; Sawchenko et al, 2000; Dayas et al, 2001) y mediante sus proyecciones GABAérgicas al BST podrían a su vez inhibir proyecciones GABAérgicas del BST al PVN, activándolo de esta forma (Herman et al, 2003). La amígdala medial (MeA) estaría implicada en la integración de estímulos emocionales (Dayas et al, 1999, 2001; Dayas y Day, 2002; Masini et al, 2009) con una extensa red de conexiones GABAérgicas con áreas de proyección directa al PVN como el BST, MePO, PO, hipotálamo anterior y zona peri-PVN (Alheid, 2003), de tal modo que la activación de la MeA daría lugar también a una activación del PVN por desinhibición como ocurre con la CeA, pero por distintos circuitos. Por último, la amígdala basolateral (BLA) se activa frente a estímulos emocionales (Cullinan et al, 1995), aunque sus efectos sobre el PVN serían más indirectos con proyecciones hacia CeA y MeA. La BLA podría estar implicada en la facilitación del eje HPA ante estímulos heterotípicos tras una historia previa de estrés crónico (Bhatnagar et al, 2004; Grissom y Bhatnagar, 2011).

Por último, diversos núcleos del tálamo muestran una inducción de *c-fos* en respuesta a estímulos estresantes emocionales y han sido relacionados con la regulación del eje HPA (Cullinan et al, 1995; Emmert y Herman, 1999). En particular, el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) jugaría un rol importante en la integración de la respuesta del eje HPA, ya que animales expuestos a un estímulo estresante crónico presentan un fenómeno de facilitación de la respuesta a otros estímulos estresantes heterotípicos, que no se observa en animales con lesión en la parte posterior de este núcleo (Jaferi y Bhatnagar, 2006). El PVT recibe numerosas proyecciones desde áreas sensibles al estrés como el subículo ventral, la PFC, el BST, el NTS, el Rafe y el núcleo parabrancial y a su vez inerva regiones como la PFC, CeA y BLA, capaces de modular la actividad del eje HPA (Herman et al, 2003).

2.2. El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN)

No existe un acuerdo unánime respecto a la denominación de las distintas subdivisiones del PVN, pero algunos autores distinguen dos grandes regiones en función del tamaño de sus neuronas (Armstrong, 2004):

(a) **Magnocelular (PVNm)**, dividida en dos grupos principales: medial magnocelular y lateral magnocelular, con predominio de neuronas grandes que envían sus axones a la neurohipófisis y sintetizan principalmente OX y AVP respectivamente, implicadas (entre otras funciones) en la contracción del músculo liso de la musculatura uterina (OX) y el control de la diuresis (AVP).

(b) **Parvocelular (PVNp)**, poblada por neuronas pequeñas, la cual se subdivide a su vez en 5 zonas: (b1) **periventricular (PVNpe)**, conteniendo neuronas que proyectan a la EM y que sintetizan somatostatina (SOM, hormona inhibidora de la hormona de crecimiento) y dopamina (DA); (b2) **anterior parvocelular (PVNap)** y (b3) **medial parvocelular (PVNmp)**, con poblaciones neuronales heterogéneas (v.g. angiotensina II, AVP, colecistoquinina, CRF, encefalinas, hormona liberadora de TSH-TRH- y péptido intestinal vasoactivo-VIP) que en gran parte proyectan a la eminencia media. El **PVNmp** suele subdividirse en **dorsal (PVNmpd)**, que es de gran interés porque contiene la mayoría de las neuronas que sintetizan CRH implicado en la activación del eje HPA (a menudo co-localiza con AVP), y **ventral (PVNmpv)** que con menor densidad de neuronas de CRF; (b4) **dorsal parvocelular (dorsal cap) (PVNdc)** y (b5) **submagnocelular (PVNsm)**, contiendo ambas subdivisiones neuronas que proyectan también hacia el tronco encefálico y la médula espinal donde se sitúan los núcleos preganglionares implicados en la regulación del sistema nervioso vegetativo. Algunas de estas subdivisiones se representan en la **Figura 4**.

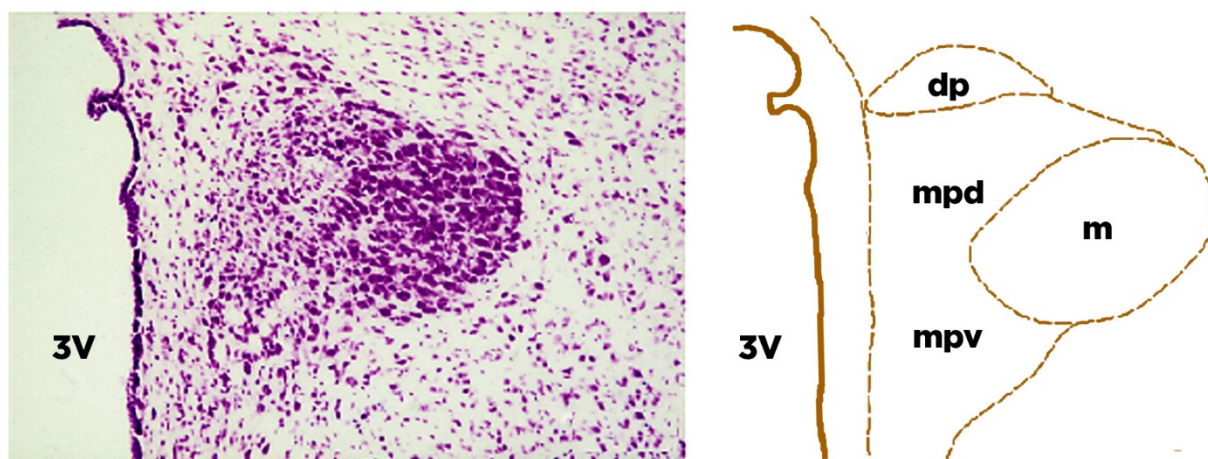


Figura 4. Organización del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Abreviaturas: **3V:** tercer ventrículo. **Izquierda,** tinción de Nissl. **Derecha:** representación de las siguientes subdivisiones: **m:** magnocelular; **dp:** dorsal parvocelular (dorsal cap); **mpd:** medial parvocelular dorsal y **mpv:** medial parvocelular ventral. Modificado de Viau y Sawchenko (2002).

2.3. Factores hipotalámicos liberadores de ACTH: CRH (CRF) y AVP

La síntesis y liberación de ACTH depende principalmente del factor liberador de corticotropina (CRH o CRF) y de la arginina-vasopresina (AVP), pero se considera que la liberación de ACTH en respuesta a los estímulos estresantes depende de la acción coordinada de distintos factores estimuladores que pueden combinarse de forma diferente en función del estímulo estresante (Plotsky, 1991; Romero y Sapolsky, 1996). Entre los posibles factores adicionales destacan la OX, la angiotensina II y las catecolaminas.

El CRF fue descubierto por Vale y colaboradores al principio de la década de los 80 (Spiess et al, 1981). Es un péptido de 41 aminoácidos sintetizado principalmente en la región dorsal del PVNmpd. Hay dos tipos de receptores acoplados a proteína G que median la acción del CRF: los CRFR₁ y los CRFR₂ (con dos subtipos CRFR_{2α} y CRFR_{2β}) distribuidos diferencialmente en el SNC. Ambos están acoplados a adenilato-ciclasa, provocando un aumento del AMPc y la consecuente activación de la proteína—quinasa dependiente de AMPc (PKA). El CRF se une al receptor CRFR₁ en la adenohipófisis, lo que conduce a un incremento en la transcripción del gen de la proopiomelanocortina (POMC) que es el péptido precursor de la ACTH y otras moléculas como las endorfinas, siendo el más importante en la respuesta al estrés. Hay otros péptidos que se unen a los receptores de CRF, entre ellos la familia de las urocortinas (UCN I, II y III). La UCN I tiene una afinidad similar por ambos receptores, mientras que las UCN II y III se unen con mayor afinidad a los receptores CRFR₂, los cuales presentan una distribución más limitada en el SNC. Las UCN I y II median efectos conductuales en el SNC, generalmente contrarrestando los efectos del estrés y del CRH (Bale y Vale, 2004); en tanto que la UCN III media efectos relacionados con el metabolismo del estrés, como la inhibición de las conductas de alimentación y el incremento de los niveles plasmáticos de glucosa (Kuperman y Chen, 2008).

El otro factor liberador de ACTH de singular importancia es la AVP. Es un pequeño péptido de 9 aminoácidos sintetizado principalmente en el núcleo supraóptico (SON) y en las neuronas parvocelulares y magnocelulares del PVN. Ejerce sus efectos biológicos acoplándose a 3 tipos de receptores asociados a proteína G: V_{1a}, V_{1b} (ambos asociados a fosfolipasas) y V₂ (acoplado a adenilciclasa) (Birnbaumer, 2000; Itoi et al, 2004). El tipo V_{1b}, también llamado V₃, es el que está presente en las células corticotropas de la hipófisis.

La AVP potencia los efectos del CRF sobre la liberación de ACTH tanto *in vivo* como *in vitro* (Rivier y Vale, 1983; Makara et al, 2004), aunque por sí sola no tiene efecto sobre la síntesis de ACTH y ejerce un efecto débil sobre su liberación. En condiciones normales, solo una pequeña cantidad de neuronas CRFérgicas co-expresan AVP, pero ese número aumenta tras una activación continua del eje HPA, como ocurre tras adrenalectomía o tras estrés crónico (de Goeij et al, 1992). Aunque esto sugeriría que la AVP podría contribuir a mantener la respuesta de la ACTH en situaciones de estrés crónico, los datos experimentales no apoyan esta hipótesis (Aguilera et al, 2000; Makara et al, 2004).

Por otro lado, hay numerosas poblaciones de neuronas inmunoreactivas para el CRF en distintas áreas del SNC como la PFC, la HF, el BST, la CeA y el núcleo de Barrington (Merchenthaler et al, 1982; Olschowka et al, 1982; Swanson et al, 1983; Sakanaka et al, 1987; Valentino y Van Bockstaele, 2002). En consonancia con este hecho, las acciones del CRF no se limitan a su acción sobre la hipófisis sino que participa en muchas funciones, incluyendo la conducta emocional, la regulación del estado de ánimo, los procesos motivacionales (incluyendo la ingesta de comida), el aprendizaje, la memoria y el *arousal*. Por ejemplo, las neuronas CRFérgicas de la CeA se han relacionado con la abstinencia a drogas de abuso (Koob, 2010), la región lateral del BST contiene neuronas CRFérgicas en las zonas dorsal y ventral, las cuales juegan un papel regulador en la respuesta conductual y fisiológica al estrés (Forray y Gysling, 2004). Singular relevancia ha cobrado el CRF al ser implicado en la fisiopatología de los trastornos del miedo/ansiedad, en la

depresión y en la conducta adictiva (Binder y Nemeroff, 2010; Koob, 2010; Mantsch et al, 2015). Los receptores CRFR₁ se han relacionado con un papel activador durante la fase aguda de la respuesta al estrés, mientras que los CRFR₂ parecen implicados en la reducción de la activación del eje HPA durante la fase de recuperación post-estrés (Korosi y Baram, 2008). Sin embargo, ésta es una simplificación del papel de cada receptor.

2.4. La hipófisis y la ACTH

La hipófisis o glándula pituitaria está formada en humanos por la neurohipófisis y por la adenohipófisis, (Armstrong, 2004). De la neurohipófisis forman parte la eminencia media (ME), el tallo hipofisario y el lóbulo posterior o neural (*pars nervosa*). Éste está formado por multitud de vasos fenestrados y por las arborizaciones de los axones de las neuronas magnocelulares procedentes del SON y PVN (secretoras de OX y AVP). También podemos encontrar proyecciones adrenérgicas (procedentes del NTS), dopaminérgicas (procedentes del núcleo periventricular del hipotálamo) y también algunos axones con diversos péptidos neuroactivos, GABA o 5-HT, los cuales pueden modular la liberación hormonal actuando directamente en la neurohipófisis.

La adenohipófisis la componen el lóbulo anterior (*pars distalis*), el lóbulo intermedio (*pars intermedia*) y la *pars tuberalis*. El lóbulo anterior está formado por células que sintetizan proopiomelanocortina (POMC) que es la precursora de la ACTH y otros péptidos, prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), tirotrófina (TSH), hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), además de por los vasos fenestrados que forman el sistema portal-hipofisario, que son los que transportan los factores inhibidores y estimuladores liberados por los axones hipotalámicos en la EM. El lóbulo intermedio lo componen células glandulares que sintetizan péptidos de la familia de la POMC y reciben inervaciones dopaminérgicas desde el ARC (Williams, 2008).

La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos sintetizado y liberado por la acción del CRH a partir de la POMC. En la *pars distalis*, la POMC por procesamiento proteolítico alternativo genera además de ACTH, lipotropina, endorfinas, entre otras moléculas. La activación del eje HPA se traduce en una liberación rápida de ACTH, alcanzándose el máximo de liberación a partir de los 10 min. Con un estrés más sostenido suele alcanzarse pasados los 30 min (Armario, 2000).

2.5. La glándula adrenal y la corticosterona

La glándula adrenal está formada por dos estructuras diferentes, la corteza y la médula. La médula adrenal está constituida por células cromafines que sintetizan NA y A. Sin embargo contribuyen de forma drástica a los niveles circulantes A y muy parcialmente a los de NA debido a que la mayor parte de la NA circulante procede de las terminaciones simpáticas. Las células cromafines son neuronas post-ganglionares simpáticas modificadas que reciben inervación de las neuronas preganglionares del simpático. En mamíferos, la corteza adrenal se halla rodeando a la médula y se divide en tres capas: (a) zona glomerular, más cercana a la superficie y productora de mineralocorticoides (aldosterona), (b) zona fascicular que produce básicamente glucocorticoides (corticosterona) y (c) zona reticular, más cercana a la médula que es una fuente secundaria de andrógenos (androstenediona o DHEA-S).

La unión de la ACTH a su receptor de membrana (MC2-R), (Adan y Gispen, 2000), da lugar, vía adenilato ciclasa, al aumento de la concentración intracelular de AMPc, la activación de PKA y la activación de enzimas que participan en el transporte del colesterol mitocondrial y la esteroidogénesis, con la consecuente síntesis y liberación de glucocorticoides. Además, la ACTH, vía PKA, ejerce un efecto trófico en la glándula adrenal, dando lugar a modificaciones transcripcionales en las células adrenales que conducen a cambios más complejos y duraderos (Sewer y Waterman, 2003). Los corticoides son hormonas esteroideas, que se clasifican funcionalmente en mineralocorticoides y glucocorticoides. En mamíferos hay dos tipos de glucocorticoides: el cortisol (predominantemente en humanos y la mayoría de mamíferos) y la corticosterona (el único en ratas y ratones pero también presente en el ser humano en menor cantidad). Participan en la formación de glucosa a partir de aminoácidos (gluconeogénesis) y también están implicados en la regulación de la función inmunitaria (Sapolsky et al, 2000), entre otras muchas funciones. Aunque la principal fuente de glucocorticoides es la corteza adrenal, se sintetizan también en pequeña proporción en órganos linfoides primarios, piel o intestino (Taves et al, 2011), probablemente ejerciendo efectos muy locales; por ejemplo amortiguando la respuesta linfocitaria e inflamatoria local minimizando de esta forma el daño tisular ante un desafío antigénico, al igual que hacen los glucocorticoides circulantes (Sapolsky et al, 2000; Dhabhar, 2009).

Los glucocorticoides, aunque sean imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis y ejerzan un amplio abanico de funciones en el organismo, están implicados en la mayoría de las consecuencias negativas del estrés crónico. Se considera (Sapolsky et al (2000) que los glucocorticoides tienen principalmente dos funciones: **(a)** moduladoras (que a su vez se dividen en permisivas, supresoras y estimuladoras) y **(b)** preparatorias. Para las funciones permisivas (por ejemplo la respuesta cardiovascular) son necesarias concentraciones muy bajas de glucocorticoides; para las funciones supresoras son necesarias concentraciones mayores y se ponen de manifiesto alrededor de una hora del inicio de la situación estresante; las acciones estimuladoras tienen también lugar una hora después de iniciado el estímulo estresante y tienen como objetivo potenciar los efectos de otras hormonas liberadas durante el estrés; y finalmente, las funciones preparatorias son aquellas que tienen como objetivo poner en marcha procesos capaces de modular futuras respuestas a otros estímulos estresantes.

Los efectos de los glucocorticoides pueden ser genómicos y no genómicos (revisión en Haller et al, 2008). Los efectos no genómicos estarían mediados por receptores de membrana aún no caracterizados (Makara y Haller, 2001; Haller et al, 2008) y parecen ser relevantes para las respuestas rápidas del SNC mediadas por áreas como la PFC, la HF, la amígdala y el hipotálamo (Groeneweg et al, 2011). Por ejemplo, la conducta motora en ratas se incrementa rápidamente con la administración de corticosterona, siendo este efecto resistente a la administración de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) y al bloqueo de los receptores GR y MR (Sandi et al 1996).

Hay dos tipos de receptores intracelulares implicados en los cambios genómicos mediados por los glucocorticoides: el tipo I (el receptor de mineralocorticoides, MR) que tiene alta afinidad por la corticosterona y el tipo II (el receptor de glucocorticoides o GR) que tienen alta afinidad por el cortisol y corticoides sintéticos como la Dexametasona (Reul y de Kloet, 1985). Al unirse los glucocorticoides al dominio de unión de sus receptores genómicos estos sufren cambios y se

trasladan al núcleo de la célula, donde dimerizan y se unen a los promotores de genes con elementos de respuesta a glucocorticoides, actuando como factores de transcripción (Nishi y Kawata, 2007). También el GR es capaz de interactuar con otros factores de transcripción como AP-1 y NFkB, dando lugar a efectos rápidos sobre la transcripción de genes (en este caso por transrepresión). Por lo tanto, en respuesta a un breve incremento de la corticosterona, se produce unas respuestas génicas iniciales mediante transrepresión encaminadas a disminuir la reacción inicial al estrés, para después prevalecer los mecanismos de transactivación (Morsink et al, 2006).

La distribución periférica o central de estos receptores es diferente (De Kloet et al, 1998). Los MR están localizados en zonas muy específicas del SNC como la HF, en cambio los GR tienen una distribución más generalizada y se encuentran en zonas importantes para la retroinhibición del eje HPA como PFC, HF, PVN y adenohipófisis (revisión en Armario, 2006a).

Una de las funciones más importantes de los glucocorticoides es la retroinhibición que ejercen sobre los distintos niveles del eje HPA. Estos mecanismos pueden ser de dos tipos: rápido y lento. Sin embargo, Keller-Wood y Dallman (1984) consideran que el intermedio correspondería a lo que otros autores consideran lento y que el lento según su criterio correspondería a situaciones de elevación crónica patológica o administración muy prolongada (días) de glucocorticoides. Nosotros seguiremos la terminología más clásica de rápido y lento. La retro-inhibición rápida implicaría a receptores no genómicos aún no caracterizados y se daría cuando los niveles de glucocorticoides se están elevando en plasma. Hay algunas evidencias que involucran a los endocannabinoides en la retro-inhibición rápida actuando a través de la supresión de señales glutamatergicas estimuladoras que alcanzan el PVN (Di et al, 2003; Evanson et al, 2010). Los mecanismos de retro-inhibición lentos implican mecanismos que involucran procesos de transcripción mediados por GR y por MR y dependen del área bajo la curva (AUC) de los niveles de corticoides alcanzados en las horas precedentes. Los efectos pueden aparecer algo antes de los 60 min pero su acción óptima se sitúa alrededor de las 2 h y puede durar varias horas. Incluyen el bloqueo de la transcripción de genes de CRH, y AVP a nivel hipotalámico y POMC a nivel hipofisario (Keller-Wood y Dallman, 1984).

Otro de los parámetros a tener en cuenta en la fisiología del eje HPA es la CBG (*corticosteroid-binding globulin*). Los glucocorticoides circulan en plasma (en gran parte) unidos a la CBG, por lo tanto en forma inactiva. La fracción libre aumenta proporcionalmente mucho tras la elevación de los niveles de glucocorticoides inducidos por la exposición a estímulos estresantes. Por consiguiente, para conocer los valores biológicamente relevantes de glucocorticoides plasmáticos es necesario estudiar la fracción libre o calcularla a partir de los niveles de CBG.

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

Tras la exposición aguda al estrés se pueden detectar cambios en todos los niveles del eje HPA, siendo fundamental conocer la dinámica temporal de dichos cambios, ya que en función de ello se diseñaran los detalles del protocolo de los procedimientos experimentales y se evaluarán los resultados.

La activación de las neuronas parvocelulares del PVN se puede detectar mediante la inducción de genes de expresión temprana (IEGs) como *c-fos*, con un incremento en los niveles de mRNA que suele ser significativo a partir de los 15 min del inicio de la situación estresante, pero que

alcanzan el máximo alrededor de los 30 min (Honkaniemi et al, 1992; Imaki et al, 1992; Senba et al, 1994; Kovács y Sawchenko, 1996). Se observa también un aumento aún más rápido de la expresión del gen de CRH en el PVN que se puede detectar mediante el estudio de su transcrito primario (heteronuclear, hnRNA) (Kovács y Sawchenko, 1996; Ogilvie et al, 1998; Ma y Aguilera, 1999; Vallès et al, 2003). La sonda intrónica del CRF es una buena herramienta para el estudio de la respuesta central del eje HPA, ya que los niveles del hnRNA del CRH en condiciones basales son casi indetectables y muestran un aumento pronunciado en respuesta a situaciones estresantes de diferente intensidad con un pico a los 5 min en situaciones de estrés muy breves como la anestesia por éter (Kovács y Sawchenko, 1996). Por el contrario, los aumentos del mRNA de CRH sólo se observan de forma consistente tras 3 o 4 h del inicio de la exposición al estrés (Suda et al, 1988; Harbuz y Lightman, 1989; Darlington et al, 1992) y el incremento observado no suele ser sensible a estímulos de intensidad suave o de corta duración, debido a los altos niveles de mRNA ya presentes en condiciones basales.

La exposición a estímulos estresantes causa una rápida liberación de ACTH que se observa claramente a partir de los 5 min del inicio de la exposición. Si esta exposición a la situación estresante continúa, el máximo de liberación se suele observar a partir de los 15 min y se mantiene durante 30-60 min (García et al, 2000). A partir de este momento, se observa un descenso progresivo (Rivier y Vale, 1987; García et al, 2000) que puede acabar en niveles muy próximos a los basales a pesar de la persistencia del estímulo (10-24 h) (Kant et al, 1987; Hauger et al, 1988; Armario et al, 1990). Esta disminución progresiva se ha descrito incluso durante exposiciones a estímulos estresantes de elevada intensidad. Por tanto, la evaluación de los niveles plasmáticos de ACTH después de la primera hora de exposición al estrés no sería apropiada para valorar la intensidad de éste, ya que podría dar lugar a interpretaciones erróneas. La razón por la que se produce esta disminución progresiva no está totalmente establecida, pero parece debida, en parte a la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides, y en parte a la incapacidad de las células corticotropas de mantener una elevada liberación de ACTH durante horas (Rivier y Vale, 1987; Martí y Armario, 1998).

La dinámica de liberación de los niveles de corticosterona plasmática es muy diferente a la de la ACTH por varias razones. En primer lugar, si la exposición a la situación estresante es breve (pocos minutos), el momento apropiado para la determinación de la liberación de corticosterona será a los 15-20 min desde el inicio de la exposición, debido al tiempo requerido por la corteza adrenal para alcanzar el máximo de síntesis de glucocorticoides. En cambio el máximo de corticosterona se alcanza pasados los 30 min tras el inicio de la exposición continuada a estímulos de intensidad relativamente elevada (Levin et al, 1989; Dhabhar et al, 1997; Dal-Zotto et al, 2003). Un período de 20-30 min parece ser un tiempo de compromiso si nuestro objetivo es medir los niveles de ACTH y corticosterona simultáneamente tras un estrés de intensidad baja o moderada. En segundo lugar, la capacidad de la adrenal para liberar glucocorticoides se satura con niveles relativamente bajos de ACTH (Keller-Wood et al, 1983), de tal manera que los niveles de corticosterona serían incapaces de reflejar los niveles de ACTH. En tercer lugar, el progresivo descenso de los niveles de ACTH cuando la exposición al estrés es duradera no se observa en los niveles de corticosterona. Estos resultados no pueden explicarse por el mantenimiento de una secreción prolongada de glucocorticoides como consecuencia de un pico intenso de liberación

de ACTH, dado que no se observa con una inyección endógena de ACTH que simula la liberación inducida por el estrés. Por lo tanto, parece que bajo ciertas condiciones, podemos encontrar niveles elevados de corticosterona a pesar de observar niveles casi basales de ACTH, probablemente debido a la regulación de la respuesta adrenal a la ACTH por factores independientes del eje HPA. Es bien conocido que muchos factores circulantes pueden actuar sobre la corteza adrenal y que ésta está en contacto con células cromafines, endoteliales e inmunitaria y terminaciones nerviosas que sintetizan y liberan factores que afectan la esteroidogénesis independientemente de la ACTH. Especial atención se ha prestado a la inervación simpática por el nervio esplácnico, cuya estimulación favorecería la liberación de corticosterona actuando sinérgicamente con la ACTH (Edwards y Jones, 1993). Así, la actividad del nervio esplácnico, mediante su influencia sobre la sensibilidad de la adrenal a la ACTH, es necesaria para el mantenimiento del ritmo circadiano de la corticosterona, entre otros aspectos (Urich-Lai et al, 2006).

2.7. Marcadores de intensidad de estrés

Aunque existe un gran número de variables fisiológicas y conductuales que responden a los diversos estímulos estresantes, sólo unas pocas son sensibles a la intensidad del estímulo. En tal sentido, entendemos como marcador de estrés a aquellas variables que son sensibles a un estímulo estresante, y marcador de intensidad de estrés a aquellas que responden en forma proporcional a la intensidad del estímulo estresante. De esta manera podremos distinguir entre estímulos estresantes, no solo en función de su naturaleza o intensidad, sino también en función de las consecuencias fisiológicas que ese estímulo provoque. Así, por ejemplo, en un experimento en el que se fueron introduciendo cambios progresivos en el ambiente de los animales para incrementar el nivel de estrés, los niveles de PRL y corticosterona aumentaron en función del grado de perturbación, en cambio los de hormona Luteinizante (LH) o TSH aumentaron igual con todas las intensidades de estímulos. Los primeros se los considera marcadores de intensidad de estrés y los segundos, marcadores de estrés (Armario et al, 1986a).

La conclusión general es que entre las muchas variables sensibles al estrés, pocas pueden considerarse como marcadores de intensidad del estrés. Entre ellas se encuentran los niveles de catecolaminas (particularmente adrenalina), la glucosa (como índice indirecto de activación del SMA y por lo tanto de la liberación de adrenalina), la PRL, la ACTH, la corticosterona y la reducción en los niveles de ingesta de comida (Martí y Armario, 1998; Marquez et al, 2002).

Entre los marcadores de intensidad existen importantes diferencias en cuanto a la relación precisa con la intensidad del estímulo estresante (Armario et al 2012). Estos marcadores deberían informarnos: **(a)** del grado mínimo de intensidad de un estímulo que la variable puede detectar de manera fiable y consistente; **(b)** del rango de variación del marcador en función de la intensidad del estímulo y **(c)** del rango de intensidad del estímulo que una variable es capaz de detectar. Así, por ejemplo, los niveles plasmáticos de adrenalina, ACTH, corticosterona y PRL tienen bajos umbrales de respuesta, por lo que perturbaciones mínimas son capaces de incrementarlos (Hennessy y Levine, 1978; Natelson et al, 1981; Armario et al, 1986a y 1986b). En cambio, los niveles plasmáticos de glucosa tienen un umbral alto de respuesta, por lo que se lo considera fiable ante exposiciones a estímulos estresantes de intensidad intermedia o alta (Armario et al, 1986a; 1986b). Por último, la reducción de los niveles de ingesta o la disminución del peso corporal de

los animales, evaluada 24 h después de la exposición, muestran un umbral de activación elevado y se observan sólo tras la exposición a un estímulo intenso (Armario et al, 1990; Martí et al, 1994).

La capacidad de una variable para discriminar entre diferencias en intensidad depende de la pendiente de la relación entre el cambio en la variable de interés y la intensidad de la situación estresante. Cuanto más pronunciada es esa pendiente, mayor es la capacidad de esa variable para determinar estímulos estresantes de baja intensidad (Armario et al, 2012) (**Figura 5**). Además es importante considerar la aparición de efecto techo de una variable, como en el caso de la corticosterona, que es la variable más utilizada en la literatura, y que no es de utilidad para la evaluación de estímulos intensos dada la posibilidad de saturación de la glándula adrenal. Solo debería utilizarse esta variable para considerar situaciones de estrés de baja intensidad (exposición a ambientes nuevos) o moderadas (nado forzado) y no para situaciones de severa intensidad (choque eléctrico o la inmovilización en plancha). La utilización de la corticosterona como variable para determinar intensidad de estímulos estresantes en la literatura lleva a conclusiones erróneas e imprecisas.

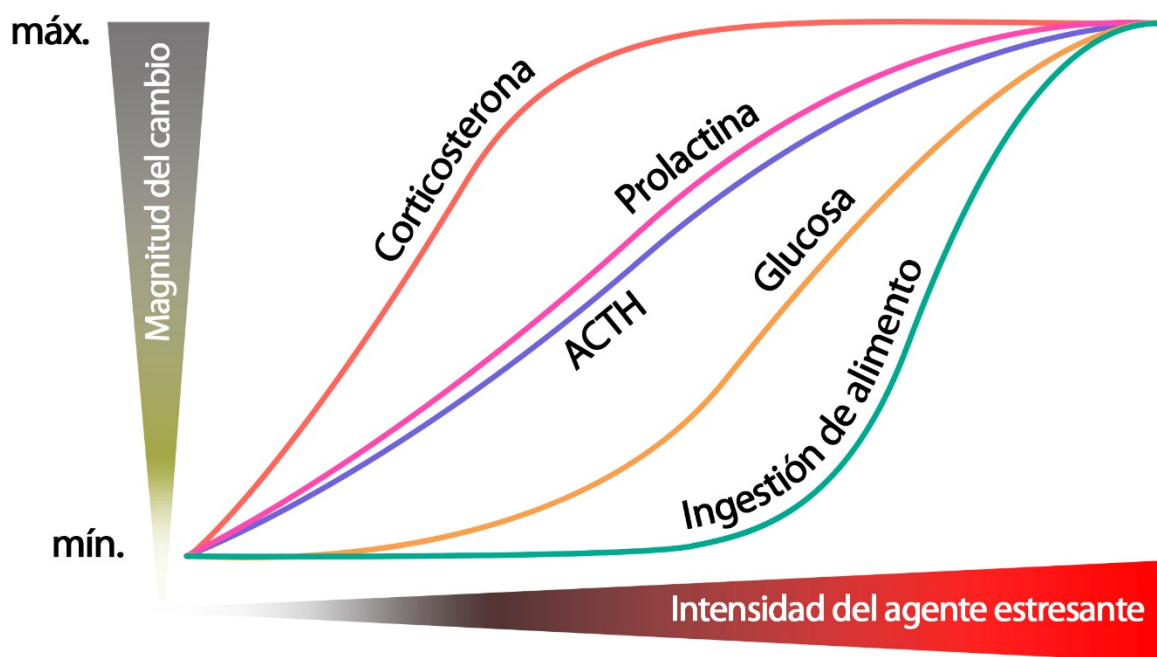


Figura 4. Representación esquemática de la respuesta de variables fisiológicas a distintas intensidades de estrés (Armario et al., 2002).

La velocidad de recuperación del eje HPA también permite valorar la intensidad de los estímulos estresantes cuando estos son de elevada intensidad (Márquez et al, 2002). Es decir, en tanto que los niveles de corticosterona inmediatamente después de finalizado un estímulo estresante intenso no sirven para discriminar la intensidad de ciertos estímulos, la dinámica de recuperación post-estrés o el área bajo la curva de esa recuperación (AUC) sí.

En humanos, la determinación de cortisol libre en saliva, como índice de impacto de estímulos estresantes sobre el eje HPA y la determinación de α -amilasa en saliva como marcador de activi-

dad del sistema nervioso simpático son determinaciones de gran utilidad, ya que son menos invasiva, menos sensible a variaciones pulsátiles, y facilitan el proceso de preparación, conservación y análisis de las muestras (Aguiló et al, 2015). Además recientemente se ha sugerido la utilidad del análisis de cortisol en pelo como índice de registro temporal de la evolución de una situación estresante crónica (Stalder y Kirschbaum, 2012). Datos de nuestro laboratorio validan la utilidad de la determinación de corticosterona en pelo de rata como índice de activación a largo plazo del eje HPA (Scorrano et al, 2014).

3. Prolactina y estrés

Una de las hormonas hipofisarias de gran interés en el estudio de la respuesta al estrés es la prolactina (PRL). Se eleva ante cualquier situación de estrés agudo tanto sistémico como emocional en ratas, pudiendo superar su valor basal hasta 10 veces y alcanzando un pico a los 10-15 min para luego descender (Armario et al, 1986a y 1996). Si la situación se prolonga en el tiempo, al cabo de unas horas puede descender a valores por debajo de los basales (López-Calderón et al, 1989). En humanos el comportamiento de esta hormona ante situaciones de estrés es similar (Armario et al, 1996).

Los mecanismos implicados en la estimulación de la secreción de PRL en situaciones de estrés no están bien establecidos. Al menos en ratas la estimulación inicial no parece venir determinada tan solo por una menor liberación de DA (factor hipotalámico inhibidor de la PRL o PIF) al sistema portal-hipofisario, sino también por un incremento en factores estimuladores o PRF aún no caracterizados (ver revisión en Armario, 1998). Uno de los factores estimuladores podría ser el VIP, pero teniendo en cuenta que se han descrito multitud de factores con actividad PRF, es posible que la regulación de la secreción de PRL en situaciones de estrés sea multifactorial, como ocurre con la ACTH. Diversos neurotransmisores, entre los que se incluyen los opiáceos endógenos, la serotonina y la histamina, se han implicado en la estimulación de la PRL en situaciones de estrés, pero los resultados no son concluyentes. Tampoco se conoce los mecanismos centrales implicados en la inhibición de la secreción de PRL observada tras la exposición crónica a un estímulo estresante de larga duración, pero esta inhibición podría venir mediada por los glucocorticoides

4. Genes de expresión temprana

Dado que el procesamiento de los estímulos estresante tiene lugar en el SNC, identificar las vías específicas implicadas en este procesamiento es de crucial importancia. La estimulación de las neuronas pone en marcha dos procesos a través de los cuales una información se procesa y transmite: la activación electrofisiológica y la activación de cascadas de segundos mensajeros y de procesos genómicos. Los mensajeros intracelulares conducen a cambios en factores de transcripción, que inician y/o reprimen la transcripción de otros genes, alterando la actividad funcional de las neuronas y en algunos casos la respuesta de la neurona a otros estímulos posteriores.

Entre los muchos genes que se expresan en las neuronas existe un grupo que se induce rápidamente a partir de factores preexistentes en la célula (CTFs o “*constitutive transcription factors*”) y por lo tanto no requieren síntesis de proteína de *ново* para su transcripción: los denominados genes de expresión temprana o IEGs (“*immediate-early genes*”), Herdegen y Leah, 1998. Estos

genes codifican proteínas con funciones diversas como proteínas de secreción, enzimas citoplasmáticas o factores de transcripción, también llamados ITFs (“*inducible transcription factors*”). Uno de los IEGs mejor caracterizados es el proto-oncogen *c-fos* que, por sus características, resulta de suma utilidad para el estudio de la activación del SNC frente a diferentes estímulos estresantes. Otros IEGs utilizados en la literatura son *c-jun*, *Arc* y *ΔfosB*, pero comentaremos principalmente *c-fos*.

Muchos factores, incluyendo factores neurotróficos y neurotransmisores, pueden activar el complejo promotor del gen de *c-fos* a través de diferentes mensajeros intracelulares (Herrera y Robertson, 1996; Herdegen y Leah, 1998). Una vez transcrito, la proteína codificada por el *c-fos* puede dimerizar con proteínas de la familia *c-Jun* formando el complejo transcripcional AP-I (proteína activadora I), el cual participa en la regulación de la expresión de numerosos genes que cuentan con un sitio de unión a AP-I en su promotor (Herdegen y Leah, 1998). Debido a la rápida síntesis de *c-fos* y al retraso en el incremento de *c-Jun*, existe una ventana libre de *c-Jun* tras la estimulación durante la cual *c-fos* puede formar heterodímeros con GR y otros factores de transcripción (ATF-4, ATF-2, p65) influenciando la expresión génica en el período inmediatamente posterior a la activación celular (revisión en Herdegen y Leah, 1998). Además existen varias combinaciones entre las familias *fos* y *jun*, de tal modo que los complejos *c-fos/c-Jun* activarían la expresión génica mientras que el complejo *c-fos/Jun B* parece ser inhibidor (Sheng y Greenberg, 1990). Estas interacciones reflejan los cambios transcripcionales complejos que tienen lugar en la neurona una vez activada. Parece existir un mecanismo de auto-represión de la expresión de *c-fos* a través del complejo AP1 (Sassone-Corsi et al., 1988) que podría contribuir al bien caracterizado descenso de la expresión a pesar de la persistencia del estímulo. Otra de las características críticas del *c-fos* es la rápida degradación de su mRNA, el cual tiene una vida media de 10-15 min (Shyu et al, 1989; Zangenehpour y Chaudhuri, 2002) con un pico máximo entre 30-60 min desde el inicio del estímulo agudo si la exposición continúa durante ese tiempo (Cullinan et al, 1995). El gen de *c-fos* codifica una proteína que también se encuentra entre las más rápidamente degradadas, con una vida media de 90-120 min y una desaparición gradual entre las 4 y 6 hs después de una estimulación puntual (Jariel-Encontre et al, 1997; Kovács, 1998).

Se considera la expresión de *c-fos* como una buena herramienta de cartografía anatómica funcional para identificar células y circuitos activados en respuesta a diferentes estímulos (revisión en Hoffman y Lyo, 2002). La expresión de *c-fos* tiene dos importantes características: su débil expresión en condiciones basales y su rápida inducción por un amplio rango de estímulos (revisión en Armario, 2006a; 2006b). Sin embargo no se lo puede considerar un indicador universal de activación electrofisiológica de la neurona. Si bien ambos fenómenos suelen ir unidos, pueden en ciertos casos dissociarse. En primer lugar puede inducirse despolarización de la neurona sin expresión de *c-fos* dado que son los cambios en las vías de señalización intracelular los que inducen la expresión del gen y no la despolarización *per se* (Luckman et al, 1994; Robertson et al, 1995). En segundo lugar, los patrones sostenidos de activación neuronal no parecen ir acompañados de la inducción de *c-fos* (Hoffman y Lyo, 2002). Finalmente el hecho que una neurona se active y exprese *c-fos* no indica necesariamente que esta neurona juegue un papel relevante en el procesamiento de un estímulo ya que puede activarse por mecanismos generales de *arousal*.

Otra limitación de la utilización de *c-fos* como marcador de activación neuronal es que no identifica el tipo de neurona activada, por lo que cuestiones básicas como saber si se trata de una neurona glutamatérgica estimuladora o una GABAérgica inhibidora quedan sin responder. La utilización de técnicas de doble marcaje, combinando en ellas *c-fos* con otros marcadores específicos de un fenotipo neuronal particular, puede darnos información al respecto (Ceccatelli et al, 1989; Rotllat et al, 2007; 2013).

4.1. Genes de expresión temprana y estrés

Durante las últimas dos décadas se ha utilizado ampliamente la inducción de *c-fos* para comprender como el SNC procesa los estímulos estresantes (Imaki et al, 1993; Herman y Cullinan, 1997; Sawchenko et al, 2000; Pacak y Palkovits, 2001; Herman et al, 2003; Kovács et al, 2005). El análisis de los datos relacionados con la expresión de *c-fos* apoya la idea de la existencia de dos tipos de estímulos estresantes: sistémicos y emocionales (Sawchenko et al, 2000; Herman et al, 2003). Esta división se basa en la caracterización de los patrones de activación observados tras la exposición a un amplio abanico de estímulos.

En términos generales, tras la exposición a diferentes estímulos emocionales como la inmovilización en tubo, el nado forzado o el olor a depredador, se ha descrito una marcada activación de la expresión de *c-fos* en todas las áreas allocorticales e isocorticales y especialmente en PFC (Cullinan et al., 1995; Day et al., 2004; Ons et al., 2004). Dentro de las áreas subcorticales, se ha observado una activación consistente en respuesta a numerosos estímulos estresantes en el LS y más concretamente en su subdivisión ventral (LSV) (Campeau et al., 1997; Stamp y Herbert, 1999; Armario, 2006b). Así mismo, también se ha descrito inducción de *c-fos* ante estímulos estresantes en la MeA (Cullinan et al, 1995; Ons et al, 2004), mientras que en CeA y BLA la inducción es menor (Cullinan et al, 1995). Además, se ha observado expresión de *c-fos* en el BST tras la exposición a estímulos estresantes como el ruido, la inmovilización en tubo, la natación forzada o el choque eléctrico, aunque existe cierta controversia respecto a qué subregiones se activan en respuesta al estrés (Duncan et al, 1996; Cullinan et al, 1995; Campeau y Watson, 1997; Bonaz y Rivest, 1998; Li y Sawchenko, 1998).

Algunas áreas muestran activación tras la mera manipulación del animal (*handling*) o la exposición a ambientes nuevos que son inevitables con algunos estímulos estresantes (v.g. la caja donde se aplica el choque eléctrico), independientemente del estímulo particular presentado con posterioridad (revisión en Kovák, 1998). Entre estas áreas que se activan por estímulos mínimos se encuentran las áreas corticales, la formación hipocámpal (HF), y algunos núcleos talámicos. Esta activación se la relaciona al estado de activación general (*arousal*) (Cullinan et al, 1995; Duncan et al, 1996; Campeau y Watson, 1997), que sería un factor común a la mayoría de los estímulos estresantes emocionales y podría explicar, al menos en parte, las coincidencias en el patrón de activación.

Pocos trabajos han abordado directamente el estudio de la respuesta de *c-fos* frente a estímulos emocionales de diferente intensidad. Campeau y colaboradores (Campeau y Watson, 1997; Campeau et al, 1997) usando distintas intensidades de ruido o paradigma de miedo condicionado. Estos últimos autores hallaron tres patrones de activación ante distintas intensidades de ruido:

(a) áreas que responden a la exposición a la caja experimental (ambiente nuevo) independientemente del estímulo presentado y su intensidad; (b) áreas relacionadas con el sistema auditivo, que responden en forma proporcional a la intensidad del ruido y (c) áreas en las que se encuentra inducción de *c-fos* solo con las intensidades de ruido más elevadas (90 y 105 dBA).

Por otro lado Pace y colaboradores (2005), utilizando distintos ambientes nuevos (una caja distinta a la de estabulación, un campo abierto circular y un pedestal elevado del suelo) y la inmovilización en tubo evaluaron simultáneamente los niveles de ACTH y corticosterona y la expresión de *c-fos* en algunas áreas. Encuentran una buena correlación de estas hormonas periféricas con la inducción de *c-fos* en el PVN, pero no así en el hipocampo y la corteza donde la inducción parece estar relacionada con el potencial de exploración que ofrecen el pedestal elevado y el campo abierto respecto a la inmovilización.

En nuestro laboratorio (Ons et al, 2004) hemos comparado la expresión de *c-fos* y *Arc* (“*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*”, que codifica para una proteína de distribución fundamentalmente telencefálica que está asociada a la actina y que está involucrada en procesos de plasticidad sináptica) tras la exposición a estímulos estresantes emocionales de distinta intensidad: ambiente nuevo, natación forzada e inmovilización en plancha (IMO). Respecto a *c-fos*, hay áreas como la PFC que responden de manera similar a los tres estímulos, mientras que LS, MeA, PVN y locus coeruleus (LC) presentan una inducción de *c-fos* que refleja al menos proporcionalmente la intensidad del estímulo. También, se observó una fuerte inducción de *Arc* pero con un patrón diferente de activación que el de *c-fos*. Por ejemplo, se activó la expresión de *Arc* pero no de *c-fos* en el núcleo accumbens tras la inmovilización y en el hipocampo tras la exposición a un ambiente nuevo, y no se observó inducción de *Arc* en áreas diencefálicas o del tronco encefálico. Estos datos demuestran que *Arc* tiene un restringido patrón de inducción neuroanatómico después de la exposición a estímulos emocionales. No obstante, la relación con la intensidad del estímulo fue similar con *c-fos* y *Arc*.

En resumen, la literatura referente a distintos estímulos emocionales nos indica la existencia de zonas como la corteza prefrontal, la corteza piriforme, el tálamo y la corteza orbital lateral y ventral que presentan niveles similares de inducción de *c-fos*, independientemente de la intensidad del estímulo presentado. En otras áreas, cuanto mayor es la intensidad del estímulo estresante, menor es la inducción de *c-fos*, como el hipocampo y el giro dentado. En cambio, la inducción de *c-fos* en unas pocas áreas como LS, MeA, algunas regiones del BST, el PVN y el LC sí parece discriminar entre las distintas intensidades de los estímulos estresantes emocionales (Ons et al, 2004). Esta aparente insensibilidad de determinadas áreas del SNC a la intensidad de los estímulos estresantes sugiere que existe un número limitado de neuronas que responden a cualquier situación de estrés con la expresión de *c-fos* en forma de todo o nada. Por otro lado, la existencia de áreas que responden de manera proporcional a la intensidad de los estímulos emocionales sugiere que, o bien se recluta un número mayor de neuronas con los estímulos más severos (y posiblemente existen neuronas con distintos umbrales de activación), o bien la población activada es limitada en número y cuanto más severo es el estímulo más se activa cada neurona individual (Armario, 2006a).

Otra manera de estudiar como el cerebro procesa diferentes tipos de estímulos estresantes emocionales es mediante la determinación de las neuronas positivas para histona H3 fosforilada (pH3s10) por inmunohistoquímica. Rotllant et al (2013) determinaron, utilizando la IMO o un ambiente nuevo como estímulos estresantes, que hay un patrón más selectivo de activación neuronal evaluada mediante pH3s10 que mediante el mRNA de *c-fos*. Por otro lado, datos no publicados de nuestro laboratorio (Ubeda-Contreras, 2015) indican que en respuesta a tres estímulos emocionales diferentes (la exposición a un ambiente nuevo, la exposición a un ambiente nuevo con olor a depredador y la IMO), encontramos tres patrones de activación diferentes: **(a)**: áreas donde el incremento en el número de neuronas pH3s10 positivas fue independiente del estímulo aplicado (PFC o MeA), **(b)**: áreas que muestran una relación positiva con la intensidad del estímulo aplicado (LS) y **(c)**: áreas que muestran una relación negativa con la intensidad del estímulo aplicado (ínsula posterior, algunas subdivisiones de la amígdala y algunas subdivisiones del estriado). Estos resultados sugieren también que el patrón de activación causado por los estresores emocionales es más específico y restringido con la determinación de pH3s10 que con la activación de *c-fos*, aunque es necesario hacer un estudio en paralelo determinando las dos variables para poder confirmar estos resultados.

Para explicar cómo estímulos emocionales de naturaleza distinta terminan por activar las mismas áreas del SNC existen dos hipótesis alternativas (Armario, 2006a). La primera y más probable, supone que se activa la misma población neuronal, independientemente del estímulo presentado. Esta hipótesis encaja con los conceptos de *arousal* y de la activación inespecífica de la corteza a través de proyecciones monoaminérgicas procedentes del tronco encefálico y de las señales procedentes de los núcleos de proyección inespecífica del tálamo. La segunda posibilidad contempla un cierto nivel de selectividad, con activación de circuitos anatómicamente próximos pero funcionalmente separados. Es decir, en una misma área del SNC podrían coexistir poblaciones neuronales con distintos fenotipos neuroquímicos (especialmente respecto al neuropéptido utilizado como co-transmisor), cada uno de los cuales se activaría frente a un estímulo concreto. Existen pocos datos que puedan discriminar entre ambas hipótesis, aunque nuestros resultados sugieren la existencia de poblaciones neuronales en áreas superiores como la corteza o el septum que responden específicamente frente a distintos estímulos estresantes emocionales (Marín, Nadal y Armario, 2015 no publicado).

4.2. Genes de expresión temprana y psicoestimulantes

Desde principios de la década del 90 se han venido utilizando los genes de expresión temprana para el estudio de las bases anatómico-funcionales de la adicción (revisión en Sumner et al, 2004). Las drogas de abuso inducen la expresión de IEGs y el patrón particular de activación que provocan depende de la droga (Erdtmann-Vourliotis et al, 1999; Valjent et al, 2004), de la dosis (Rotllant et al, 2010) y de si la administración es aguda o crónica (Torres y Horowitz, 1999).

La psicoestimulantes clásicos como la cocaína y la anfetamina (AMPH) actúan incrementando la disponibilidad de DA y otras monoaminas en la hendidura sináptica, por lo que su acción neurofarmacológica primaria, responsable de los efectos psicomotores y reforzantes, se sitúa principalmente en los circuitos monoaminérgicos, en especial (pero no exclusivamente) en los dopaminérgicos. Se postula que el sustrato neurobiológico para el efecto reforzante de las drogas

de abuso son los sistemas dopaminérgicos, tanto el sistema nigro-estriatal, con proyecciones desde la sustancia nigra (SN) hacia el estriado, como el sistema meso-cortico-límbico, con sus proyecciones desde el área tegmental ventral (VTA) hacia el Acb, el tubérculo olfatorio, la PFC y la amígdala (Koob et al, 1998). El circuito del sistema nigro-estriatal está involucrado en el desarrollo del hábito del consumo de cocaína (Belin y Everitt, 2008), mientras que el circuito del sistema meso-límbico-cortical está más vinculado con los efectos agudos reforzantes asociados a la liberación de DA especialmente en el accumbens Shell (AcbSh) (Di Chiara y Imperato, 1988; Di Chiara y Bassareo, 2007).

La administración aguda de AMPH en ratas provoca un aumento rápido y transitorio de la expresión de *c-fos* principalmente en CPU y el Acb (Graybiel et al, 1990; Snyder-Keller, 1991; Johansson et al, 1994; Badiani et al, 1998; Uslaner et al, 2001a y 2001b)). Esta activación de *c-fos* en el CPU inducida por la AMPH parece mediada por la liberación de DA ya que se bloquea con antagonistas dopaminérgicos D₁ y D₂ (Snyder-Keller, 1991; LaHoste et al, 2000, Ferguson et al, 2003). La AMPH también induce la expresión de *c-fos* y otros IEGs (Δ fosB, junB, krox-24 y fra-1) en diversas regiones del SNC como la PFC, la HF, la CeA (Day et al, 2001), el tálamo, el hipotálamo y el tronco encefálico (Persico et al, 1993), incluyendo la VTA (Nikulina et al, 2004; Colussi-Mas et al, 2007; Rotllant et al, 2010) y los núcleos del Rafe (Colussi-Mas et al, 2007; Rotllant et al, 2010).

Existen tres estudios que han aportado información sobre la activación generalizada del SNC tras la administración de AMPH (Ostrander et al, 2003; Miyamoto et al, 2004 y Rotllant et al, 2010). El mapeo de activación general del SNC realizado en nuestro laboratorio utilizando dosis de 1.5 y 5 mg/kg de AMPH (Rotllant et al, 2010), mostró activación de *c-fos* en multitud de áreas, y puso además en evidencia, que hay áreas donde la activación es dosis dependiente (AcbSh, las diferentes subdivisiones del PVN y del Rafe, la CeA y la MeA), mientras que en otras áreas la activación es independiente de la dosis utilizada (mPFC-Cg1, mPFC-IL, VST, CPuDL, BLA y VTA). El estudio de Rotllant et al., también reveló la existencia de áreas que respondían con mayor intensidad a la dosis menor de AMPH (PFC-PrL, AcbC y las regiones dorsal y ventral del estriado medial). Por otro lado, se realizó un análisis factorial que sugería la existencia de cuatro circuitos nerviosos diferenciados activados en respuesta a la AMPH: **(a)**: áreas ricas en neuronas dopaminérgicas como PFC, Acb, CPu y VTA, **(b)**: áreas con proyecciones serotoninérgicas (Rafe), **(c)**: la parte dorso-lateral del CPu y **(d)**: PVT del tálamo y PVN.

De la misma manera que la AMPH, la cocaína también induce la expresión de patrones específicos de *c-fos* en el estriado, preferentemente en las neuronas que expresan receptores D₁, las cuales proyectan hacia la SN *pars reticulata* (Graybiel et al, 1990; Cenci et al, 1992; Johansson et al, 1994). Esta inducción de *c-fos* se sitúa preferentemente en los cuadrantes dorso-medial y dorso-lateral del estriado, en tanto que en las zonas ventrales la expresión suele ser menos pronunciada y uniforme (Graybiel et al, 1990; Steiner y Gerfen 1993, 1995). La administración aguda de cocaína también aumenta la expresión de *c-fos* en PFC, Acb y cerebelo (Couceyro et al, 1994; Shaham et al, 2000). Se ha observado una buena correlación entre la actividad locomotora inducida por la droga y la expresión de proteína FOS en áreas como PFC, CPu, AcbC y AcbSh (Zombeck et al, 2010).

En relación a las áreas implicadas más directamente en la regulación del eje HPA, la mayoría de las drogas de abuso activan al PVN (revisión en Lu y Shaham, 2005; Sinha, 2005; Armario 2010), aunque las vías y mecanismos no están claros. La activación del PVN lleva a la subsecuente liberación de ACTH y corticosterona. Sin embargo, el aumento de hormonas del eje HPA ante la administración de cocaína no correlaciona con el aumento de la expresión del *c-fos* en el PVN (Torres y Rivier, 1992), aunque se incrementen los niveles de CRH y lesiones en el PVN reduzcan marcadamente la respuesta de la ACTH a la droga (Rivier y Lee, 1994).

Utilizando técnicas de doble marcaje (*c-fos* y CRF), se ha observado que la AMPH activa en el PVN similar número de neuronas (*c-fos*+) que la IMO (inmovilización en tabla), pero menor número de neuronas CRF+ (Rotllant, et al, 2007). Esto sugiere que otros factores hipotalámicos que se sumarían al CRF estarían involucrados en la activación del eje HPA ante la administración de AMPH (Armario, 2010).

5. Interacción entre estrés y psicoestimulantes

La administración aguda de varias drogas de abuso estimula en menor o mayor grado la respuesta del eje HPA, liberando ACTH y glucocorticoides, aunque la clasificación clásica de las drogas de abuso en estimulantes o depresivas no contribuye a explicar los efectos sobre el eje HPA (Armario, 2010). Respecto a los psicoestimulantes, se ha demostrado elevación en los niveles de ACTH y/o corticosterona tras la administración aguda de cocaína (Borowsky y Kuhn, 1991; Sarnyai et al 1992; 1993), AMPH (Antelman et al, 1992; Gagliano et al, 2009) y MDMA (Nash et al, 1988; Do Couto et al, 2011). El CRH tiene un rol fundamental en la activación del eje HPA ante la administración de cocaína (Armario, 2010), ya que la administración de un antisuero anti-CRH, pero no la administración de un antisuero anti-AVP, bloquea la respuesta del eje HPA a la cocaína, (Rivier y Lee, 1994). La cocaína activa el PVN mediante diferentes neurotransmisores, lo que sugiere una regulación multifactorial (Armario, 2010).

La AMPH incrementa los niveles de ACTH (Gagliano et al, 2009; Gómez-Román et al, 2016) y lo hace de manera dosis dependiente (Gagliano et al, 2015, datos no publicados de nuestro laboratorio). Como consecuencia del efecto sobre la ACTH, la AMPH aumenta los niveles de corticosterona (Knych y Eisenber, 1979; Swerdlow et al, 1993; Gagliano et al, 2009; Gómez-Roman et al, 2016). La respuesta máxima de corticosterona a la administración de 2 mg/kg de AMPH se observa a los 30 min post-administración y se mantiene durante los 90 min posteriores (Gagliano et al, 2009). El incremento en los niveles de corticosterona tras la administración de AMPH (0.5, 1 y 5 mg/kg sc) es dosis dependiente Swerdlow et al (1993).

Estudios en humanos indican la existencia de una elevada comorbilidad entre el consumo de drogas y trastornos psiquiátricos asociados al estrés como la ansiedad y la depresión (King et al, 1996; Kandel et al, 1997). También se ha sugerido que el consumo inicial de drogas de abuso se ve favorecido en individuos que han experimentado situaciones estresantes (revisión en Jacobsen et al, 2001). Se ha demostrado que tras largos períodos de abstinencia hay una recaída en individuos adictos a la cocaína, heroína y alcohol debido no sólo a un nuevo contacto con la droga (Brown et al, 1995; Mendelson y Mello, 1996; O'Brien, 1997) sino también a la exposición a situaciones estresantes (Sinha et al, 2000; 2006).

Así pues, el desarrollo de la adicción está asociado a la alteración de los circuitos que regulan la respuesta al estrés (Koob y Le Moal, 2005; Le Moal y Koob, 2007). Se ha sugerido un papel importante de los circuitos del estrés en la vulnerabilidad inicial (adquisición) al consumo de drogas de abuso (revisión en Piazza y Le Moal, 1998; Kreek y Koob, 1998), quizás incrementando la tasa de liberación de dopamina en el Acb y aumentando las propiedades reforzantes de las drogas (Piazza y Le Moal, 1998). También se ha propuesto un papel fundamental del estrés en el desarrollo y mantenimiento de la conducta adictiva (Kreek y Koob, 1998; Goeders, 2003)

Hay dos modelos clásicos para evaluar la capacidad reforzante de las drogas: la autoadministración operante y el establecimiento del CPP (*Conditioned place preference*) (Lu y Shaham, 2005). Estímulos como el choque eléctrico en las patas, la separación maternal, la derrota social o los ambientes sociales inestables, alteran la conducta de autoadministración de diversas drogas de abusos, disminuyendo el tiempo necesario para adquirir la respuesta de autoadministración en cajas operante o favoreciendo su mantenimiento (revisión en Lu et al, 2003). Por ejemplo, se ha observado en ratas un aumento de la preferencia por el contexto asociado a la AMPH tras la exposición previa a la inmovilización en tubo (Capriles y Cancela, 1999) o un aumento de la preferencia por el contexto asociado a la cocaína tras la exposición previa al choque eléctrico o a la natación forzada (Redila et al, 2008).

Estudios en animales también indican que si bien el estrés puede participar en las fases iniciales de la adicción, su papel más relevante parece tener lugar durante la abstinencia y la recaída (Piazza y Le Moal, 1998; Kreek y Koob, 1998; Shaham et al, 2000; Aston-Jones y Harris, 2004). En animales de experimentación, la recaída en el consumo de una droga puede estar asociado a un nuevo contacto con la droga (*priming*), a la exposición a estímulos condicionados asociados a la droga o a la exposición a estímulos estresantes (revisión en Stewart, 2000; Shalev et al, 2002, 2010; Weiss, 2005; Mantsch et al, 2015). Por ejemplo, después de un proceso de extinción, la exposición a estímulos estresantes como natación forzada en agua fría reinstaura la conducta de autoadministración de cocaína (Conrad et al, 2010). Sin embargo no todos los estímulos estresantes inducen recaída de la misma manera (Mantsch et al, 2015), existiendo un efecto diferencial de distintos estímulos estresantes (choque eléctrico intermitente, privación de comida, natación forzada, restraint, etc) sobre la recaída en el consumo de heroína, cocaína, alcohol, nicotina y meta-anfetamina. El BST y la CeA tienen importantes roles en la recaída del consumo inducida por el estrés. Los estímulos estresantes activan el VTA que provee inervación dopaminérgica al BST y CeA, también potencian las proyecciones CRFérgicas de CeA a BST; esta activación del BST puede inducir la recaída (Erb et al, 2001). Otros estudios recientes indican que el choque eléctrico induce activación de las proyecciones CRFérgica y glutamatérgica desde el BST a VTA, siendo esa activación crítica para la recaída en el consumo de drogas (Vranjkovic et al 2014).

Parece, por tanto, que el CRF juega un rol fundamental en la neurobiología de la recaída (Zorrilla et al, 2014). La propia administración aguda de CRF en el BST es también capaz de inducir recaída, mientras que la administración de un antagonista específico de CRFR₁ bloquea la recaída inducida por el choque eléctrico tanto en paradigmas de autoadministración operante como de CPP (revisión Lu et al, 2003). Estos son efectos extrahipotalámicos del CRF ejercidos directamente en el BST (Shaham et al, 2000; Lu y Shaham, 2005). Además existe un incremento en la liberación de CRF en la CeA y en el BST durante la abstinencia a la cocaína (Richter y Weiss,

1999). Por otro lado, Wang y colaboradores (2005; 2007) encontraron que el CRF en el VTA es crítico para la restauración de la búsqueda de cocaína inducida por el choque eléctrico.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el efecto de los psicoestimulantes (AMPH y cocaína) puede modificarse por el estrés que induce el ambiente nuevo en el cual son administrados. La respuesta motora a la AMPH es mayor cuando ésta es administrada en un ambiente distinto a la caja de estabulación (Badiani et al, 1995a; 1995b; 1997; 1998). Además, la expresión de *c-fos* inducida por la administración aguda de AMPH o cocaína también es mayor en estas condiciones (Badiani et al, 1998; Uslaner et al 2001a; 2001b), también los niveles de *c-fos* son mayores que los obtenidos con cada estímulo por separado a nivel de la PFC (Uslaner et al, 2001a) y del Acb y CPu (Badiani et al, 1998). Estos datos sugieren una sinergia positiva entre psicoestimulante y estrés. No obstante, el efecto potenciador del ambiente nuevo aparece en CPu y AcbC, pero no en AcbSh y tampoco en la región medial y lateral del septum (Badiani et al, 1998). Por otro lado, en la CeA y en la región oval del BST se observó menor expresión de *c-fos* ante similar situación (Day et al, 2001; 2005; 2008), sugiriendo un efecto inhibitor del ambiente nuevo sobre la expresión de *c-fos* inducida por la AMPH, es decir una sinergia negativa entre ambos estímulos. Esta interacción negativa se ha visto confirmada al demostrarse que estímulos emocionales como el ruido o la inmovilización en tubo son capaces de inhibir la activación de la CeA inducida tanto por un estímulo estresante sistémico (IL-1 β) como por la administración de AMPH (Day et al, 2005). También se ha observado una interacción negativa tras la administración de cocaína inmediatamente después de la exposición a estrés por derrota social (exposición durante 20 min a un residente agresivo) en áreas del SNC como la PAG, DR y LC (Nikulina et al, 1998), obteniéndose una menor inducción de *c-fos* que la causada por cualquiera de los dos estímulos por separado.

Más importante aún parece ser el cambio en el fenotipo neuronal activado en el estriado cuando la droga se administra en un ambiente nuevo. Como es bien sabido, en este núcleo hay mayoritariamente dos poblaciones neuronales GABAérgicas: una expresa principalmente el receptor dopaminérgico D₁, dinorfina (DYN) y sustancia P (SP) y proyecta preferentemente hacia el *globus pallidum* segmento interno y la SN *pars reticulata* (vía directa) y la otra expresa principalmente el receptor D₂ y encefalina (ENK) y proyecta hacia el *globus pallidum* segmento externo y al núcleo subtalámico (vía indirecta). Mientras que la exposición a un ambiente nuevo no tiene efecto sobre la expresión de *c-fos* en el estriado y la administración de AMPH induce la activación de neuronas DYN+, con la administración de AMPH en un ambiente nuevo se activan tanto las neuronas DYN+ como las ENK+ (Badiani et al, 1999; Uslaner et al, 2001b; Ferguson et al, 2003), lo que nos está indicando que la activación de algunas poblaciones neuronales parece depender del contexto (quizás el grado de estrés) en el que se administra la droga.

La exposición repetida a la AMPH induce desensibilización del eje HPA (disminución de ACTH y corticosterona) y también sensibilización conductual (aumenta la actividad motora) a corto (Gagliano et al, 2009) y largo plazo (Everitt y Wolf, 2002; David et al, 2015); esto podría jugar un rol importante en la persistencia de la conducta de búsqueda de la droga. Además, la administración de una sola dosis de AMPH es capaz de inducir sensibilización a largo plazo del eje HPA ante exposiciones posteriores a un estímulo estresante sistémico como la IL-1 β y una sola exposición a la IL-1 β puede provocar sensibilización ante administraciones posteriores de AMPH

(Schmidt et al, 2001). En este mismo trabajo, los autores describen un aumento de liberación de noradrenalina *in vitro* en el PVN a medida que se van repitiendo las exposiciones a IL-1 β o AMPH, adjudicándole este fenómeno de sensibilización a vías adrenérgicas directas sobre el PVN.

Nuestro laboratorio también ha estado interesado en la relación entre estrés y psicoestimulantes, y la aproximación que hemos utilizado ha sido exponer a los sujetos a ambos tipos de estímulos. Nuestros datos previos, utilizando técnicas de doble marcaje (FOS + CRF) han demostrado que estímulos estresantes severos como la IMO y la administración de AMPH causan similar expresión de FOS en el PVN, aunque el estímulo estresante activa más neuronas CRF+ que la droga (Rotllant et al, 2007). En otro estudio (Rosa, 2015 no publicado), utilizando un diseño similar, hemos expuesto a los animales de forma simultánea a cocaína y a un estímulo estresante de elevada intensidad como es la IMO y hemos comparado también la expresión de *c-fos* de ambos estímulos por separado con la inducida por la exposición simultánea a ambos estímulos. En la mayoría de las áreas analizadas se encuentra un efecto sumatorio, en ningún caso se evidencian sinergias positivas, y resulta interesante que en ciertas áreas hay sinergias negativas: en el cortex cingulado la IMO inhibe la expresión inducida por la cocaína, y en el Acb, BST y DR la cocaína inhibe el efecto de la IMO.

Recientemente hemos demostrado también (Gómez-Román et al, 2016) una interacción negativa entre AMPH y estímulos estresantes de naturaleza diferente como la IMO, la natación forzada y la inyección de IL-1 β . La AMPH *per se* estimula los niveles de hormonas del eje HPA sin aumentar los niveles de glucosa y, por otro lado, reduce los niveles periféricos de esas hormonas tras la exposición a cualquiera de los estímulos estresantes mencionados. Además, esta interacción negativa afecta al PVN al ponerse de manifiesto un bloqueo de la expresión del gen del CRF inducida con la natación forzada. Por otro lado, la interacción negativa entre AMPH y estrés no se restringe solamente al eje HPA, ya que el aumento de los niveles de glucosa que ocurre tras la exposición a estímulos estresantes se ve reducido cuando los estímulos estresantes se presentan conjuntamente con la inyección de AMPH, indicándonos una interacción negativa también a nivel del eje SMA.

La AMPH también disminuye la expresión de *c-fos* inducida por el estrés en otras áreas críticas para el procesamiento de los estímulos estresantes como el LS y la PFC-PrL, aunque no así en la MeA, AcbSh o CPuDL donde se evidencia un efecto sumatorio o en CPuVL donde se evidencia una sinergia positiva (Gómez-Roman, 2011).

El trabajo de nuestro grupo (Gómez-Román et al, 2016), representa el origen y marca las pautas a seguir de esta tesis doctoral. Una vez confirmada la interacción negativa entre un estimulante como la AMPH y diferentes tipos de estímulos estresantes, nos planteamos si esa interacción se daría también con un estimulante del SNC de uso farmacológico en el ser humano como el metilfenidato (MPH), cuya principal aplicación terapéutica es el Trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH). Elegimos inicialmente un estímulo estresante emocional de intensidad intermedia como la natación forzada, para extenderlo luego a otras situaciones de estrés.

6. Metilfenidato: opción terapéutica de elección para el TDAH en humanos

El fármaco más utilizado en el tratamiento del TDAH es el MPH (Ritalin®, Ritalina®, Concerta®, Rubifen®). El rango de dosis terapéutica más utilizado oscila entre 0.5 y 2 mg/kg/día (Sprague y Sleator, 1977; Haleem et al, 2015). Su mecanismo de acción consiste en bloquear el transportador de DA (DAT) y el de NA (NET), pero tiene poco efecto sobre el de 5-HT (SERT), a diferencia de otros estimulantes del SNC como la cocaína (Han y Gu, 2006). Como consecuencia, el MPH aumenta los niveles de DA y NA, pero no de 5-HT a nivel sináptico (Kuczenski y Segal, 1997, 2002; Segal y Kuczenski 1999; Brandon y Steiner, 2003). Estudios in vitro señalan que su potencia para bloquear DAT es mayor que el de la cocaína y su potencia para bloquear NET es similar al de la AMPH (Han y Gu, 2006).

El rango intermedio de dosis terapéuticas de MPH (0.80 mg/kg) en voluntarios humanos sanos bloquean el 60% del DAT en el estriado, aumentando significativamente la disponibilidad de DA (Volkow et al, 2002). Se asume que los efectos terapéuticos del MPH son en parte debidos al incremento del tono dopaminérgico, pero los efectos sobre la NA están también relacionados con el aumento de la atención que induce el fármaco. De hecho, el MPH por vía oral en voluntarios adultos sanos es más potente bloqueando al recaptador de NA que al de DA (Hannestad et al, 2010).

El TDAH es un trastorno del desarrollo definido en el DSM-V que cursa con un patrón persistente de inatención (falta de atención y dificultad para mantener la atención, ausencias, dificultad de organización, falta de entusiasmo) y/o hiperactividad-impulsividad (movimientos frecuentes de manos y pies, imposibilidad de quedarse quieto, hablar excesivamente, interrumpir los discursos ajenos) hechos que interfiere con el normal funcionamiento y desarrollo del individuo. Para el diagnóstico, algunos de estos síntomas deben haberse presentado antes de los 12 años, manifestarse tanto en los ámbitos educativos como en el hogar y no deben ser consecuencia de otros trastornos mentales como trastornos psicóticos, trastornos del estado de ánimo, de ansiedad, de personalidad o del consumo de sustancias adictivas. Existen tres tipos de TDAH: TDAH-A, con predominio de la falta de atención, TDAH-HI, con predominio de los síntomas de hiperactividad/impulsividad, y TDAH-C, que combina ambos tipos de síntomas. También se clasifican en leve, moderado o grave dependiendo de la gravedad de los síntomas (DSM-V, 2014). En humanos, administrado oralmente, el MPH lleva 60 años utilizándose como opción terapéutica de primer orden para el tratamiento del TDAH, puesto que en estos pacientes mejora el control ejecutivo, reduce la impulsividad y mejora la memoria de trabajo. Sin embargo, también puede tener varios efectos secundarios como retraso en el crecimiento (por sus efectos anorexígenos), insomnio (por sus efectos psicoestimulantes), náusea y riesgos cardiovasculares (por sus acciones sobre el SNA simpático).

Aunque la mayoría de los estudios en humanos sobre los efectos del MPH en las funciones cognitivas se han realizado en pacientes con TDAH (especialmente niños y adolescentes), también se han evaluado sus efectos en voluntarios adultos sanos, los cuales serían más comparables con los sujetos utilizados en nuestro trabajo. En voluntarios sanos el MPH en general potencia las funciones ejecutivas dependientes de la PFC. Dicho aumento se manifiesta en diversas pruebas. Por ejemplo, mejora el rendimiento en la tarea de *Stroop color Word* (que mide función ejecutiva)

(Moeller et al. 2014), aumenta la flexibilidad cognitiva en tareas de *set shifting*, que miden memoria declarativa y espacial (Linssen et al. 2012), disminuye la falta de inhibición conductual en tareas tipo *stop-signal* o similares (Turner et al. 2003; Linssen et al. 2012; Pauls et al. 2012) y potencia la memoria de trabajo (ver revisión en Linssen et al. 2014). Sin embargo, los efectos del MPH en este tipo de poblaciones no son tan lineales y dependen del tipo de tarea y de las capacidades cognitivas del sujeto (Finke et al. 2010; Van der Schaal et al. 2013). Cabe también mencionar que ciertas subpoblaciones de voluntarios sanos (p.e. estudiantes universitarios) pueden realizar un uso abusivo/recreacional de la sustancia (Steiner y Van Waes, 2013), de acuerdo con los estudios de laboratorio en humanos que indican que tiene poder reforzante, de forma dosis-dependiente, en paradigmas de *progressive-ratio* (Rush et al. 2001). No obstante su capacidad adictiva en pacientes que hacen un uso terapéutico parece limitada (Fredriksen et al. 2013). Por último, los efectos del MPH en la impulsividad (motora) en voluntarios sanos no han estado muy bien caracterizados, pero podrían ser negativos (aumento de la impulsividad) como muestran ciertos datos (Voon et al. 2015), de acuerdo con los estudios en modelos animales que sugieren que el fármaco aumenta la impulsividad en las ratas que tienen una impulsividad basal baja (Caprioli et al. 2015).

Aunque no existen tantos estudios respecto a la actividad basal del eje HPA y la respuesta biológica al estrés en el TDAH como en otras alteraciones psiquiátricas como la depresión o la esquizofrenia, se han ido publicando diversos estudios, particularmente en la última década. En la revisión que hemos realizado hemos distinguido entre la actividad basal y la respuesta a situaciones de estrés. También hemos revisado la influencia del tratamiento con MPH sobre la actividad del eje HPA. La mayoría de estudios se han llevado a cabo en jóvenes y únicamente indicaremos cuando los estudios corresponden a población adulta. La revisión no es exhaustiva y se hace referencia tan solo a algunos de los trabajos representativos del campo.

Existen datos controvertidos respecto a la actividad basal del eje HPA, valorada habitualmente por los niveles plasmáticos o en saliva de cortisol. En tanto que es muy frecuente no encontrar diferencias entre jóvenes con TDAH y controles (v.g. Gispen de Wied et al, 1998; Snoek et al, 2004; Fairchild et al, 2008, Pesonen et al, 2011; Palma et al, 2012), existe casi igual número de publicaciones en las que se observan niveles más bajos de cortisol en el TDAH. En estos casos, estos niveles menores de cortisol afectan de forma más o menos similar a distintos subtipos de TDAH (Ma et al, 2011; Chen et al, 2012; Isaksson et al, 2012) o bien a algunos subtipos específicos (van West et al, 2009; Maldonado et al, 2009; Pesonen et al, 2011) o cuando el TDAH se combina con conducta desafiante (Kariyawasam et al, 2002; Freitag et al, 2009). Hasta dónde hemos podido averiguar, únicamente un estudio ha observado niveles más elevados de cortisol en sujetos con TDAH (White y Mulligan, 2005).

Cómo los jóvenes con TDAH responden a situaciones de estrés se ha estudiado mucho menos. También aquí los resultados son contradictorios, habiéndose observado una respuesta normal (Jansen et al, 1999; Snoek et al, 2004; Blomqvist et al, 2007), incrementada (Palma et al, 2012) o reducida (Fairchild et al, 2008). En otro estudio, la respuesta reducida se restringió al subtipo inatento que respondía menos que los controles o el subtipo combinado (van West et al, 2009). Es importante destacar que las diferencias en la respuesta al estrés no suelen ir asociadas a cambios similares en los niveles basales y también que una respuesta normal de cortisol puede ir

asociada a una mayor respuesta en términos de ansiedad (Blomqvist et al., 2007), lo que indica una disociación entre ambos tipos de respuesta al estrés.

Los estudios en adultos con TDAH son escasos y coinciden en niveles basales normales de cortisol respecto a una población control (Lackschewitz et al, 2008; Hirvikoski et al, 2009; Corominas et al, 2015). No obstante, es interesante destacar que un estudio ha demostrado cambio de fase (retraso) en el ritmo circadiano de cortisol y otros parámetros bioquímicos y conductuales en adultos con TDAH (Baird Al et al, 2012). La respuesta al estrés de estos pacientes sí ha dado lugar a resultados muy contradictorios, habiéndose descrito una respuesta normal (Hirvikoski et al, 2009), incrementada (Raz y Leykin, 2015) o reducida (Lackschewitz et al, 2008). En un estudio comparando los subtipos inatento y combinado en pacientes con TDAH no medicados, la reducción de la respuesta tiende a ser menor en los inatentos, pero es en los combinados dónde las diferencias son significativas respecto a los controles (Corominas et al, 2015). Es interesante destacar que en algunos estudios hay una respuesta normal de cortisol (Hirvikoski et al, 2009) o una menor respuesta fisiológica al estrés (Lackschewitz et al, 2008), en este último caso tanto de cortisol como de frecuencia cardíaca, se vio acompañada en ambos casos de una mayor respuesta subjetiva o de ansiedad, en consonancia con un estudio en jóvenes (Blomqvist et al, 2007).

En lo que respecta al eje HPA, hay pocos trabajos en humanos que exploren los efectos del MPH. La administración intravenosa aguda de 0.3 mg/kg de MPH a voluntarios sanos aumenta los niveles de cortisol, aumento que no está asociado a un incremento de ACTH (Joyce et al, 1986). La mayoría de los estudios se han llevado a cabo, como es lógico, en pacientes con TDAH. La mayoría de los estudios realizados en jóvenes con TDAH no observan efecto de la medicación con MPH (Maayan et al, 2003; Lee et al, 2008; Wang et al, 2011; 2012; Isaksson et al, 2013). No obstante, es posible que haya una elevación de los niveles en las primeras fases del tratamiento, para volver después a la normalidad (Weizman et al, 1987; Chen et al, 2012; Wang et al, 2012). Únicamente un trabajo ha investigado cómo el tratamiento puede afectar a la respuesta del cortisol a un estrés, habiéndose observado una reducción, pero solo en los que mostraban alta impulsividad (Hong et al, 2003).

7. Efectos fisiológicos del metilfenidato en animales de experimentación a nivel del SNC

Como ocurre con otros psicoestimulantes, el principal blanco de acción del MPH es el estriado y la inducción de *c-fos* ha sido una de las herramientas más utilizadas. El tratamiento agudo con 5 o 40 mg/kg de MPH aumenta significativamente la expresión de *c-fos* en el estriado de ratones machos adultos CD1 (Hawken et al, 2004). De forma similar, la administración aguda de 5 o 10 mg/kg de MPH en ratas SD adultas, produce un robusto incremento en la expresión de *c-fos* en estriado, en tanto que con 2 mg/kg el aumento es muy bajo y con 0.5 mg/kg no se produce aumento (Yano y Steiner, 2005).

Resultados similares se han observado en animales más jóvenes. En ratas SD juveniles (PND25) hay incremento en la expresión de *c-fos* en estriado en respuesta a la inyección aguda de 2 o 10 mg/kg de MPH de manera dosis dependiente (Chase et al, 2005). También Allen et al (2010) describen un aumento en la expresión de *c-fos* en estriado con la inyección de 7.5 mg/kg de MPH en ratas SD infantiles (PND10) o juveniles (PND24), aunque este aumento es mucho mayor con

1.6 mg/kg de AMPH. De forma similar, en el estudio de Penner et al (2002) la inducción de la expresión de *c-fos* en el estriado con MPH es también dependiente de la dosis (5 y 20 mg/kg) y de la edad de los ratones CD-1 estudiados (PND3, 7, 11, 24 y 45); con 20 mg/kg encuentran activación en todas las edades estudiadas, mientras que con 5 mg/kg solo en los PND24 y 45. También Brandon y Steiner (2003) hallaron en ratas SD juveniles, que el MPH produce un incremento de la expresión de *c-fos* dosis dependiente (2, 5 y 10 mg/kg) en el estriado, este efecto fue más pronunciado en el estriado dorsal a niveles mediales y caudales, donde la activación fue evidente ya con 2 mg/kg. No conocemos estudios donde se compare la expresión de *c-fos* entre ratas adultas y juveniles.

Por otro lado, también se han descrito activación de la expresión de *c-fos* en otras áreas. La inyección aguda de 10 mg/kg de MPH aumenta la expresión de *c-fos* en Acb de ratas juveniles Chase et al (2005). También se incrementa la expresión de *c-fos* en PFC tras la inyección de 3 mg/kg de MPH en ratones juveniles Koda et al (2010) y tras la inyección de 7.5 mg/kg en ratas juveniles Allen et al, (2010).

Los estudios de *c-fos* que indican que el MPH activa áreas de proyección dopaminérgica se ven corroborados por estudios electrofisiológicos. La inyección aguda de 0.6, 2.5 o 10 mg/kg de MPH a ratas SD adultas aumenta la actividad electrofisiológica del estriado (Claussen y Dafny, 2015). Estos mismos autores también han observado que el MPH aumenta la actividad neuronal y conductual de PFC de manera dosis dependiente en ratas SD adultas Claussen y Dafny (2014). Así, dosis bajas (0.6 mg/kg) producen una disminución en la actividad de la PFC, mientras que dosis más altas, (2.5 o 10 mg/kg) la incrementan. El efecto del tratamiento agudo con MPH sobre la activación de la PFC es dependiente de la dosis y de la edad, dado que Gronier et al (2010), demuestran que la dosis de 3 mg/kg aumenta la actividad electrofisiológica *in vivo* de la PFC en ratas juveniles, siendo el efecto mayor en ratas adultas. Con 1 mg/kg se produce un efecto depresor sobre las neuronas piramidales de ratas SD infantiles y un efecto excitatorio en ratas juveniles; con 0.03 o 0.3 mg/kg, que son dosis mínimas utilizadas en TDAH también se produce un efecto depresor en la PFC de ratas juveniles (Urban et al 2012). Estos trabajos sugieren que la reactividad de la PFC al MPH puede ser distinta en sujetos adultos, juveniles e infantiles.

El incremento de la actividad de las neuronas en PFC parece asociado a la liberación de DA Gronier (2011), ya que la activación provocada se por la administración de 1 o 3 mg/kg de MPH en ratas SD adultas se redujo parcialmente por la administración de 0.5 mg/kg, iv de un antagonista D1 dopaminérgico (SCH 23390). Estos mismos autores describen que la administración de 1 mg/kg de un antagonista α 2-adrenérgico (yohimbina) potenció el efecto excitatorio de 0.3 mg/kg de MPH, demostrando de esta manera la implicación de los receptores D1 y α 2 en los efectos electrofisiológicos del MPH sobre las neuronas de la PFC.

El núcleo Acb juega un papel crítico en los efectos reforzantes de los psicoestimulantes y también parece activarse con MPH. Chong et al, (2012) demuestran un aumento de la actividad electrofisiológica del Acb en ratas SD adultas tratadas con 2.5 mg/kg de MPH. En cambio, en ratas juveniles se observa un aumento dosis dependiente de la actividad locomotora (*home-cage*) tras la inyección aguda de MPH (0.6, 2.5, 5 y 10 mg/kg), en tanto que la activación electrofisiológica solo se observa con 5 o 10 mg/kg (Frolov et al, 2015)

Otra de las áreas blanco del MPH es el VTA. La respuesta conductual que más se ha estudiado en este sentido es de nuevo la activación motora inducida por el MPH. Jones y Dafny (2013) utilizan 0.6, 2.5 y 10 mg/kg de MPH en ratas SD juveniles y describen que el MPH causa un aumento de la actividad locomotora de manera dosis dependiente. En cambio, con 0.6 mg/kg hay una disminución de la actividad electrofisiológica del área y con 2.5 y 10 mg/kg hay un aumento, por lo que no hay una buena correlación entre actividad locomotora y la respuesta electrofisiológica del VTA. El significado funcional de estas diferencias individuales permanece sin conocerse.

8. Metilfenidato y conducta en animales de experimentación

Aunque existen distintos trabajos en la literatura acerca del efecto del MPH sobre la conducta/cognición en modelos animales, muchos de ellos analizan efectos demorados de la administración temprana o efectos de la administración crónica, por lo que no serán comentados en este apartado. Nos centraremos en los efectos psicoestimulantes y reforzantes agudos, en los efectos terapéuticos sobre funciones ejecutivas y en la existencia de datos que apoyen su posible interacción con estímulos estresantes. Mencionaremos si se trata de estudios en animales jóvenes o adultos, y si utilizan animales seleccionados genéticamente o bien poblaciones no seleccionadas.

8.1. Efectos psicoestimulantes y reforzantes

Los efectos estimulantes agudos del MPH en función de la dosis están muy bien caracterizados. En animales adultos no seleccionados (SD) no se observa efecto estimulante a 0.6 mg/kg, éste es bajo a 2.5 y potente a 10 mg/kg (Claussen et al, 2014). En otros trabajos también en animales no seleccionados (Long-Evans) se replica el efecto psicoestimulante dosis-dependiente a 2.5 y a 5 mg/kg, en tanto que en la etapa adulta dicho efecto no parece ser dosis dependiente (Levant et al, 2011). La capacidad psicoestimulante depende también de la cepa estudiada. Por ejemplo, Yetnikoff y Arvanitogiannis (2013) describen que las ratas SHR (espontáneamente hipertensas), que se utilizan como modelo de hiperactividad, son más sensibles a los efectos estimulantes motores del MPH que las Wistar Kyoto (WKY), tanto en animales adolescentes como adultos.

Los efectos reforzantes del MPH en animales adultos se han estudiado en distintos paradigmas, entre los que destaca la autoadministración operante intravenosa con distintas variantes (FR1 o razón progresiva). Aunque en humanos la opinión más generalizada es que el potencial adictivo del fármaco es bajo un su uso terapéutico por vía oral, en poblaciones sanas (sin TDAH) puede producirse un uso abusivo (ver Teuns et al. 2014 para una discusión). Este uso abusivo viene corroborado por los datos en animales, en consonancia con otros psicoestimulantes, como la AMPH o la cocaína.

En animales no seleccionados (SD) se produce autoadministración intravenosa en un paradigma de FR1 con dosis entre 0.1 – 1 mg/kg (Heal et al. 2013). De forma similar, con un protocolo de razón progresiva, Marusich et al (2010), observaron que las ratas SD adquirían la autoadministración de MPH sin un entrenamiento previo para la autoadministración de comida u otra droga, consiguiéndose un *breaking point* de hasta 300 para obtener una dosis de 0.56 mg/kg/infusión.

Además, las variables de personalidad actúan como factores de susceptibilidad en la autoadministración de MPH. Las ratas SD más impulsivas (evaluadas mediante pruebas de descuento por demora) se auto-administran más MPH que las menos impulsivas cuando se trata de bajas dosis de infusión (0.1 mg/kg/infusión iv), pero dicha diferencia no se observa a dosis más altas (1 mg/kg/infusión iv), indicando que las diferencias individuales en la impulsividad influyen de manera dosis dependiente en los efectos reforzantes del fármaco (Marusich y Bardo, 2009). Por otro lado, De la Peña et al. (2015) describen que las ratas SHR presentan una mayor preferencia por la novedad (son “buscadoras de sensaciones”) respecto a las controles WKY y son también más vulnerables a los efectos reforzantes del MPH (0.25 mg/animal/infusión, iv).

8.2. Efectos sobre las funciones ejecutivas.

Las funciones ejecutivas que dependen de la corteza prefrontal incluyen, por una parte, procesos atencionales superiores y memoria de trabajo, y por otra parte, capacidad de inhibición/control de la impulsividad. Estos procesos están evidentemente deteriorados en los pacientes con TDAH (en función del subtipo predominante) y son reducidos, en mayor o menor grado, por la administración de MPH. Los datos que a continuación se comentan, en animales adultos, corroboran estos efectos.

8.2.1. Efectos sobre la atención y la memoria de trabajo

La atención sostenida está típicamente disminuida al menos en algunas subpoblaciones de pacientes con TDAH, sean niños (Huang-Pollock et al, 2012) o adultos (Mostert et al, 2015). En modelos animales se utilizan distintas pruebas para medir la atención sostenida, siendo las dos principales la del *five choice serial reaction time task* (5CSRTT) que será comentada posteriormente (porque también evalúa impulsividad) y la prueba de detección de señales (Levin et al, 2011). En este último paradigma operante se entrena al animal a apretar una palanca para conseguir una recompensa en presencia de una determinada señal visual y a apretar otra palanca en presencia de una señal diferente o en ausencia de cualquier señal. El efecto esperado del MPH es una mejora en el proceso de detección de señales. Por ejemplo, ratas no seleccionadas (SD) mejoran la atención sostenida en una tarea de detección de señales con dosis de 0.5 y 1 mg/kg ip de MPH (Andrzejewski et al, 2014). De forma similar, la inyección de 0.5 mg/kg ip mejora la detección de señales en animales SD Berridge et al (2006). En otros experimentos el efecto del MPH (0.3 mg/kg sc) en ratas SD parece darse únicamente en aquellos sujetos con niveles basales de ejecución bajos (Rezvani et al, 2009).

Las alteraciones en la memoria de trabajo son también típicas de al menos algunas subpoblaciones de pacientes con TDAH, sean de nuevo niños (Fair et al, 2012) o adultos (Mostert et al, 2015). En animales no seleccionados (SD) Berridge et al. (2006), obtuvieron una mejora de la memoria de trabajo con 2 mg/kg po de MPH, utilizando una prueba de alternancia demorada, en la que se da refuerzo si el animal escoge el brazo de un laberinto que ha sido previamente no reforzado. El efecto es bifásico, puesto que las dosis más altas tienen efectos negativos (Arnsten y Dudley, 2005). Es muy interesante comentar que las dosis bajas de MPH que son capaces de mejorar la memoria de trabajo son las que aumentan la respuesta electrofisiológica de las neuronas de la corteza prefrontal, mientras que las dosis más altas producen una inhibición de la corteza (De-

vilbiss y Berridge, 2008). De hecho, la administración intracerebral de MPH en la parte dorso-medial de la corteza prefrontal (y no en la ventromedial) mejora también la memoria de trabajo siguiendo una curva en U invertida (Spencer et al. 2012).

8.2.2. Efectos sobre la inhibición conductual

La capacidad de inhibición conductual que induce el MPH se ha evaluado básicamente mediante tres procedimientos: el paradigma de *stop signal reaction time* (SSRT), el de descuento por demora (*delay-discounting*) y el del 5CSRTT. En los estudios con modelos animales se han utilizado principalmente animales adultos y a estos nos referiremos en este apartado.

La habilidad de detener una respuesta previamente iniciada es una importante componente de la inhibición conductual. El tiempo requerido para parar una respuesta en el paradigma de SSRT es utilizado como un índice clínico de control inhibitorio de la conducta impulsiva. Los pacientes con TDAH tienen un SSRT lento, tanto si se trata de niños-adolescentes (Crosbie et al, 2013) como adultos (Murphy, 2002; Bekker et al, 2005). Estos datos se corroboran con los estudios en animales. En resumen, el procedimiento consiste en entrenar a los sujetos a realizar una respuesta operante (apretar una palanca) y a continuación (ensayos “go”) a realizar otra segunda respuesta para conseguir comida como refuerzo. En una proporción baja de ensayos (“no go”) se administra un estímulo auditivo tras la realización de la primera respuesta, que actúa como señal inhibitoria para detener la segunda respuesta. Eagle et al (2007) clasificaron en primer lugar a las ratas (Lister-hooded) en dos grupos, las de respuesta lenta en el SSRT (que emularían a los pacientes con TDAH) y las de respuesta rápida. A dosis de 0.3 y 1 mg/kg (ip), el MPH disminuyó el SSRT de los animales de respuesta lenta, pero aumentó a esas mismas dosis el de los animales rápidos.

Una manifestación de impulsividad cognitiva o de elección en modelos animales es la preferencia por recompensas pequeñas inmediatas en lugar de recompensas mayores pero demoradas en el tiempo; es decir, la presencia de un elevado “**descuento por demora**” (Perry y Carroll, 2008). El procedimiento consiste en ofrecer al sujeto dos palancas en una jaula operante, de forma que el refuerzo asociado a la palanca “inmediata” es siempre pequeño, mientras que el asociado a la palanca “demorada” es mayor, variándose a lo largo del tiempo la demora entre la conducta de apretar dicha palanca y la consecución del refuerzo. Ciertas subpoblaciones de niños (Pauli-Pott y Becker, 2015) y adultos (Mostert et al, 2015) con TDAH presentan puntuaciones de impulsividad superiores a los controles en la tarea de descuento por demora. Los efectos esperados del MPH sobre esta medida se ven corroborados en modelos animales. En animales no seleccionados (Long-Evans), el MPH disminuye el descuento por demora (Paterson et al, 2012b), con una dosis de 4 mg/kg (pero no menor). Sin embargo, algunos de los efectos del MPH sobre la tolerancia a la demora podrían no ser específicos puesto que se ha descrito que el fármaco disminuye la impulsividad cuando las distintas demoras se presentan en orden ascendente, pero no en orden descendente (Tanno et al, 2014). Además, cabe mencionar que tanto la habitual mezcla racémica como el isómero dextro es efectivo en este paradigma, mientras que no lo es el levo (Slezak et al, 2014). Sin embargo, los resultados en modelos genéticos de impulsividad son controvertidos. Por un lado se ha descrito que la administración de 3 mg/kg de MPH disminuye en ratas SHR la impulsividad evaluada por esta prueba de tolerancia a la demora (Slezak y Anderson, 2011). Por el contrario, Wooters y Bardo (2011), utilizando este procedimiento, demuestran que la cepa

WKY es menos impulsiva que la SHR y que la administración aguda de 5.6 o 10 mg/kg de MPH disminuye la impulsividad en las WKY, pero no en las SHR ni en las SD.

El procedimiento denominado **5CSRTT** ha sido ampliamente utilizado en los últimos años para evaluar atención e impulsividad motora (Robbins, 2002). En esta tarea, se sitúa a las ratas en un paradigma operante en el que se presenta una luz en una de cinco posibles posiciones (agujeros). Cuando el animal introduce su hocico en el hueco iluminado (*nosepoke*) es recompensado con un pellet de comida, y se contabiliza una respuesta correcta. El sujeto puede realizar respuestas incorrectas o falta de respuestas (omisión). El porcentaje de respuestas correctas en función de las respuestas totales en esta tarea (*accuracy*) es una medida de atención. Se considera una buena medida de impulsividad motora el número de respuestas anticipadas durante el ITI (prematuras). Las respuestas perseverantes en un mismo agujero después de ser reforzado se consideran un índice de compulsividad. Esta prueba es un análogo traslacional de las pruebas neuropsicológicas que miden atención sostenida (*continuous performance test*). Los pacientes con TDAH, niños (Kim et al, 2015) y adultos (Cohen y Shapiro, 2007) presentan distintas alteraciones en estas pruebas, mostrando una disminución de las capacidades atencionales y/o aumentando la impulsividad motora. Por lo tanto, el efecto del MPH esperado en modelos animales sería un aumento de la *accuracy* y una disminución de las respuestas prematuras. Los efectos del MPH sobre la atención se pueden potenciar utilizando algunas variaciones de la tarea, como retrasar el tiempo entre la realización de la respuesta y el refuerzo (Slezak y Katz, 2013), o aumentar el número de respuestas necesarias para conseguir el refuerzo ((Koffarnus y Katz, 2011). Existen también importantes diferencias individuales en los efectos del MPH (10 mg/kg, po) sobre la atención, de manera que se potencia en los animales no seleccionados (Lister hooded) con capacidades atencionales basales reducidas y se empeora en los sujetos con mejores capacidades atencionales (Robinson, 2012). En los estudios previamente mencionados, el MPH parece tener un efecto puro sobre la atención y no sobre la impulsividad. Se ha descrito que el MPH a una dosis de 2 mg/kg reduce las respuestas prematuras en animales no seleccionados (Lister hooded), mientras que a dosis más altas disminuye la atención en vez de aumentarla (Milstein et al, 2010). Efectos similares han sido encontrados por Pattji et al, (2012) en ratas Wistar: una reducción de las respuestas prematuras tras la administración de dosis bajas de MPH (1 mg/kg po) y una disminución de la atención tras dosis altas (10 mg/kg po). En otros estudios con animales no seleccionados (Long Evans), no se afectan las respuestas prematuras ni a dosis bajas de 0.1-1 mg/kg, ip (Paterson et al, 2012a; 2012b), ni a dosis más altas de 2-4 mg/kg (Paterson et al, 2012b), no encontrándose tampoco efectos sobre la atención.

Las diferencias individuales basales en impulsividad podrían ser también un factor a considerar, puesto que el MPH (en este caso administrado de forma crónica) disminuye la impulsividad en animales no seleccionados (Long-Evans) que presentan mayores niveles basales de respuestas prematuras y la aumenta en los que son pocos impulsivos (Caprioli et al, 2015). Otros autores, en cambio, utilizando otras ratas no seleccionadas (Lister-hooded) subdivididas también en función de su impulsividad no encuentran efecto del MPH agudo (0.3, 1 o 3 mg/kg), debido a la existencia de una gran variabilidad individual en cada subgrupo (Fernando et al, 2012). Respecto a las ratas SHR (utilizadas como modelo de hiperactividad), tienen muchas dificultades para aprender la tarea y los efectos del MPH (1-3 mg/kg, po) no son los esperados, puesto que ni

disminuye las respuestas prematuras ni aumenta la *accuracy* (Dommett, 2014). En conclusión, no está claro en la literatura si existe un efecto preferencial del MPH sobre la atención o la impulsividad, y la dosis no parece ser el único factor, siendo probablemente un tema también relacionado con las características individuales de los sujetos y las de la prueba (la presencia de ITIs más largos favorece, por ejemplo, la presencia de respuestas prematuras, y la utilización de estímulos luminosos más cortos incrementa las demandas atencionales de la prueba).

8.3. Impacto del metilfenidato sobre los efectos del estrés

Apenas existen datos en la literatura sobre cómo la administración aguda de MPH modifica el impacto del estrés. Resulta especialmente interesante el estudio de Carmack et al (2014a) quienes demostraron en ratones C57BL que la inyección de MPH previa a la sesión de condicionamiento del miedo (se administra choque eléctrico como estímulo estresante) incrementa a largo plazo la memoria del miedo durante la re-exposición al contexto cuando se administró una dosis moderada (1 mg/kg ip), mientras que a una dosis altas (10 mg/kg ip) dicha memoria del miedo se reduce. Si interpretamos dicha reducción como un mayor *coping* parecería que la exposición simultánea a una dosis alta MPH y estrés puede conllevar una sinergia negativa.

Hipótesis

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la administración del psicoestimulante anfetamina simultáneamente a la exposición al estrés es capaz de reducir la respuesta fisiológica (activación del eje HPA e hiperglucemia) al mismo, estando el efecto localizado a nivel del SNC. Resultados de otros laboratorios sugieren que los estímulos emocionales podrían reducir los efectos de la anfetamina, de tal manera que la interacción entre la droga y el estrés fuera bidireccional. Nuestra hipótesis son las siguientes:

- (1)** La interacción negativa entre estrés y anfetamina se manifestaría a dosis similares a las de uso terapéutico en el tratamiento del TDAH y a las alcanzables con la auto-administración. Además, el estrés sería capaz de reducir la activación del eje HPA causada por la droga.
- (2)** El efecto inhibitor de la respuesta al estrés podría también observarse con otro psicoestimulante, el metilfenidato, de uso preferente en el tratamiento del TDAH, a dosis relevantes desde el punto de vista terapéutico.
- (3)** Los efectos protectores del metilfenidato podrían reflejarse no solo en la respuesta fisiológica al estrés sino también en la respuesta conductual al mismo, con una potenciación de las estrategias de afrontamiento activas y una reducción del impacto negativo del estrés a largo plazo.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

- (1)** Estudiar la influencia de varias dosis de anfetamina sobre la respuesta fisiológica al estrés (natación forzada), estudiando no solo la respuesta inmediata a la situación de estrés sino el período de vuelta a la normalidad (post-estrés).
- (2)** Demostrar que el metilfenidato, a dosis relevantes terapéuticamente, es capaz de reducir la respuesta fisiológica periférica y central a la natación forzada.
- (3)** Demostrar que la interacción tiene lugar a nivel de SNC y no periféricamente, estudiando la expresión del gen del CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo y la inducción de c-fos en zonas clave del SNC.
- (4)** Demostrar, utilizando una tarea de aprendizaje activo de evitación-escape, que dichos efectos protectores se extiende a otras situaciones de estrés y se reflejan también en estrategias más eficaces de afrontamiento.
- (5)** Demostrar que el efecto protector del metilfenidato no solo aparece tras la administración inmediata antes del estrés sino también cuando el fármaco se administra 30 min antes de dicha exposición.
- (6)** Estudiar si los efectos del metilfenidato sobre la respuesta al estrés son similares en animales jóvenes y adultos.

Materiales y métodos

1. Animales de experimentación y procedimientos generales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley procedentes del Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona, exceptuando en un experimento en el que utilizaron ratas juveniles de 25-30 días, la edad de los animales osciló entre los 60-70 días al inicio de los experimentos. Desde su llegada y hasta el final del procedimiento experimental, los animales se estabularon de a dos en cajas opacas de polipropileno de 1000 cm³ de capacidad (57 x 27 x 14.5 cm, Panlab SLU, España) con viruta absorbente (Ultrasorb, Panlab SLU, España). Se mantuvieron en condiciones estándares de luz (foto-período de 12 h), temperatura (21+/-1 °C) y humedad (40-60%). Durante todas las fases experimentales los animales dispusieron de comida (Dieta para roedores # 2014, Harland, Italy) y agua *ad libitum*. Desde su llegada, los animales fueron aclimatados a las instalaciones experimentales durante una semana, posteriormente se les realizó un procedimiento de habituación a la manipulación experimental como inyecciones sub-cutáneas (sc), toma de muestra de sangre por incisión en la cola y pesado con la finalidad de minimizar el posible impacto del estrés asociado a tales procedimientos. Los animales fueron pesados un día antes de cada experimento para determinar los volúmenes de inyección de las distintas dosis de fármacos utilizadas. Todos los procedimientos experimentales descritos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y de la Generalitat de Catalunya en acuerdo con las Directivas de la Comunidad Económica Europea (2010/63/EU) y de España (RD53/2013).

2. Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante el procedimiento de incisión en la cola, técnica ampliamente estandarizada en nuestro laboratorio (Belda et al, 2004). Consiste en una pequeña incisión de unos 2 mm de profundidad en la parte distal de una de las venas de la cola del animal. Tras un posterior masaje para conducir la sangre al corte, se recolectó por capilaridad un volumen máximo de 300 ul en un tiempo no superior de 2 min. Se utilizaron capilares con EDTA (Sarsdet Microvette CB300, Granollers). Se extrajo sangre a dos animales de cada caja al mismo tiempo con la ayuda de un tercer experimentador. Este método causa muy poco dolor en los animales, permite extraer varias muestras con un solo corte en un mismo experimento y no acusa valores de hormonas basales elevados. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta centrifugarse durante 25 min, 4°C a 7100 rpm/min (Heraeus-Biofuge Primo Centrifuge-Thermo Scientific). El plasma obtenido se dividió en dos alícuotas y se congeló a -20°C hasta el momento de los análisis pertinentes.

3. Administración de fármacos

Se utilizó la sal D-Anfetamina-Sulfato Salt, C₁₈H₂₆N₂.H₂SO₄ (SIGMA-ALDRICH a-5880). Las dosis utilizadas fueron de 1, 2 y 4 mg/kg respecto a la base. El volumen de inyección utilizado fue de 0.5 ml/kg y la vía de administración fue sc. Por otro lado se utilizó también Metilfenidato clorhidrato, C₁₄H₁₉NO₂HCl (SIGMA-ALDRICH M289). Las dosis utilizadas fueron 0.5, 1 y 2 mg/kg (base) dependiendo de cada experimento diluido en solución salina al 0.9%. Se utilizó un volumen de inyección de 0.5 ml/kg y la vía de administración fue sub-cutánea (sc). Como control a las inyecciones de amfetamina o MPH se utilizó solución salina al 0.9 %.

4. Perfusiones

Inmediatamente después de los procedimientos experimentales (o en condiciones basales en el caso de los controles), los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria en una cámara saturada con isofluorano (Laboratorios Esteve, España). Una vez alcanzado un estado profundo de anestesia se les mantuvo durante el inicio de la perfusión mediante un recipiente con un algodón impregnado en isofluorano donde se introdujo la cabeza del animal. La perfusión se realizó transcardíacamente, primero con una solución salina (0,9%) durante 2 min y posteriormente con una solución al 4% de paraformaldehído (PFA) y 3,8 % de tetraborato sódico (bórax) (PFA/bórax) durante 12 min. Una vez terminada la perfusión se extrajeron los cerebros 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 fosfato de potasio-cloruro de sodio (KPBS; 0,2M NaCl; 43mM 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 conservados a -80° C hasta ser cortados serialmente en secciones coronales de 14 μ m con un criostato CM3050-S (Leica Microsystems, Alemania). Las secciones se conservaron en una solución anticongelante (fosfato de sodio 0,05M, pH 7.3; 30% etilenglicol; 20% glicerol) a -20° C hasta su análisis histológico.

5. Técnicas y variables bioquímicas utilizadas

5.1. Radioinmunoanálisis

Los niveles de ACTH en plasma se analizaron mediante un RIA de doble anticuerpo en no-equilibrio siguiendo el protocolo descrito por el Dr. W.C. Engeland (Comunicación personal; Departamento de Surgery, University of Minesota, USA) modificado en nuestro laboratorio (García et al, 2000). Se utilizó un tampón de fosfato disódico 50 mM, pH 7.4, conteniendo EDTA disódico 25 mM, Tritón X-100 al 0.1% y Albúmina bovina al 0.25% disueltos en agua MilliQ. Todo el procedimiento de RIA se realizó a 4°C para evitar la degradación de la ACTH. Se utilizó ACTH₁₋₃₉ de rata (Sigma) como estándar (rango de calibración 2.5 - 640 pg/ml), 3-[¹²⁵I] iodotirosil²³-ACTH₁₋₃₉ (actividad específica de 2000 Ci/mmol, PerkinElmer, USA) como marcador y un anticuerpo contra ACTH de rata (rb7) donado por el Dr. W.C. Engeland. La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo (donkey anti-rabbit IgG, Serotec) diluido 1:32 conteniendo suero normal de conejo al 0.15%, Polietilenglicol al 9% y 30 min a 4700 rpm, a 4°C (Sigma-Laboratory Centrifuges 6K15). El coeficiente de variación intra-ensayo fue de un 4% e inter-ensayo de un 7%. La sensibilidad del método fue de 12.5 pg/ml.

Los niveles de corticosterona en plasma se determinaron por un RIA de doble anticuerpo en equilibrio según el protocolo del Dr. G.B. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungría). Se utilizó un tampón fosfato sódico 0.2M disuelto en agua MilliQ. Las muestras fueron incubadas previamente durante 2 h en ácido cítrico 0.1 M para liberar a la corticosterona de su proteína transportadora (CBG). Se utilizó corticosterona sintética (Sigma, Barcelona) 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, Barcelona) como marcador y un anticuerpo contra corticosterona donado amablemente por el Dr. G. B. Makara en tampón de ensayo con 0.15% de NSR. La fracción libre se separó con un segundo

anticuerpo (donkey anti-rabbit IgG, Serotec) diluido 1:48 en tampón de ensayo, polietilenglicol al 7.5% en agua MilliQ con 10 ul/tubo de suero de vaca y 30 min a 4700 rpm, a 4°C (SIGMA-Laboratory Centrifuges 6K15). El coeficiente de variación intra-ensayo fue de un 7% e inter-ensayo de un 9%. La sensibilidad del método fue de 2 ng/ml.

Los niveles de PRL fueron determinados por un RIA de doble anticuerpo en equilibrio según un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio. Se utiliza como tampón de RIA un tampón fosfato sódico 0.04 M, NaCl 0.9%, pH 7.4 suplementado con BSA al 1%. Se utilizó ¹²⁵I-prolactin de actividad específica 25-40 uCi/ug (NEN, Boston, MA, USA) como marcador y PRL de rata (rat PRL-RP-3, NIDDK) como estándar (rango de calibración 6-800 ng/ml) y un antisuero anti-prolactina de rata (anti-rPRL-S-9, NIDDK). La fracción libre se separó con un segundo anticuerpo donkey anti rabbit IgG (SEROTEC) diluido 1:24 en tampón y centrifugando 30 min a 4700 rpm, a 4°C (SIGMA-Laboratory Centrifuges 6K15). El coeficiente de variación intra-ensayo fue de un 4% e inter-ensayo de un 5%. La sensibilidad del método fue de 6 ng/ml.

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 corticosterona y PRL se llevaron a cabo mediante la transformación log-B/B0.

5.2. ISH (hibridación *in situ*) para mRNA DE *c-fos* y hnRNA de CRF

5.2.1. Obtención de la ribosonda radiactiva

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

5.2.2. Protocolo de hibridación *in situ* radioactiva.

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

El protocolo utilizado fue adaptado de Swanson *et al.* (1989). Todas las soluciones fueron pre-tratadas con dietilpircarbonato (DEPC) y esterilizadas mediante autoclavado antes de su utilización. Las secciones se post-fijaron en un baño de PFA/bórax durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos 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 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 añadieron sobre cada portaobjetos 100 µl de solución de hibridación (formamida 50%; 0,3 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 1X solución Denhardt; sulfato de dextrano 10%; tRNA de levadura 500 g/l; DTT 10 mM) conteniendo la sonda radioactiva (10⁶ dpm/100ul) y se cubrieron con cubreobjetos. Las secciones fueron incubadas durante 16-18 h a 60° C para permitir la hibridación. Tras este tiempo, las secciones se lavaron en 4 baños sucesivos de SSC 4X y se sometieron a una digestión con RNasa A (Roche) a 0,02 mg/ml en una solución adecuada (NaCl 0,5 M; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). Tras la digestión se realizaron lavados sucesivos en concentraciones decrecientes de SSC (2X→0,5X); DTT 1mM, 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.

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

5.2. Captura y análisis de imágenes

Para delimitar las coordenadas de análisis en cada ensayo se utilizaron los atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998 y 2007). Las imágenes se capturaron mediante un microscopio NIKON Eclipse E400 equipado con una cámara DMX 1200. Para comprobar que el tiempo de exposición a las películas había sido el necesario para su correcto análisis densitométrico, se realizaron y cuantificaron en cada caso fotografías de exposiciones de secciones que mostraban una intensidad alta, media y baja. Las unidades arbitrarias obtenidas se interpolaron en gráficas de saturación realizadas mediante una microescala autoradiográfica de ¹⁴C que se fotografió y cuantificó en las mismas condiciones, comprobando que los distintos valores se situaran en la parte lineal de la gráfica, ideal para su cuantificación. Los niveles de mRNA de *c-fos* y hnRNA CRF fueron determinados semicuantitativamente en al menos 6 secciones por área y animal sin diferenciar entre hemisferios, utilizando el programa informático Scion Image (Scion Corporation). Los valores de densidad óptica integrada (DOI) resultantes fueron expresados en unidades arbitrarias.

Todas las muestras que se compararon estadísticamente fueron procesadas en el mismo análisis para evitar la variabilidad inter-ensayo.

5.3. 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 intra-ensayo fue del 2.5%.

6. Pruebas y variables de conducta utilizadas

6.1. Prueba de natación forzada (FST: *Forced swim test*)

Se utilizó un cilindro de plástico (plexiglás) transparente de 40 cm de altura y 20 cm de diámetro apoyado sobre una base de 25 x 25 cm, con agua a 36°C hasta los 24 cm de altura. Cada cilindro queda individualizado entre paredes negras para evitar que los animales se vieran entre sí. En el caso del experimento con ratas juveniles las dimensiones de los cilindros fué de 12 cm de diámetro, 24 cm de altura y 14 cm del agua siguiendo la proporción con los adultos. La conducta fue grabada utilizando cámaras de video en posición frontal y un video-grabador digital (VR-716, JVC, España). El tiempo de duración de la prueba fue de 30 min, al finalizar la prueba previo secar a los animales con toallas de algodón se realizó una extracción de sangre por incisión en la cola. Se utilizó iluminación natural para esta prueba y entre animales se cambió el agua. Es una prueba ampliamente utilizada para la validación de fármacos antidepresivos (Porsolt, 1979; Armario et al, 1988) y también para evaluar estrategias de afrontamiento activas/pasivas ante situaciones estresantes (Armario et al, 1988; Martí y Armario, 1993). Es considerado un estímulo estresante mixto, predominantemente emocional de mediana intensidad (Dal Zotto et al, 2000; Armario et al, 2012).

Las variables analizadas a ciegas fueron:

Tiempo de escape (*struggling*) en el que el animal adopta una conducta activa intentando escapar de la situación moviendo enérgicamente las cuatro patas incluyendo inmersiones (*diving*) y saltos (*climbing*).

Tiempo de inmovilidad (*immobility*), conducta del animal en la que simplemente se mantiene flotando en el agua bien totalmente inmóvil o realizando leves movimientos con el fin de mantener la cabeza fuera del agua.

Tiempo de natación suave: la diferencia entre el tiempo total de la prueba menos las dos variables anteriores.

Niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa al terminar la prueba.

Se informan los resultados en tres bloques: los primeros 5 min, los 5 min entre los 13-18 de la prueba y los 5 finales entre los min 25-30.

6.2. Prueba de campo abierto rectangular (OF: *open field*)

Es una prueba que nos permite valorar la actividad locomotora y exploratoria de los roedores. Ante ciertos estímulos estresantes los animales pueden disminuir su actividad locomotora (Pol

et al, 1992) y ante la inyección de estimulantes del SNC, como AMPH pueden aumentarla (Gagliano et al, 2009). Consiste en una caja de plástico duro de color gris con unas dimensiones de 56 x 36,5 x 31 cm. Cada caja está dividida en 12 áreas iguales de 14 x 9 cm, 10 periféricas en contacto con las paredes y 2 centrales. Se utilizaron dos cajas a la vez para dos animales de cada caja de estabulación situadas en una habitación de conducta con las paredes negras, iluminadas con luz artificial mediante una bombilla de color blanco de 25 W de potencia colocada a 1.5 m de distancia. El procedimiento fue gravado con cámaras digitales en posición zenital y duró 15 min, entre cada ensayo las cajas fueron limpiadas con etanol al 5% y secadas con papel absorbente. Se evaluaron a ciegas las siguientes variables en tres bloques de 5 minutos: distancia recorrida en la periferia (cm), distancia recorrida en el centro (cm) y tiempo de permanencia en el centro (seg) del OF mediante el programa de *videotracking* SMART (versión 2.5.19, Panlab SLU, España), el cual detecta los píxeles que ocupa un animal mediante su centro de gravedad.

6.3. Prueba del laberinto elevado en cruz (EPM: *Elevated Plus Maze*)

Es una de la pruebas conductuales más utilizadas para el estudio de la ansiedad incondicionada en roedores y una de las mejor caracterizadas. El EPM está compuesto por cuatro brazos de madera (46,5 cm de largo x 12 de ancho) conectados en ángulo recto en un cuadrante central, de forma que dos de los brazos opuestos tienen paredes de 42 cm de altura (brazos cerrados), mientras que los otros dos tienen un pequeño reborde de 0.5 cm de ancho x 0.3 cm de alto (brazos abiertos). Los ansiolíticos elevan significativamente el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Pellow y File, 1986). El EPM se colocó a 50 cm del suelo rodeado de cortinas negras para aislar el aparato en la sala de conducta, con luz blanca artificial de 25W de potencia colocada a 1.5 m de altura y se limpió entre ensayo con Etanol al 5%. Se coloca el animal en el centro del EPM mirando hacia el mismo brazo cerrado. La conducta se grava con cámaras digitales (SCC-M383C3XX, Sony, España) en posición zenital conectadas a un video-gravador digital (VR-716, JVC, España). Las variables analizadas a ciegas fueron las siguientes:

Número de entradas en brazos abiertos. Se considera una entrada cuando el animal cruza con las cuatro patas al brazo abierto.

Tiempo de permanencia en brazos abiertos (como índice del nivel de ansiedad del animal debido a la preferencia natural de los roedores hacia los espacios cerrados y protegidos). Para calcular este tiempo se excluye el tiempo de permanencia en el centro del aparato y se van sumando los tiempos de permanencia en los brazos abiertos cuando el animal cruza con las cuatro patas a ese brazo.

Número de entradas en brazos cerrados. Se considera una entrada cuando el animal cruza con las cuatro patas al brazo cerrado.

Tiempo de permanencia en los brazos cerrados (como índice de actividad locomotora y/o exploratoria). Para calcular este tiempo se excluye el tiempo de permanencia en el centro del aparato y se van sumando los tiempos de permanencia en los brazos cerrados cuando el animal cruza con las cuatro patas a ese brazo.

Tiempo de permanencia en brazos abierto + cerrados: es la sumatoria de los dos tiempos anteriores, esto es, queda excluido el tiempo de permanencia en el centro del aparato.

Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos: considerando el tiempo de permanencia en brazos abiertos + cerrados como un 100%, se calcula el % de tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

6.4. Prueba de evitación activa en dos sentidos y condicionamiento del miedo al contexto.

Esta prueba se realiza en una caja en lanzadera o *Shuttle-box*, y ha sido utilizada para el estudio de aprendizaje y memoria del tipo no declarativo (LeDoux, 2000). El paradigma se basa en el condicionamiento clásico donde el animal se expone a un estímulo incondicionado (US) aversivo, que es un choque eléctrico asociado a un estímulo condicionado explícito (CS) que es un tono y una luz. Además, el propio contexto (la jaula con su olor, textura y forma) actúa también como CS. Por otra parte, se sobrepone un condicionamiento instrumental (refuerzo negativo) donde el animal debe aprender que al CS le sigue un US y puede evitarlo cruzando al otro compartimento de la jaula, realizando por lo tanto una respuesta condicionada o evitación, si no lo hace, recibirá el US aunque puede huir del estímulo (respuesta incondicionada). Si el animal aguanta el choque se contabiliza como respuesta nula.

Se utilizaron dos cajas de condicionamiento operante individuales con aislamiento acústico. Cada caja (LE 1005, Panlab S.L.U., Barcelona) está construida de Plexiglas transparente (67 x 53 x 55 cm) dividida en dos compartimentos (25 x 25 x 25 cm), con suelo de rejilla de metal removible de 20 barras (0.4 cm de diámetro y espaciadas 1.5 cm) conectadas entre ellas por una abertura (8 x 10 cm) y vinculadas a un chocador (LE100-26, Panlab S.L.U., Barcelona). Cada compartimento de la caja tiene una luz en la pared posterior, un altavoz y una puerta por donde se colocarán los animales. Cada caja está cubierta por fuera por otra caja de metal insonorizada.

En una primera sesión, los animales fueron expuestos a un procedimiento de evitación activa en dos sentidos con el software de control Shutavoid 0.1.2.7 con las siguientes características:

Tiempo de habituación: 5', durante el cual no se administra ningún estímulo.

Intensidad del choque: 0.7 mA

Duración del choque: 15''

Duración de los estímulos condicionados juntos (luz-7W y sonido-2400 Hz-80 dB): 15''.

Entre el final del CS y el inicio del US no hay ningún período libre de estímulos, es decir fue un condicionamiento de demora y no de traza.

Número de ensayos: 50. Se añadió un más si la primera respuesta fue evitación.

ITI (inter-ensayos): 30''-40'' Aleatorio, desviación 14%

Ratio de respuesta: 1 evitación.

Dos animales fueron expuestos simultáneamente en dos aparatos diferentes, previamente transportados en cajas de plástico blancas cubiertas con un trapo. Entre cada ensayo se limpiaron las cajas con Etanol al 5%. Cada compartimento de las jaulas está provisto de una cámara con la que se graba la conducta de los animales durante la prueba. Estas cámaras están conectadas a un video-grabador digital (CCTV). Los grupos controles fueron expuestos a 50 min aproximadamente a las jaulas shuttle sin los estímulos condicionados o incondicionados en iguales condiciones de luz y temperatura, de manera que el animal podía deambular libremente. Con posterioridad se consideraron las siguientes variables:

Respuestas condicionadas o evitaciones (nº), es el número de veces que el animal cambia de compartimento tras recibir el CS y antes de recibir el US.

Latencia de respuestas condicionadas (segundos), es el tiempo que tarda el animal en cruzar al otro compartimento durante la exposición al CS.

Respuestas incondicionadas o huidas (nº), es el número de veces que el animal cambia de compartimento después de iniciarse el US, es decir, mientras está recibiendo el US.

Latencia de respuestas incondicionadas (segundos), es el tiempo que tarda el animal en cambiar de compartimento durante la exposición al US más los 15" de duración de CS.

Latencia total de respuestas condicionadas e incondicionadas (segundos), es la sumatoria de las dos latencias anteriores.

Cruzamientos inter-ensayos (nº), es el número de veces que el animal cambia de compartimento entre un ensayo y otro, durante los periodos en los que no se administra ningún estímulo (ni CS, ni US)

Cruzamientos en los 5 min de exploración (nº), es el número de veces que el animal cambia de compartimento en los 5 min previos al comienzo de la prueba, es decir durante el período de habituación.

Todas estas variables se representan en el total de los 50 ensayos y divididos en 5 bloques de 10 ensayos consecutivos.

La prueba de evitación activa en dos sentidos presenta a los animales dos posibilidades de afrontamiento al miedo condicionado, un afrontamiento pasivo o freezing (permanecer en el compartimento donde recibe el choque eléctrico) y un afrontamiento activo (esto es, escapes o huidas hacia el otro compartimento) representado por las respuestas condicionadas o incondicionadas que el animal realice (Vicens-Costa et al, 2011). Cuanto mayor número de respuestas condicionadas e incondicionadas haga el animal, realizará un afrontamiento más activo de la situación estresante a la que está sometido (evitación activa o escape). Cuanto mayor sea el tiempo de freezing soportando el choque eléctrico, mayor afrontamiento pasivo (evitación pasiva debido al miedo condicionado clásico). El aprendizaje que los animales deben concretar es muy complejo, puesto que debe aprender que un compartimento de la jaula previamente interpretado como "seguro" puede ser "peligroso" posteriormente, ya que el choque eléctrico se suministra en ambos compartimentos, donde el animal este posicionado, esto provoca un conflicto durante los primeros ensayos que involucra altos niveles de ansiedad y por lo tanto predomina al principio de la prueba una tendencia al freezing para a medida que transcurre la prueba ir disminuyendo ese freezing y comenzar a hacer evitaciones

o huidas. Por lo que existe una relación negativa entre el miedo condicionado (*freezing*) y las respuestas condicionadas o incondicionadas de la prueba.

En una segunda sesión (DIA 9), los animales fueron colocados dentro de las mismas cajas de evitación durante 15 min sin ningún estímulo explícito con el objetivo de medir el condicionamiento de miedo al contexto. Entre cada sujeto se limpiaron las cajas con ácido acético al 1%. Toda la prueba fue grabada utilizando un video digital CCTV en un plano frontal. Las medidas de miedo condicionado al contexto utilizadas durante los primeros 5 min fueron: el tiempo de *freezing* o petrificación (Phillips y LeDoux, 1992) y la hipoactividad, mediante el número de *crossings* y *rearings* (Laxmi et al. 2003). Al finalizar la prueba se extrajo sangre por incisión en la cola para determinaciones hormonales y glucemia.

7. Análisis estadístico de datos

Se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Science) versión 15 y 18 para Windows. Para analizar una única variable dependiente, se utilizó el modelo lineal generalizado (GzLM), McCulloch y Searle, 2001. En caso de medidas repetidas se utilizó el modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE) (Hardin y Hilbe, 2003). La significación de los efectos estadísticos encontrados mediante estos procedimientos se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado de Wald usando el método de estimación de la casi-verosimilitud restringida. En el caso de encontrar interacciones significativas se realizó la descomposición pertinente y de ser significativo un factor con más de dos niveles se realizaron los correspondientes contrastes *a priori* contra el grupo control. El criterio de significación en todos los casos se estableció en $p < 0.05$. Estas pruebas pueden realizarse aún si no hay homogeneidad de varianza en las variables analizadas y también son válidas cuando hay resultados *missing*.

Para las determinaciones de ACTH en respuesta a la exposición al choque eléctrico y Tiempo de Freezing de los 5 primeros minutos de re-exposición al contexto de los experimentos 3 y 4 se realizaron GzLM incluyendo como covarianza el Tiempo total de choque eléctrico aplicado. También se realizaron T-Student, correlaciones de Pearson, y en algunos casos debidamente especificados se utilizó U de Mann-Whitney.

En el Experimento 3 y 4 se eliminaron 2 y 4 sujetos respectivamente por comportamiento outlier (permanecer inmóviles durante toda la exposición al choque eléctrico o realizar movimientos bruscos en uno de los compartimentos sin realizar ninguna evitación o huida).

Resultados

Experimento "0": Respuesta periférica del eje HPA a un estímulo estresante emocional moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con de anfetamina (Estudio dosis/respuesta)

Este experimento complementario de los trabajos previos de nuestro grupo (Gómez-Román et al, 2016), marca el origen y las pautas seguidas en esta tesis doctoral. El mencionado trabajo demostró que la administración de AMPH, por sí misma, incrementaba los niveles de las hormonas del eje HPA, sin afectar los niveles plasmáticos de glucosa, pero reducía la respuesta de ACTH, corticosterona y glucosa a estímulos estresantes, ya fueran sistémicos, como la administración de IL1 β , ya fueran emocionales, como la natación forzada y la inmovilización. También a nivel central se puso en evidencia una interacción negativa respecto a la expresión del gen del CRH en el PVN. Esta interacción también se manifestaba en la expresión de *c-fos* en áreas relacionadas con el procesamiento de los estímulos estresantes como PVN y LSV.

El objetivo del experimento fue doble: **(i)** hacer un estudio dosis-respuesta respecto a la interacción AMPH-estrés; y **(ii)** estudiar el período posterior a la finalización del estrés para profundizar en la interacción entre ambos estímulos. Se administraron dosis de 1, 2 o 4 mg/kg de AMPH vía sc. Utilizamos la natación forzada como estímulo estresante (Dal-Zotto et al, 2000). Este modelo de estrés es de gran interés ya que permite no solo valorar la activación del eje HPA, sino también, las estrategias de afrontamiento activas y pasivas de los animales bajo el efecto de la droga. El test clásico de natación forzada se lleva a cabo a 25°C de temperatura (Porsolt, 1977), provocando hipotermia en los animales expuestos (Porsolt, 1979), lo que podría añadir un factor estresante más a la situación, por lo que decidimos realizarlo a 36°C. Se utilizaron 78 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH-HOME, n=8; VEH-SWIM, n=10; AMPH1-HOME, n=10; AMPH1-SWIM, n=10; AMPH2-HOME, n=10; AMPH2-SWIM, n=10; AMPH4-HOME, n=10 y AMPH-SWIM, n=10. AMPH1, AMPH2 y AMPH4 indican la dosis de AMPH (1, 2 o 4 mg/kg).

Inmediatamente después de las inyecciones, las ratas SWIM fueron expuestas a 30 min de natación forzada y las ratas HOME permanecieron en sus cajas de estabulación. Se estudió la dinámica temporal de la respuesta con extracciones de sangre al final del estrés (SWIM) y a los 30 y 60 min posteriores (R30 y R60). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa. El protocolo experimental se resume en la **Tabla 1**.

Los resultados obtenidos con la ACTH se muestran en la **Figura 1** y fueron analizados con un GEE con dos factores inter-sujetos: AMPH (4 niveles: VEH, AMPH1, AMPH2 y AMPH4) y SWIM (2 niveles: con y sin natación forzada) y un factor intra-sujetos: DINÁMICA (3 niveles: SWIM, R30 y R60). Este análisis nos indica resultados estadísticamente significativos de AMPH (Wald $X^2(3)=70.3$ $p<0.001$), DINÁMICA (Wald $X^2(2)=160.7$ $p<0.001$) y las interacciones AMPH x SWIM (Wald $X^2(3)=87.4$ $p<0.001$), AMPH x DINÁMICA (Wald $X^2(6)=48.9$ $p<0.001$), SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=106.1$ $p<0.001$) y AMPH x SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(6)=55.7$ $p<0.001$). La descomposición de las interacciones nos muestra (**Figura 1**) que la AMPH sin estrés estimula el eje HPA de manera dosis dependiente, tanto a 30 min de la inyección, como a los 60 y a los 90 (tiempos equivalentes a SWIM, R30 Y R60 de los grupos expuestos a la natación forzada). El efecto de la dosis se expresa para cada tiempo con letras diferentes en la **Figura 1** dentro

de los grupos HOME. Además, el grupo expuesto a la natación forzada muestran valores de ACTH mayores que su respectivo control HOME sin estrés en los tres tiempos ($p < 0.001$).

Lo más interesante del análisis es la existencia de una interacción negativa entre SWIM y AMPH. Al final de la exposición de 30 min a la natación forzada, los grupos que fueron administrados con cualquiera de las tres dosis de AMPH y luego expuestos a la natación forzada exhiben valores menores de ACTH que el grupo sometido a estrés tras la administración del vehículo (VEH-SWIM vs AMPH1-SWIM, $p < 0.001$; VEH-SWIM vs AMPH2-SWIM, $p < 0.001$ y VEH-SWIM vs AMPH4-SWIM, $p < 0.01$). Este efecto deja de ser evidente en la fase de recuperación (**Figura 1**). Por el contrario, en esta fase se observa que la exposición simultánea a estrés y AMPH reduce la respuesta a la droga, hecho especialmente evidente con la dosis más alta (en R30 y R60, AMPH4-SWIM vs AMPH4-HOME $p < 0.001$).

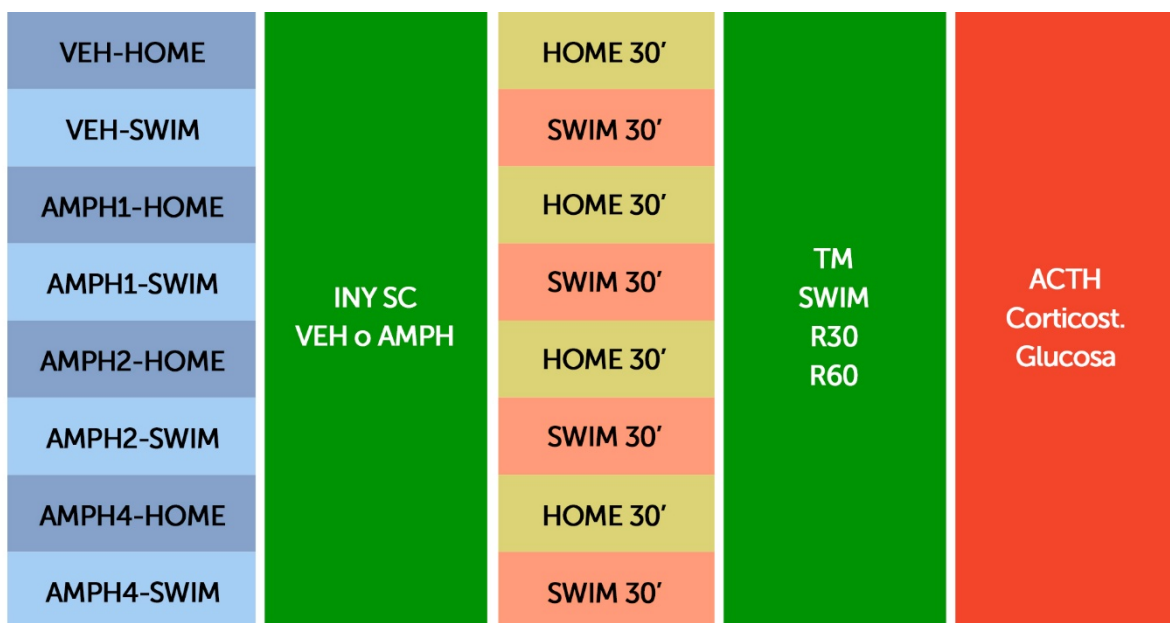


Tabla 1. Protocolo experimento "0"

El GEE de la corticosterona (**Figura 1**) nos muestra efecto de AMPH (Wald $X^2(3)=193.8$ $p < 0.001$), SWIM (Wald $X^2(1)=151.2$ $p < 0.001$), DINÁMICA (Wald $X^2(2)=220.3$ $p < 0.001$), AMPH x SWIM (Wald $X^2(3)=35.2$ $p < 0.001$), AMPH x DINÁMICA (Wald $X^2(6)=26.6$ $p < 0.001$), SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=168.2$ $p < 0.001$) y AMPH x SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(6)=44.7$ $p < 0.001$). La descomposición de las interacciones nos indica que, al igual que con la ACTH, la AMPH *per se* estimula la liberación de corticosterona de manera dosis dependiente, tanto a 30 min de la inyección, como a los 60 y a los 90 min, con la excepción de la dosis menor a los 90 min.

El efecto de la dosis se expresa para cada tiempo con letras diferentes en la **Figura 1** dentro de los grupos HOME. Además, todos los grupos expuestos a la natación forzada muestran valores de corticosterona mayores que sus respectivos controles HOME sin estrés tanto al finalizar el estrés (SWIM), como en R30, en tanto que en R60 estos niveles más altos sólo se observan con la dosis menor de AMPH (ver significación concreta en la **Figura 1**). Por otra parte, los valores de corticosterona de los grupos con AMPH muestran a partir de los 30 min de recuperación de la

exposición a la natación forzada valores mayores que con el estímulo estresante solo: se evidencia a R30 con la dosis de 2 mg/kg ($p < 0.05$) y 4 mg/kg ($p < 0.01$) y a R60 con todas las dosis, con la dosis menor ($p < 0.01$) y con las otras dos ($p < 0.001$).

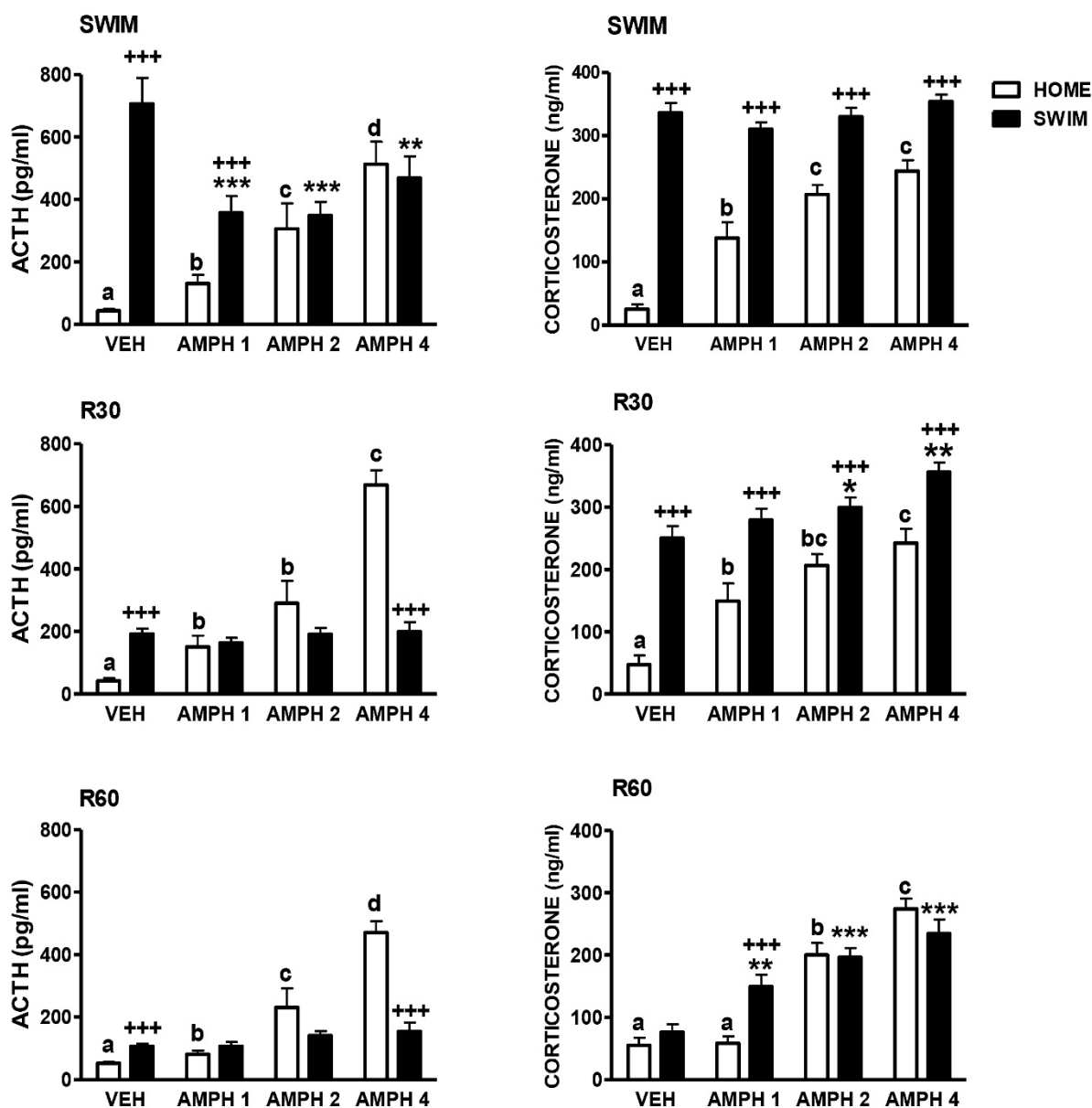


Figura 1. Respuesta de ACTH y corticosterona a 30 min de natación forzada combinada o no con AMPH (AMPH1, AMPH2 Y AMPH4: respectivamente 1, 2 y 4 mg/kg). VEH-HOME $n=8$; VEH-SWIM $n=10$; AMPH1-HOME $n=10$; AMPH1-SWIM $n=10$; AMPH2-HOME $n=10$; AMPH2-SWIM $n=10$; AMPH4-HOME $n=10$; AMPH4-SWIM $n=10$. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 las tomadas a los 30 y 60 min de finalizado el nado (o los tiempos correspondientes en los animales no estresados). Se representa la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs respectivo control sin estrés (HOME); *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs VEH-SWIM para cada tiempo. Las letras diferentes significan diferencia entre las distintas dosis de AMPH dentro de los grupos HOME. No se muestra el efecto DINÁMICA.

Se calcularon las áreas debajo de la curva (AUCs) para ACTH y corticosterona a modo de integración de la respuesta de estas hormonas durante todo el período experimental (Figura 2). Estos

valores fueron analizados con un GzLM con 2 factores inter-sujetos: AMPH (4 niveles: la inyección del vehículo y la de las 3 dosis de AMPH) y SWIM (2 niveles: con y sin exposición a la natación forzada).

Para ACTH se observó efecto de AMPH (Wald $X^2(3)=70.2$ $p<0.001$) y AMPH x SWIM (Wald $X^2(3)=71.7$ $p<0.001$). La descomposición de la interacción muestra que los valores del grupo VEH-SWIM son mayores que los del VEH-HOME ($p<0.001$) y que los del grupo AMPH4-SWIM son menores que los de AMPH4-HOME ($p<0.001$). Además, el grupo AMPH1-SWIM es menor que el VEH-SWIM ($p<0.05$), no llegando a ser significativas las diferencias con las otras dosis de AMPH. Sin lugar a dudas, para poner de manifiesto la interacción entre AMPH y estrés es mejor utilizar la medida de ACTH al final del estímulo estresante y no la integración de la respuesta de ACTH durante todo el experimento. El efecto estadísticamente significativo de la dosis se muestra con letras diferentes en la **Figura 2** dentro de los grupos HOME, donde se han comparado todos los grupos sin estrés inyectados con AMPH.

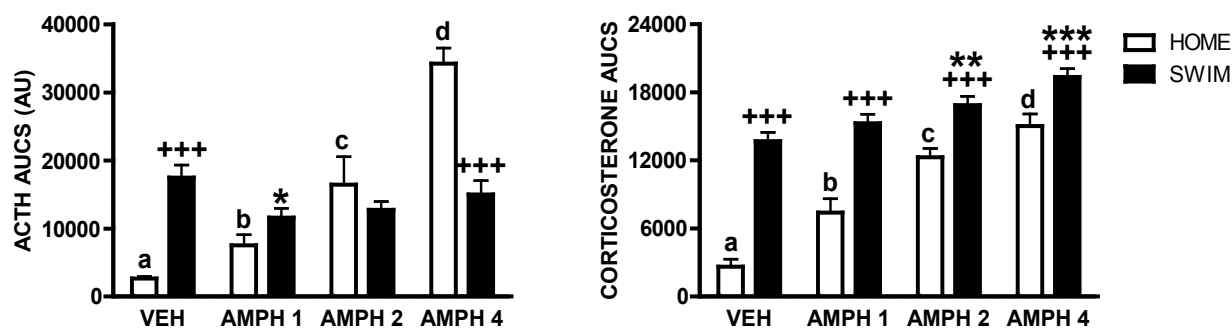


Figura 2. Área bajo la curva (AUCs) de ACTH y corticosterona en respuesta a la natación forzada (30 min) combinada o no con la administración de AMPH a 3 dosis (AMPH1, AMPH2 Y AMPH4: respectivamente 1, 2 y 4 mg/kg). Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 1. Se representa la media \pm SEM. +++ $p<0.001$ vs su respectivo grupo sin estrés; *** $p<0.001$; ** $p<0.01$ y * $p<0.05$ vs VEH-SWIM. Letras diferentes significan diferencia entre las distintas dosis de AMPH dentro de los grupos HOME.

Para las AUCs de corticosterona, el análisis indica efectos de AMPH (Wald $X^2(3)=129.1$ $p<0.001$); SWIM (Wald $X^2(1)=139.2$ $p<0.001$) y AMPH x SWIM (Wald $X^2(3)=20.9$ $p<0.001$). La descomposición de la interacción nos muestra que todos los grupos expuestos a la natación forzada (administrados con vehículo o AMPH) tienen valores mayores de AUCs de corticosterona que sus respectivos grupos sin estrés. También nos señalan que los grupos AMPH2-SWIM y AMPH4-SWIM tienen AUCs estadísticamente superiores a la del grupo VEH-SWIM ($p<0.01$ y $p<0.001$ respectivamente). El efecto estadísticamente significativo de la dosis se muestra con letras diferentes dentro de los grupos HOME, donde se han comparado todos los grupos sin estrés inyectados con AMPH.

Estos datos indican que la integración de la respuesta de corticosterona durante todo el experimento pone en evidencia un aumento adicional de la secreción de corticosterona por el estrés en los animales administrados conjuntamente con AMPH.

El GEE para la glucosa (**Figura 3**), nos señala efectos significativos de AMPH (Wald $X^2(3)=22.8$ $p<0.001$), SWIM (Wald $X^2(1)=32.82$ $p<0.001$), DINÁMICA (Wald $X^2(2)=16.2$ $p<0.001$) y las interacciones AMPH x SWIM, AMPH x DINÁMICA y SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(3)=46.3$

$p < 0.001$; Wald $X^2(6) = 16.5$ $p < 0.001$ y Wald $X^2(2) = 38.2$ $p < 0.001$, respectivamente). La triple interacción AMPH x SWIM x DINÁMICA es marginalmente significativa (Wald $X^2(6) = 11.5$ $p = 0.07$).

La descomposición de las interacciones se muestra en detalle en la **Figura 3**. La elevación de los niveles de glucosa por el estrés es muy evidente al finalizar el estímulo estresante (SWIM), pero ya no es significativa en R30 y R60. Por otro lado hay un aumento de la glucosa por efecto de la AMPH por si sola (en ausencia de estímulo estresante) a partir de R30, más evidente a R60. El efecto estadísticamente significativo de la dosis se muestra con letras diferentes dentro de los grupos HOME, donde se han comparado todos los grupos sin estrés inyectados con AMPH. Lo más importante es que la hiperglucemia causada por la natación forzada, se reduce si el estímulo estresante se presenta simultáneamente con cualquiera de las 3 dosis de AMPH utilizadas ($p < 0.001$ vs VEH-SWIM en todos los casos), confirmando la interacción negativa entre AMPH y estrés, ahora a nivel del eje SMA.

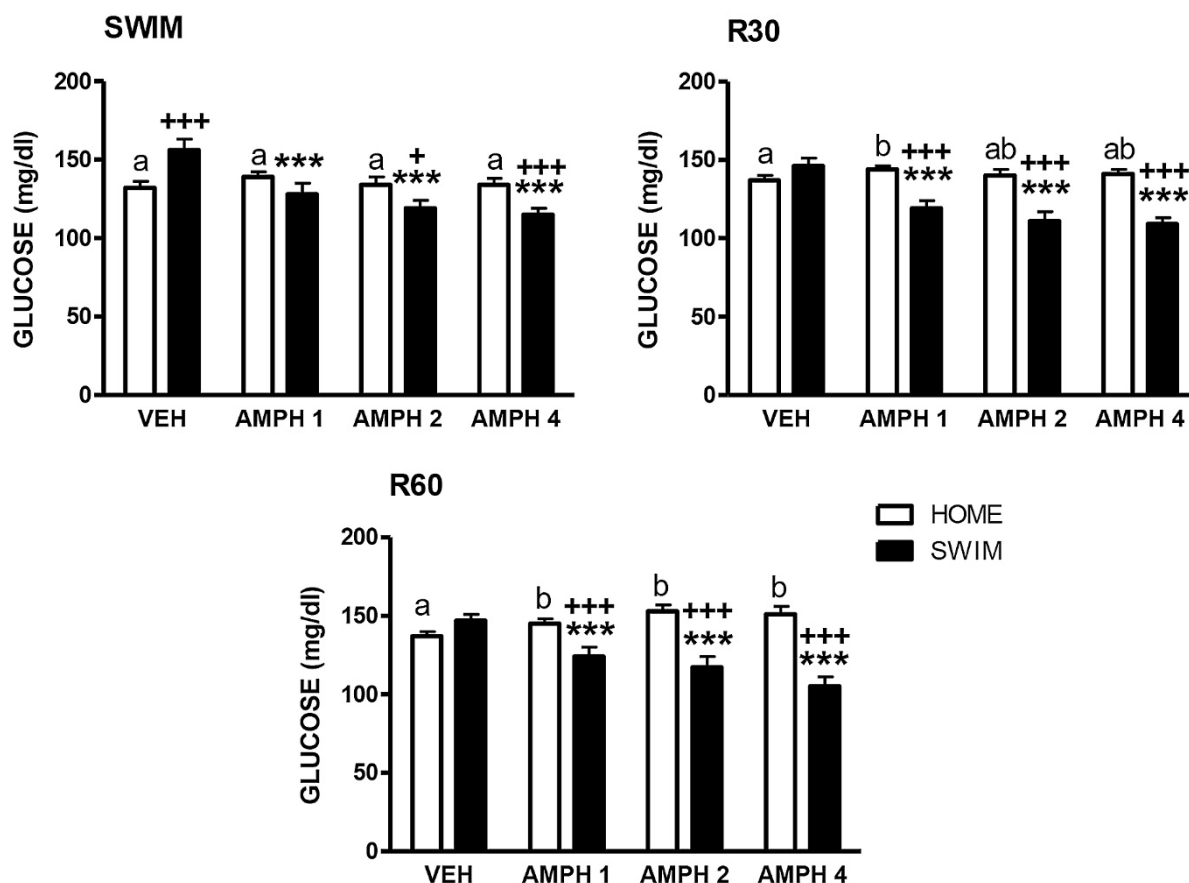


Figura 3. Respuesta de glucosa a 30 min de natación forzada combinada o no con AMPH a 3 dosis (AMPH1, AMPH2 y AMPH4: respectivamente 1, 2 y 4 mg/kg de AMPH). Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 1. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 las tomadas a 30 y 60 min de finalizado el nado (o los tiempos correspondientes en los animales no estresados). Se representa la media \pm SEM; +++ $p < 0.001$, + $p < 0.05$ vs su respectivo control sin estrés; *** $p < 0.001$ vs VEH-SWIM para cada tiempo. Letras diferentes significa diferencia entre las distintas dosis de AMPH con el resto de columnas dentro de HOME. No se muestra el efecto DINÁMICA.

Experimento 1: Respuesta periférica del eje HPA a un estímulo estresante moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con metilfenidato.

Una vez confirmado que las tres dosis utilizadas de AMPH mostraban una interacción negativa con un estímulo estresante emocional moderado como la natación forzada, nos planteamos si esa interacción se daría también con un estimulante del SNC de uso farmacológico para el tratamiento del TDAH como el metilfenidato (MPH).

Existen pocos datos en la literatura respecto a la activación del eje HPA con MPH en modelos animales. No conocemos datos referidos a dosis agudas, por lo que decidimos utilizar dosis normalmente utilizada en el tratamiento del TDAH, para estudiar el posible efecto del MPH sobre el eje HPA y su interacción con la respuesta al estrés.

Con tal motivo, se utilizaron 54 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH-HOME, n=8; VEH-SWIM, n=10; MPH0.5-HOME, n=8; MPH0.5-SWIM, n=10; MPH2-HOME, n=8 y MPH2-SWIM, N=10. Las dosis utilizadas fueron 0.5 y 2 mg/kg de MPH vía sc. Inmediatamente después de las inyecciones, las ratas SWIM fueron expuestas a 30 min de natación forzada a 36°C y las ratas HOME permanecieron en su caja de estabulación. Se estudió la dinámica temporal de la respuesta con extracciones de sangre al final del estrés (SWIM) y a los 30 y 60 min posteriores (R30 y R60). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona, PRL y glucosa. El protocolo experimental se resume en la **Tabla 2**.



Tabla 2. Protocolo experimento 1

Los resultados de ACTH y corticosterona de este experimento (**Figura 4**) fueron analizados mediante GEE con dos factores inter-sujetos (SWIM, con dos niveles: con y sin estrés y MPH, con tres niveles: vehículo, 0.5 y 2 mg/kg de metilfenidato) y un factor intra-sujeto (DINÁMICA, con tres niveles: SWIM, R30 y R60).

El análisis de ACTH revela efecto SWIM (Wald $X^2(1)=179.4$ $p<0.001$), MPH (Wald $X^2(2)=17.7$ $p<0.001$) y DINÁMICA (Wald $X^2(2)=249.7$ $p<0.001$). Son asimismo significativas las interacciones: SWIM x MPH (Wald $X^2(2)=22.8$ $p<0.001$), SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=217.1$ $p<0.001$), MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(4)=23.3$ $p<0.001$) y SWIM x MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(4)=14.9$ $p<0.01$).

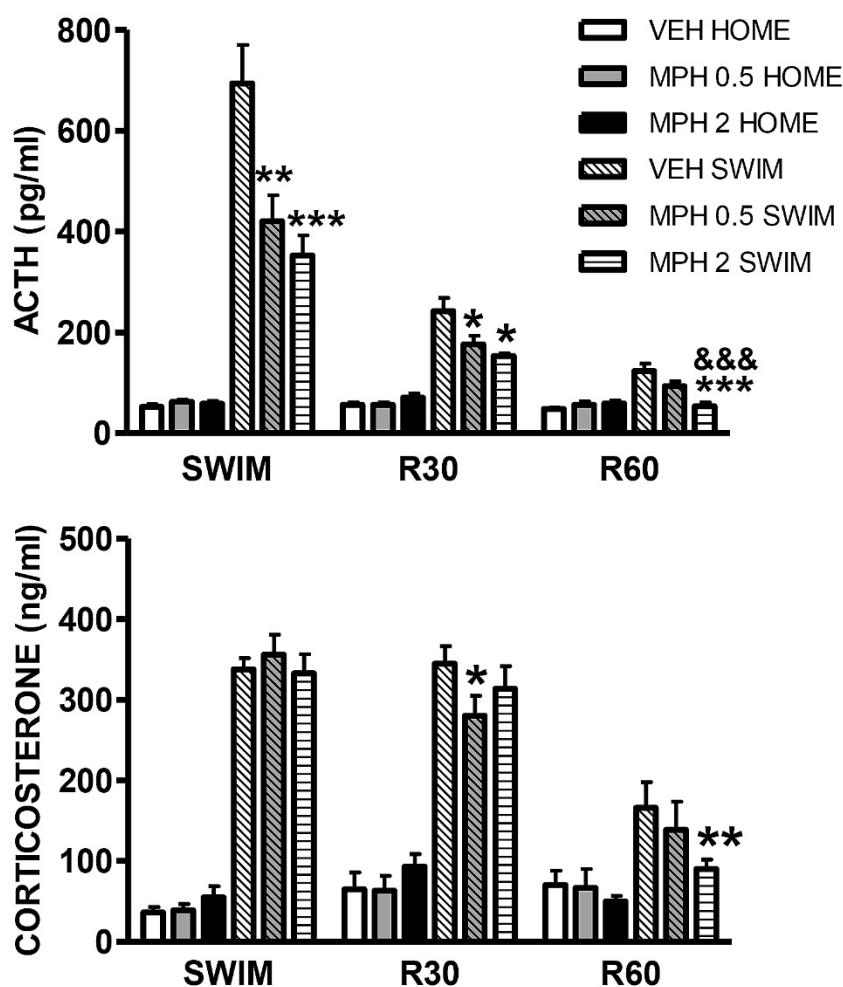


Figura 4. Respuesta de la ACTH y corticosterona a la administración de 0.5 y 2 mg/kg de MPH combinada o no con 30 min de natación forzada. VEH-HOME ($n=8$) es el grupo administrado con salino; MPH0.5-HOME ($n=8$) y MPH2-HOME ($n=8$) son los grupos inyectados con 0.5 y 2 mg/kg de MPH respectivamente; VEH-SWIM ($n=10$) es el grupo expuesto a 30 min de natación forzada; MPH0.5-SWIM ($n=10$) y MPH2-SWIM ($n=10$) son los grupos inyectados con 0.5 y 2 m/kg de MPH y expuestos a 30 min de natación forzada. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 las tomadas a 30 y 60 min de finalizado el nado. Se representa la media \pm SEM. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ y * $p<0.5$ respecto a VEH-SWIM para cada tiempo; &&& $p<0.001$ vs MPH0.5-SWIM. No se muestran las significaciones estadísticas correspondiente a la DINÁMICA y al ESTRÉS.

La descomposición de las interacciones nos indica que la administración aguda sc de 0.5 o 2 mg/kg de MPH por sí misma, en ausencia del estímulo estresante, no aumenta los niveles de ACTH, por lo que no activa el eje HPA, a diferencia de lo que sucede con otros estimulantes, como por ejemplo la AMPH (Gagliano et al, 2009; Gómez-Román et al, 2016). En cambio, la exposición a 30 min de natación forzada en ausencia de metilfenidato, incrementa considerablemente los niveles de ACTH (VEH-SWIM respecto al grupo VEH-HOME) y estos niveles se mantuvieron altos durante todos los tiempos analizados ($p<0.001$ para los tres tiempos).

Al igual que sucedía con la AMPH, las dos dosis de MPH atenúan la respuesta de ACTH al finalizar la natación forzada (MPH0.5-SWIM vs VEH-SWIM $p<0.01$; MPH2-SWIM vs VEH-SWIM $p<0.001$). Una menor respuesta también se observa a R30 (MPH0.5-SWIM vs VEH-SWIM $p<0.05$; MPH2-SWIM vs VEH-SWIM $p<0.05$) y a R60, pero sólo con la dosis mayor (MPH2-

SWIM vs VHE-SWIM <0.001). Por otro lado, si bien al finalizar la exposición al estímulo estresante y en R30 no hay diferencia estadísticamente significativas entre las dos dosis de MPH, sí hay en R60 cuando la dosis mayor atenúa la respuesta de forma más intensa (MPH2-SWIM vs MPH0.5-SWIM P<0.001).

El análisis estadístico de la corticosterona (**Figura 4**) revela efecto SWIM (Wald $X^2(1)=269.6$ $p<0.001$) y DINÁMICA (Wald $X^2(2)=181.6$ $p<0.001$) pero ningún efecto MPH. Sin embargo, son significativas las dobles interacciones SWIM x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=189.6$ $p<0.001$) y MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(4)=18.5$ $p<0.01$). La interacción SWIM x MPH no llega a ser estadísticamente significativa (Wald $X^2(2)=5.21$ $p<0.074$), ni tampoco la triple interacción SWIM x MPH x DINÁMICA. Aunque la triple interacción no fue significativa, la existencia de las dos dobles interacciones SWIM x DINÁMICA y MPH x DINÁMICA sugieren que los efectos de ambos tratamientos difieren en el tiempo. El análisis *a posteriori* indica que la dosis menor de MPH atenúa la respuesta a la natación forzada en R30 (MPH0.5-SWIM vs VEH-SWIM, $p<0.05$), en tanto que la dosis mayor lo hace a R60 (MPH2-SWIM vs VEH-SWIM, $p<0.01$).

En la **Figura 5** se muestran las AUCs de ACTH y corticosterona, que se analizaron mediante GzLM con los factores inter-sujetos MPH y SWIM. Los resultados de la ACTH indican efecto SWIM (Wald $X^2(1)=378.6$ $p<0.001$), MPH (Wald $X^2(2)=6.1$ $p<0.05$) y SWIM x MPH (Wald $X^2(2)=18.3$ $p<0.001$). La descomposición de la interacción nos señala una menor respuesta de los grupos que fueron expuestos a la natación forzada con cualquiera de las dosis de MPH respecto al grupo VEH-SWIM ($p<0.001$ en ambos casos). En cambio, los resultados obtenidos para la corticosterona muestran tan solo efecto SWIM (Wald $X^2(1)=192.4$ $p<0.001$).

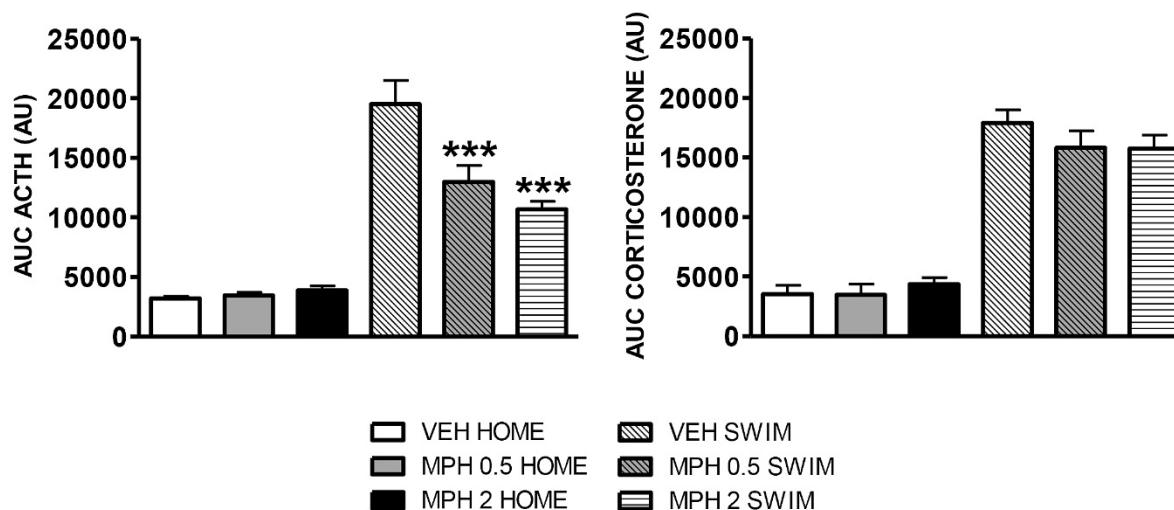


Figura 5. Área bajo la curva (AUCs) de la respuesta de la ACTH y corticosterona a la administración de 0.5 y 2 mg/kg de MPH combinada o no con 30 min de natación forzada. Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 4. Se representa la media \pm SEM. *** $p<0.001$ vs VEH-SWIM. No se muestra la significación estadística correspondiente al factor estrés (SWIM).

Respecto a la glucosa (**Figura 6**), solo se analizaron los resultados obtenidos al finalizar los 30 min de natación forzada dado que los niveles se recuperan rápidamente en el período post-estrés. Se utilizó un GzLM, con 2 factores inter-sujetos: SWIM (2 niveles: con y sin estrés) y MPH (3 niveles: vehículo, 0.5 y 2 mg/kg de metilfenidato). Se observa efecto SWIM (Wald $X^2(1)=18.0$ $p<0.001$), MPH (Wald $X^2(1)=31.2$ $p<0.001$) y SWIM x MPH (Wald $X^2(2)=13.8$ $p<0.001$). La descomposición de esta interacción señala en primer lugar que ninguna de las dosis de MPH por sí mismas, en ausencia del estímulo estresante, aumentan los niveles de glucosa. Por otro lado, el aumento de glucosa que provoca la natación forzada (VHE-HOME vs VHE-SWIM $p<0.001$) es atenuado por la dosis menor de MPH (MPH0.5-SWIM vs VHE-SWIM $p<0.05$) y más aún por la dosis mayor (MPH2-SWIM vs VHE-SWIM $p<0.001$), llegando ésta a bloquear la respuesta al nado. La disminución de la respuesta de glucosa en el grupo MPH2-SWIM es mayor que en el grupo MPH0.5-SWIM ($p<0.001$), lo que significa que cuanto mayor es la dosis de MPH, mayor es la sinergia negativa con la natación forzada.

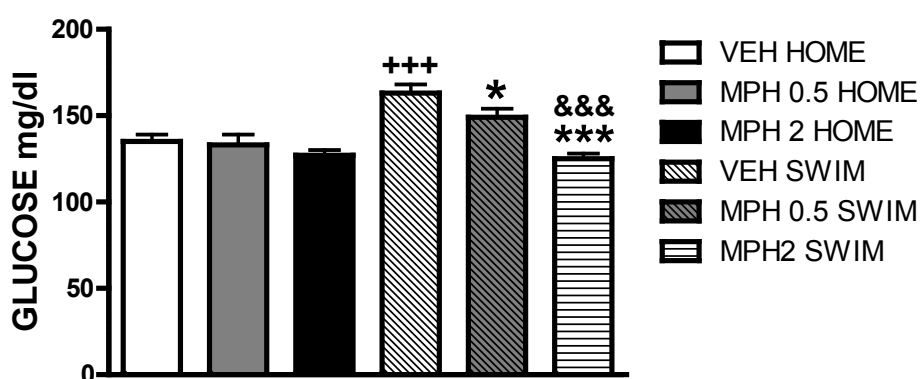


Figura 6. Respuesta de la glucosa a la administración de 0.5 o 2 mg/kg de MPH combinada o no con 30 min de natación forzada. Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 4. Sólo se muestran los valores obtenidos inmediatamente después de la natación forzada. Se representa la media \pm SEM. +++ $p<0.001$ respecto a su respectivo grupo HOME; *** $p<0.001$; * $p<0.05$ vs VEH-SWIM; &&& $p<0.001$ vs MPH-0.5-SWIM.

La respuesta de la PRL, al igual que la de glucosa, se evaluó al finalizar los 30 min de natación forzada por los mismos motivos. Como se muestra en la **Figura 7**, el GzLM revela efecto SWIM (Wald $X^2(1)=12.6$ $p<0.001$), MPH (Wald $X^2(2)=83.3$ $p<0.001$) e interacción SWIM x MPH (Wald $X^2(2)=9.9$ $p<0.01$). La descomposición de la interacción nos señala que el MPH sin estrés disminuye los niveles de PRL y que la secreción de PRL inducida por la natación forzada (VEH-SWIM vs VEH-HOME $p<0.001$) está muy atenuada por cualquiera de las dosis de MPH (MPH0.5-SWIM o MPH2-SWIM vs VEH-SWIM $p<0.001$). Los valores del grupo MPH2-SWIM son menores que los del grupo MPH0.5-SWIM ($p<0.001$), lo que está indicando nuevamente que cuanto mayor es la dosis de MPH, mayor es la inhibición de la respuesta de la PRL al estímulo estresante.

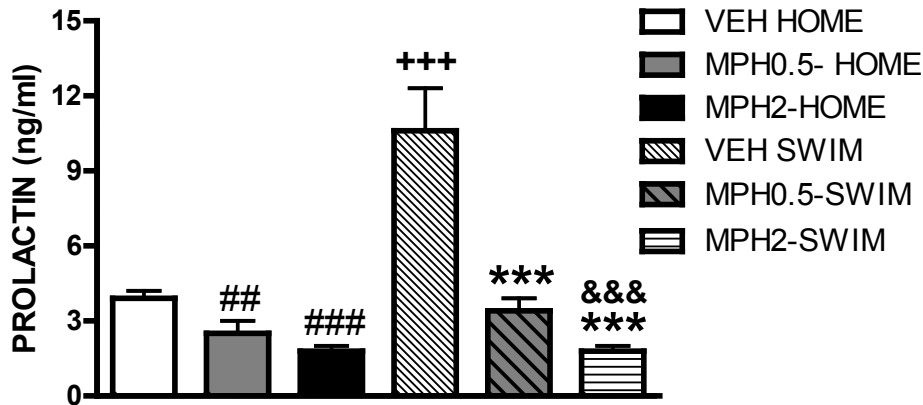


Figura 7. Respuesta de prolactina a la administración de 0.5 o 2 mg/kg de MPH combinada o no con 30 min de natación forzada. Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 4. Sólo se indican los valores obtenidos inmediatamente después del nado. Se representa la media \pm SEM. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$ vs VEH-HOME; +++ $p < 0.001$ vs VEH-HOME; *** $p < 0.001$ vs VEH SWIM; &&& $p < 0.001$ vs MPH05-SWIM.

Además de la respuesta endocrina, se estudió el comportamiento de los animales en la natación forzada. Se fraccionaron las medidas en tres períodos de tiempo, los primeros, los intermedios y los últimos 5 min de exposición (Bloques A, B y C de la Figura 8). En cada uno de esos bloques evaluamos: **escape** (*struggling*), **natación suave** (mild swim) e **inmovilidad** (immobility) en segundos. Los resultados para cada tiempo y conducta se analizaron separadamente mediante GzLM con 1 factor entre-sujetos: MPH (tres niveles: vehículo, 0.5 y 2 mg/kg de MPH).

En los primeros 5 min el factor MPH es significativo para **inmovilidad** (Wald $X^2(2)=7.8$ $p < 0.05$) y para **natación suave** (Wald $X^2(2)=7.0$ $p < 0.05$), pero no para **escape**. El efecto se traduce en mayores niveles de actividad en el grupo MPH2-SWIM.

En los 5 min intermedios el factor MPH es significativo para las tres variables evaluadas: **escape** (Wald $X^2(2)=6.8$ $p < 0.05$), **natación suave** (Wald $X^2(2)=38.8$ $p < 0.001$) e **inmovilidad** (Wald $X^2(2)=47.6$ $p < 0.001$). Respecto a **escape**, el grupo MPH2-SWIM muestra valores mayores que el grupo VEH-SWIM ($p < 0.01$). Al evaluar **natación suave**, los dos grupos con MPH realizan más natación suave que el grupo VEH-SWIM (MPH0.5-SWIM y MPH2-SWIM vs VEH-SWIM $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente), realizando más natación suave el grupo MPH2-SWIM que el MPH0.5-SWIM ($p < 0.001$). Si evaluamos **inmovilidad** observamos que las dos dosis de MPH inducen un menor tiempo de inmovilidad respecto al grupo VEH-SWIM (MPH0.5-SWIM y MPH2-SWIM vs VEH-SWIM, $p < 0.001$), inclusive el grupo MPH2-SWIM permanece menos tiempo inmóvil que el grupo MPH0.5-SWIM ($p < 0.001$), lo que nos demuestra que cuanto mayor es la dosis de MPH, menor es la conducta pasiva.

Finalmente, al evaluar los últimos 5 min de la prueba encontramos efecto MPH para **natación suave** (Wald $X^2(2)=39.0$ $p < 0.001$) y para **inmovilidad** (Wald $X^2(2)=39.1$ $p < 0.001$), pero no para **escape**. Respecto a **natación suave**, los sujetos con cualquiera de las dos dosis de MPH muestran una conducta más activa (MPH0.5-SWIM y MPH2-SWIM vs VEH-SWIM, $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente) y para la **inmovilidad**, los animales con MPH, permanecen menos tiempo inmóviles, mostrando menos conductas pasivas (MPH0.5-SWIM y MPH2-SWIM vs VEH-SWIM

$p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). Tanto para **natación suave** como para **inmovilidad** encontramos que los animales del grupo MPH2-SWIM difieren en forma estadísticamente significativa del grupo MPH0.5-SWIM ($p < 0.001$, respectivamente), demostrándonos nuevamente que cuanto mayor es la dosis de MPH menor es la conducta pasiva.

FORCED SWIM TEST

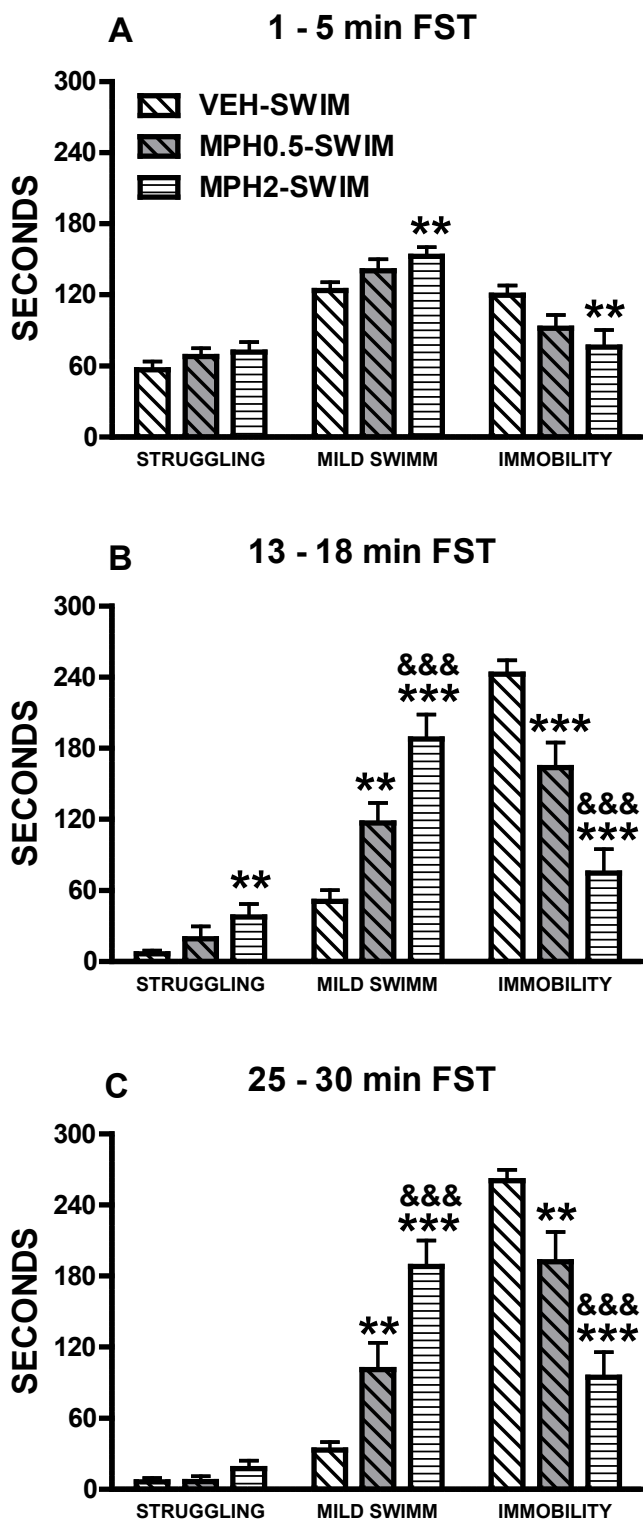


Figura 8. Respuesta a 30 min de natación forzada tras la administración de vehículo, 0.5 o 2 mg/kg de MPH. La respuesta está fraccionada en los cinco primeros min (0 - 5) (A), los intermedios (13 - 18) (B) y los finales (25 - 30) (C). VEH-SWIM ($n=10$) es el grupo inyectado con vehículo y expuesto a 30 min de natación forzada; MPH0.5-SWIM ($n=10$) y MPH2-SWIM ($n=10$) son los grupos inyectados con 0.5 y 2 mg/kg de MPH respectivamente y expuestos a 30 min de natación forzada. Se representa la media \pm SEM. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ vs. VEH-SWIM; &&& $p < 0.001$ vs MPH0.5-SWIM.

Experimento 2: Respuesta central del eje HPA a un estímulo estresante moderado (SWIM) en ratas adultas simultáneamente tratadas con metilfenidato.

Una vez determinada la interacción negativa entre la natación forzada y dos dosis de uso farmacológico de MPH a nivel periférico en el Experimento 1, decidimos estudiar la interacción a nivel del SNC. Elegimos la dosis menor (0.5 mg/kg) para establecer si aún con dosis mínimas de uso en el tratamiento del TDAH el fármaco era capaz de atenuar la respuesta central del eje HPA a un estímulo estresante emocional.

Se utilizaron 36 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: CONTROL, n=4; VEH-HOME, n=8; VEH-SWIM, n=8; MPH-HOME, n=8 y MPH-SWIM, n=8. La dosis utilizada fue de 0.5 mg/kg de MPH vía sc. Inmediatamente después de la inyección, las ratas SWIM fueron expuestas a 30 min de natación forzada a 36 °C y las ratas HOME permanecieron en su caja de estabulación, para ser luego perfundidas y obtener los encéfalos. Las ratas CONTROL fueron perfundidas directamente sin ningún tipo de manipulación, sirviendo como control negativo del experimento y no se incluyeron en el análisis estadístico. Se determinaron por ISH los niveles del mRNA de *c-fos* y del hnRNA de CRF. En la **Tabla 3** se resume el protocolo experimental y en la **Figura 9** se indican las áreas evaluadas.



Tabla 3. Protocolo experimento 2

Los resultados de la ISH del mRNA de *c-fos* y del hnRNA de CRF se analizaron mediante GzLM con 2 factores inter-sujetos: SWIM y MPH, con 2 niveles cada uno (con y sin estrés; con y sin fármaco). La significación estadística de la expresión de *c-fos* se muestra en la **Tabla 4** y en la **Figura 10** se muestra imágenes representativas de la ISH de *c-fos* de mPFC, CPu y PVN de los cuatro grupos experimentales.

Los detalles de las comparaciones entre los distintos grupos experimentales y los datos correspondientes las distintas áreas evaluadas se pueden observar en las **Figuras 11-14**.

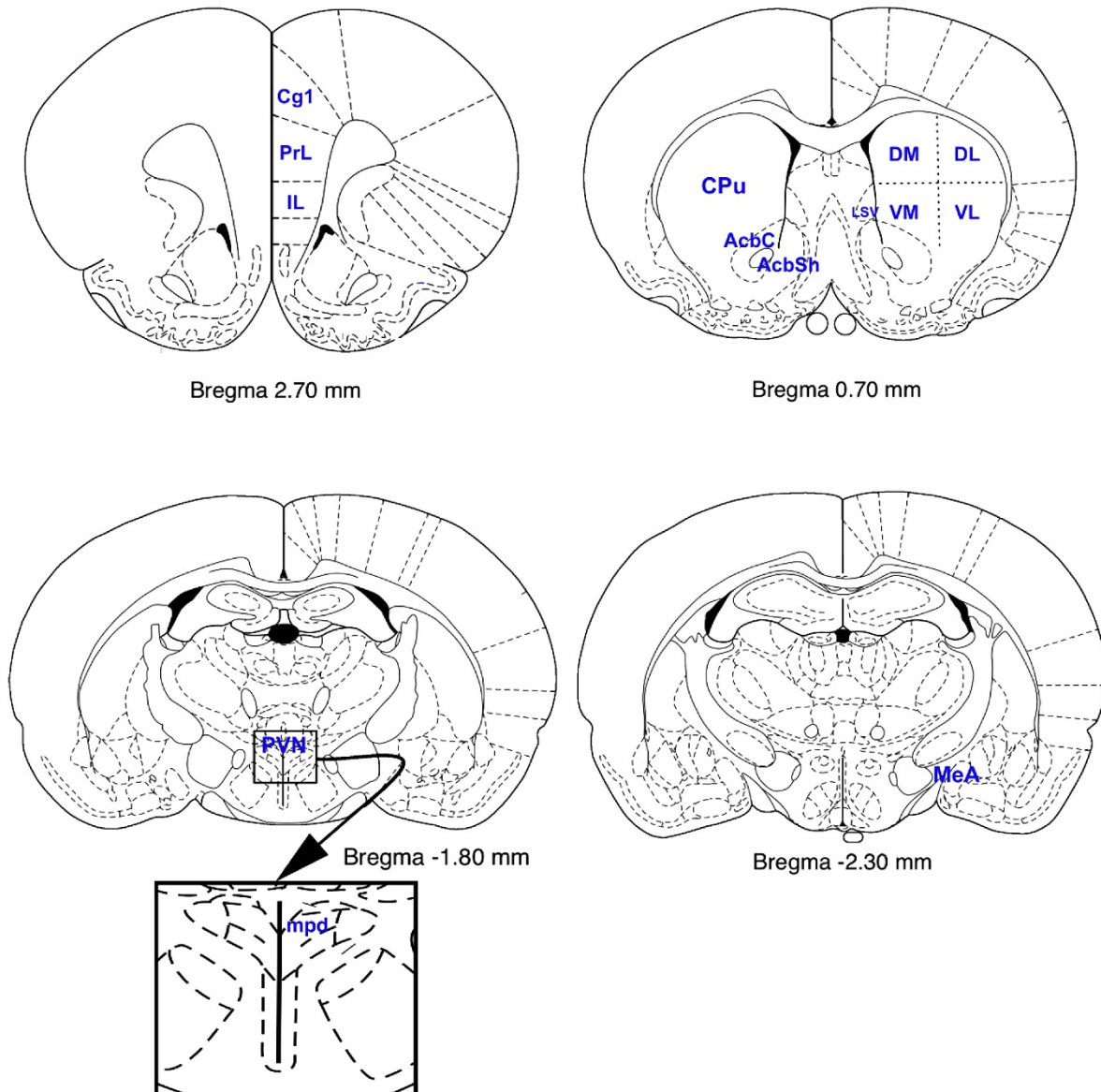


Figura 9. Esquemas representativos de la localización de las áreas del SNC analizadas (Adaptado de Paxinos y Watson, 2007). Abreviaturas: Corteza Prefrontal medial (**Cg1**: Cingulada 1; **PrL**: Prelímbica; **IL**: Infralímbica); **LSV**: Septum Lateral Ventral; **AcbSh**: Accumbens Shell; **AcbC**: Accumbens Core; **CPu**: Caudado-Putamen (**CPuDM**: dorso-medial; **CPuDL**: dorso-lateral; **CPuVM**: ventro-medial; **CPuVL**: ventro-lateral); **PVN**: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (**PVNmpd**: medial-dorsal-parvocelular); **MeA**: Amígdala Medial y **MeApv**: Amígdala medial postero-ventral.

El análisis estadístico muestra efecto SWIM en todas las áreas evaluadas. Se observa también un efecto del fármaco en todas las áreas estudiadas, exceptuando PFC-IL, LSV y MeA. Solo se evidenció interacción MPH x SWIM estadísticamente significativa en CPuDM ($p < 0.05$). La descomposición de esta interacción indica que tanto el MPH en los animales que no tienen estrés ($p < 0.01$), como la natación forzada en los animales que no tienen MPH ($p < 0.001$), fueron capaces de producir un aumento de los niveles de *c-fos*. Sin embargo, la interacción reflejó que la exposición simultánea a ambos estímulos provocó una sinergia positiva.

Respecto al PVN total y PVNmpd, solo se detectó la expresión de *c-fos* en los grupos VEH-SWIM y MPH0.5-SWIM por lo que se realizaron *t-test* entre ambos grupos sin obtener diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 4).

Abreviatura	Area	MPH		SWIM		MPH x SWIM	
		wald X ² (1)	Sig	wald X ² (1)	Sig	wald X ² (1)	Sig
Cg1	Corteza cingulada, área 1	15,7	P<0,001	850,8	P<0,001	0,054	NS
PrL	Corteza prelímbica	4,7	P<0,05	449,3	P<0,001	1	NS
IL	Corteza infralímbica	0,9	NS	348,7	P<0,001	1,3	NS
LSV	Septum Lateral Ventral	1,2	NS	321,4	P<0,001	0,002	NS
CPuDM	Caudado-Putamen, dorso medial	28,6	P<0,001	111,7	P<0,001	3,6	P<0,05
CPuDL	Caudado-Putamen, dorso lateral	17,9	P<0,001	154,7	P<0,001	1,1	NS
CPuVM	Caudado-Putamen, ventro medial	20,6	P<0,001	81,7	P<0,001	0,8	NS
CPuVL	Caudado-Putamen, ventro lateral	10,4	P<0,01	63,8	P<0,001	0,6	NS
Acb-core	Accumbens core	5,7	P<0,05	184,6	P<0,001	1,3	NS
Acb-shell	Accumbens shell	3,6	P<0,05	187,9	P<0,001	0,6	NS
MeA	Amígdala Medial	1,6	NS	40,3	P<0,001	0,7	NS
MeApv	Amígdala medial póstero-ventral	4,7	P<0,05	50,2	P<0,001	0,5	NS
				t-test	Sig		
PVN total	Nucleo Paraventricular del hipotálamo			0,1	NS		
PVNmpd	PVN medial parvocelular dorsal			0,5	NS		

Tabla 4. Resultados del análisis GzLM de la ISH de *c-fos*-RNAm

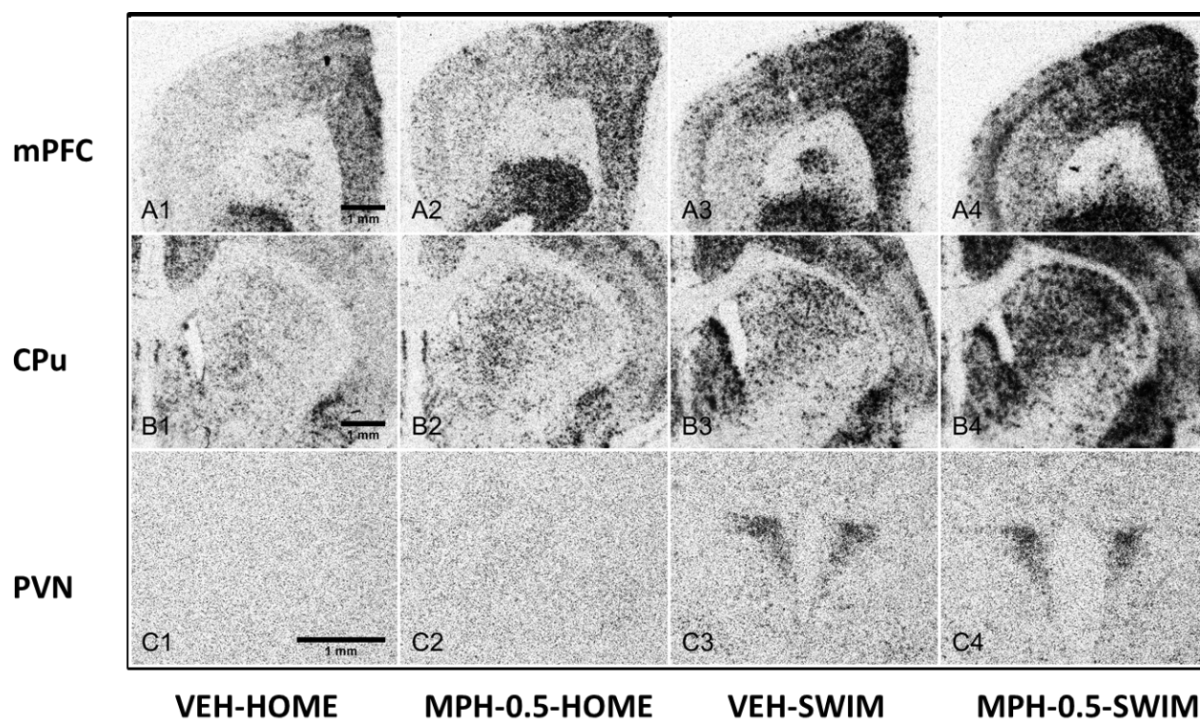


Figura 10. Imágenes representativas de la ISH de *c-fos* en mPFC (A); CPu (B) y PVN (C). VEH-HOME (1): inyectado con solución salina; MPH0.5-HOME (2): inyectado con 0.5 mg/kg de MPH; VEH-SWIM (3): inyectado con solución salina y expuesto a 30 min de natación forzada y MPH0.5-SWIM (4): inyectado con 0.5 mg/kg de MPH y expuesto a 30 min de natación forzada.

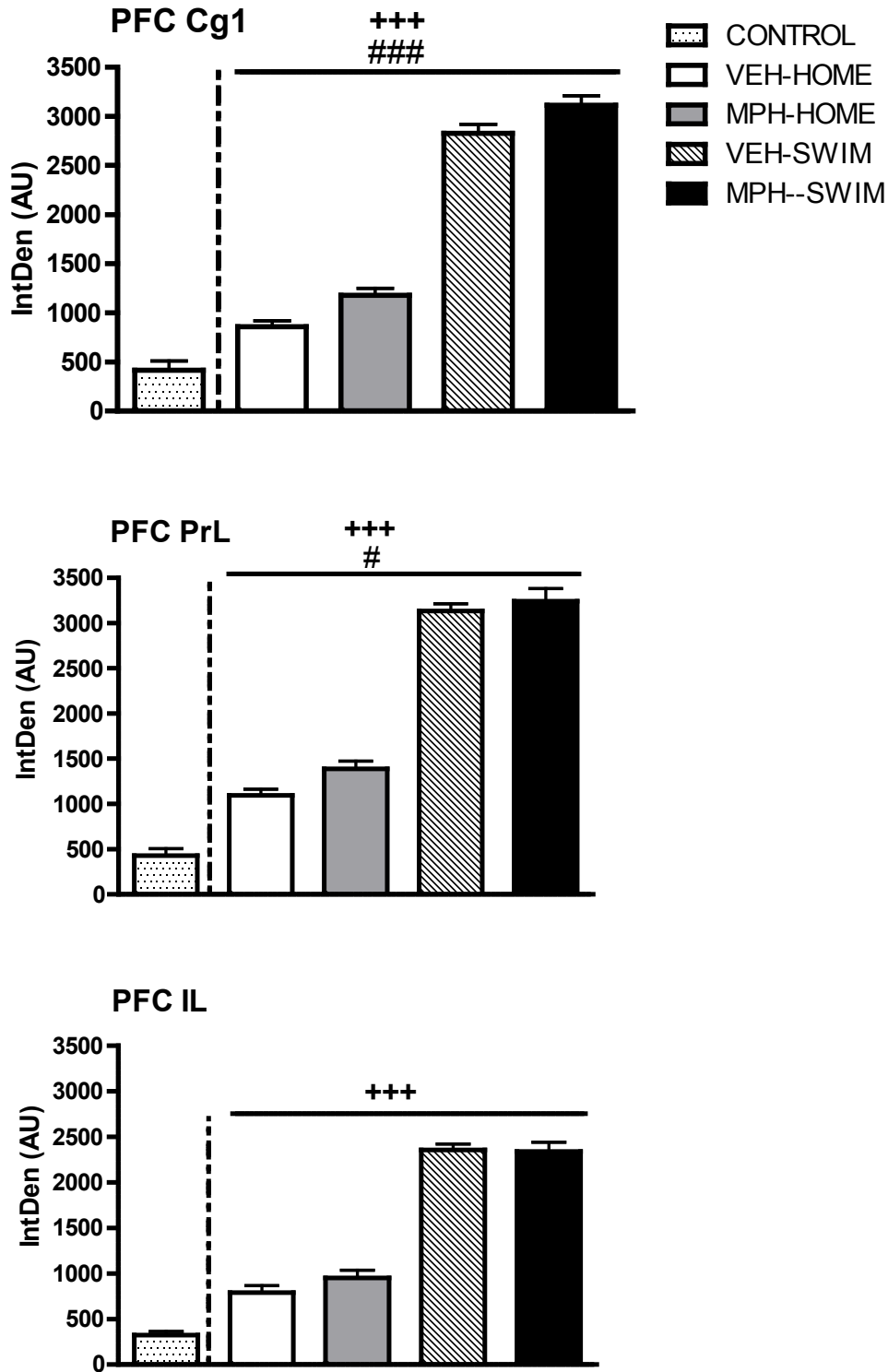


Figura 11. Cuantificación de los niveles de mRNA para c-fos en corteza prefrontal medial (Cg1, PrL, IL). Control (n=4): control absoluto (no incluido en el análisis estadístico), VEH-HOME (n=8): inyectado con solución salina; MPH-HOME (n=8): inyectado con 0.5 mg/kg de MPH; VEH-SWIM (n=8): inyectado con solución salina y expuesto a 30 min de natación forzada y MPH-SWIM (n=8): inyectado con 0.5 mg/kg de MPH y expuesto a 30 min de natación forzada. IntDen (AU): Integrated density-arbitrary units. Los valores están expresados como la media \pm SEM. +++ $p < 0.001$: efecto global SWIM; ### $p < 0.001$, # $p < 0.05$: efecto global MPH.

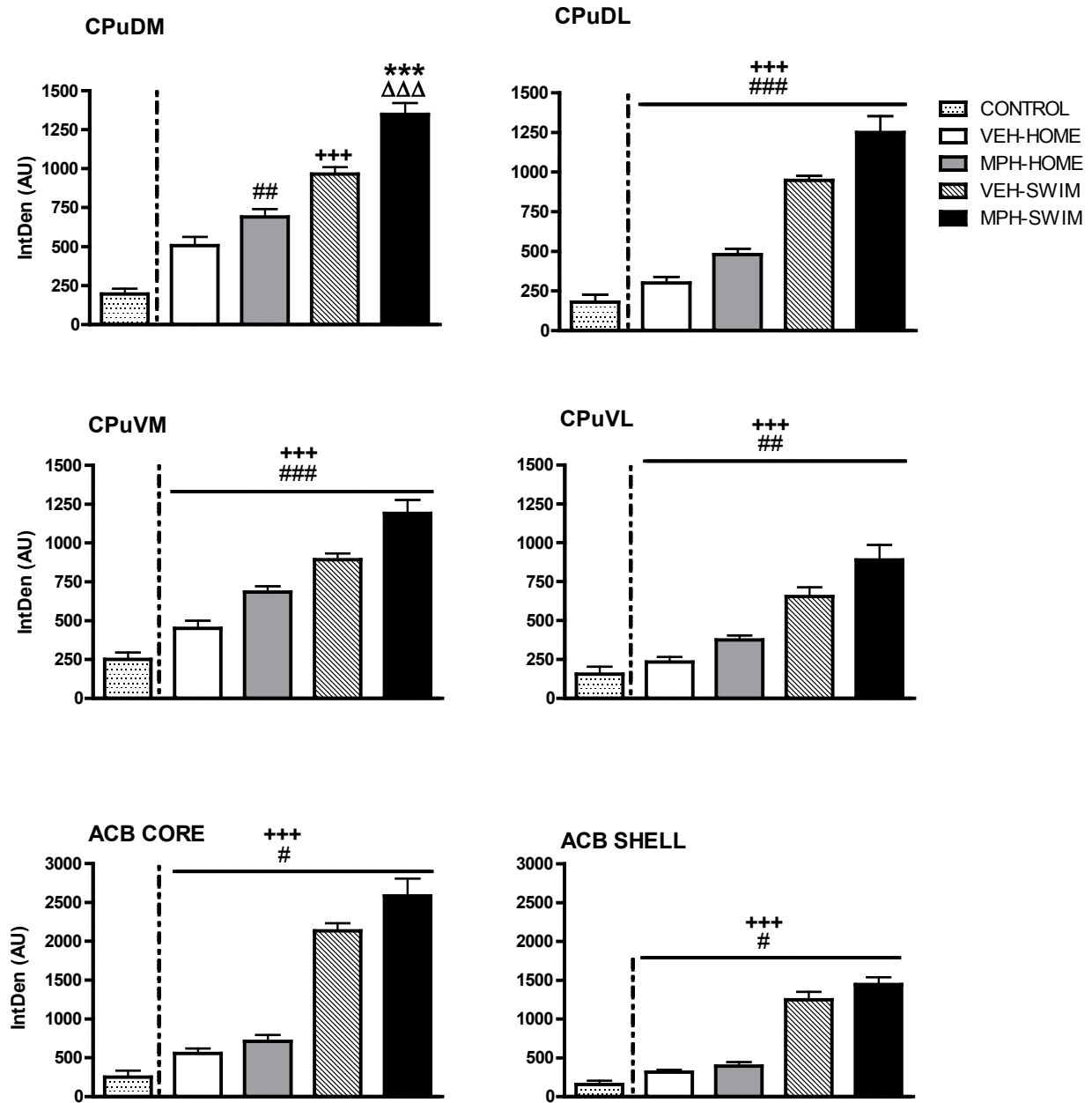


Figura 12. Cuantificación de los niveles de mRNA para c-fos en el Caudado-Putámen [regiones dorso-medial (DM), dorso-lateral (DL), ventro-medial (VM) y ventro-lateral (VL)] y en Núcleo Acum-bens Core y Shell. Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 11. IntDen (AU): Integrated density-arbitrary units. Los valores están expresados como la media \pm SEM. +++ p <0.001, efecto global SWIM; ### p <0.001, ## p <0.01 y # p <0.05: efecto global MPH. En el caso de CPuDM las significaciones son entre grupos individuales: +++ p <0.001 vs VEH-HOME; ## p <0.01 vs VEH-HOME *** p <0.001 vs VEH-SWIM y $\Delta\Delta\Delta$ p <0.001 vs MPH-HOME.

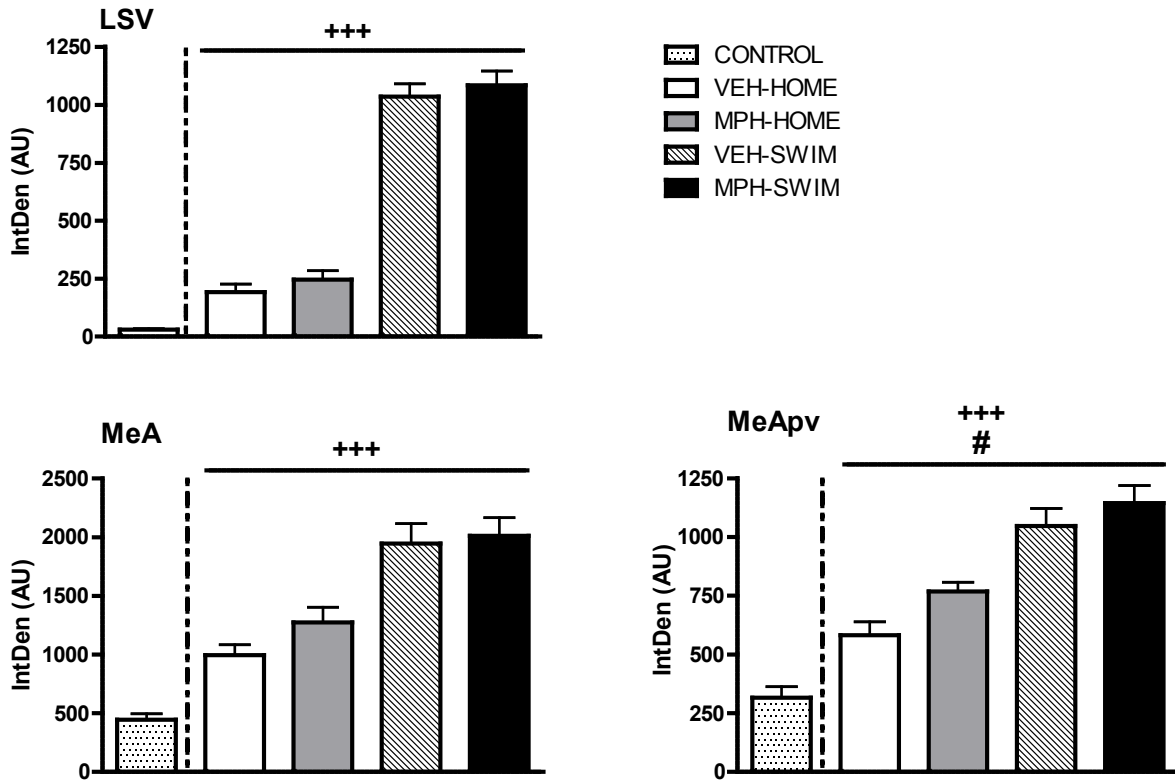


Figura 13. Cuantificación de los niveles de mRNA para *c-fos* en septum lateral ventral (LSV), amígdala medial (MeA) y amígdala medial póstero-ventral (MeApv). Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 11. IntDen (AU): Integrated density-arbitrary units. Los valores están expresados como la media \pm SEM. +++ $p < 0.001$: efecto global SWIM; # $p < 0.05$: efecto global MPH.

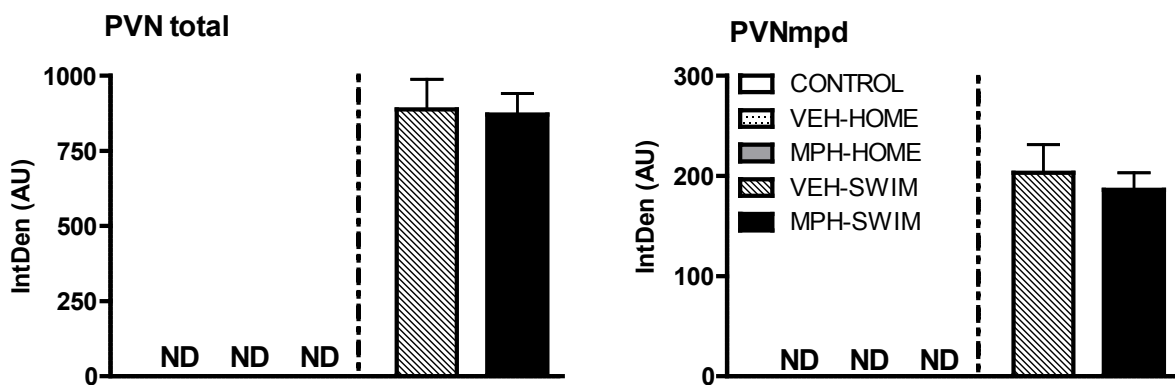


Figura 14. Cuantificación de los niveles de mRNA para *c-fos* en el Núcleo Paraventricular del hipotálamo (PVNtotal) y en su subdivisión medial-parvocelular-dorsal (PVNmpd). Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 11. IntDen (AU): Integrated density-arbitrary units. Los valores están expresados como la media \pm SEM. ND: no detectable. No hay efecto MPH y no se muestra el efecto SWIM.

Los resultados de la ISH del hnRNA de CRF se muestran en la **Figura 15**. Se observa efecto MPH (Wald $X^2(1)=5.9$ $p<0.05$), SWIM (Wald $X^2(1)=20.8$ $p<0.001$) e interacción estadísticamente significativa MPH x SWIM (Wald $X^2(1)=7.7$ $p<0.01$). La descomposición de esta interacción nos indica que el fármaco no tiene efecto por sí mismo y que los niveles de hnRNA CRF se incrementan cuando los animales son expuestos a 30 min de natación forzada (VEH-HOME vs VHE-SWIM, $p<0.001$). Cuando los animales son expuestos a 30 min de natación forzada e inyectados simultáneamente con 0.5 mg/kg de MPH ese aumento de la expresión desaparece, volviendo los resultados a valores similares al grupo VEH-HOME. Se pone de manifiesto nuevamente una interacción negativa entre MPH y SWIM respecto al eje HPA, ahora a nivel central (MPH-0.5-SWIM vs VHE-SWIM $p<0.001$).

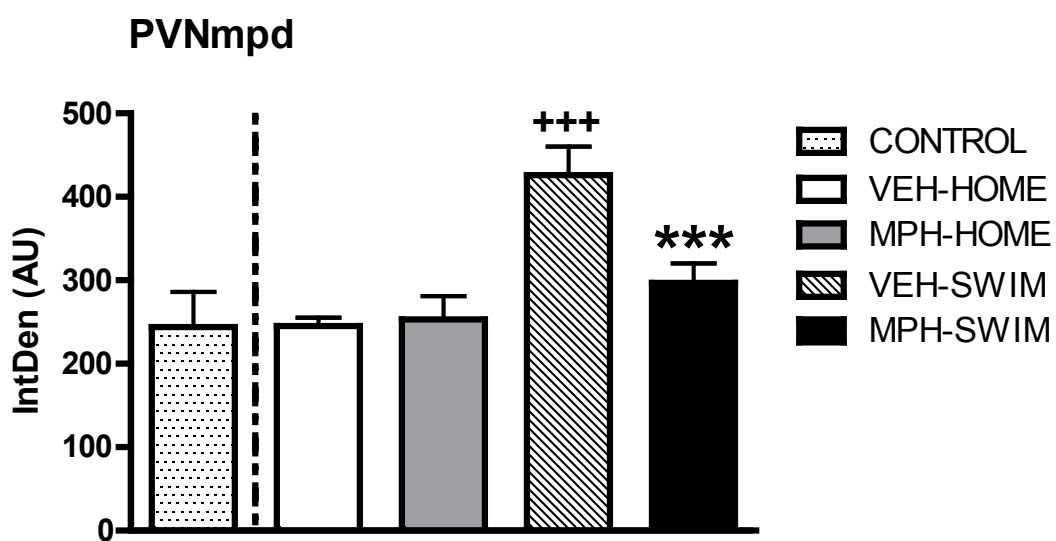


Figura 15. Cuantificación de los niveles de hnRNA para CRF en el subdivisión medial-parvocelular-dorsal del PVN (PVNmpd). Ver descripción de los grupos experimentales en Figura 11. IntDen (AU): Integrated density-arbitrary units. Los valores están expresados como la media \pm SEM. +++ $p<0.001$ vs VEH-HOME; *** $p<0.001$ vs VEH-SWIM.

Experimento 3: Efecto del metilfenidato sobre la evitación activa en dos sentidos (Exposición a la Shuttle-box).

Después de determinar que la exposición a un estímulo estresante emocional de moderada intensidad como la natación forzada conjuntamente con MPH reduce la respuesta de los ejes HPA y SMA, decidimos estudiar otro estímulo estresante emocional como es la exposición al choque eléctrico y así poder evaluar la conducta de afrontamiento a este tipo de situaciones, la ansiedad generada por el estímulo estresante y la capacidad de aprendizaje. Se estudió también el desarrollo del condicionamiento del miedo al contexto.

Se utilizaron 36 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH/CONTROL, n=8; VEH/SHUTTLE, n=10; MPH/CONTROL, n=8 y MPH/SHUTTLE, n=10. Inmediatamente después de las inyecciones de vehículo o de MPH (1 mg/kg sc) se expusieron las ratas SHUTTLE a un procedimiento de evitación activa en dos sentidos y a las ratas CONTROL se las situó en las Shuttle-box sin ningún estímulo (DIA 1). Una vez finalizado el procedimiento (45-50 min), se tomó una muestra de sangre por incisión en la cola. Al día siguiente (DIA 2), todos los animales fueron expuestos a 5 min de EPM. El DÍA 3 experimental se tomó muestra de sangre basal para poner en evidencia posibles diferencias debidas a la exposición a la tarea de evitación-escape en la Shuttle-box. El DÍA 7 todos los sujetos se expusieron a 15 min de campo abierto rectangular (OF) y posterior toma de muestra, con el objetivo de estudiar la generalización del miedo a otro contexto no asociado con el choque. Finalmente, el DÍA 9 todos los sujetos se re-expusieron a las cajas de condicionamiento durante 15 min con toma de muestra al finalizar la re-exposición, sin ningún otro tipo de estímulo, al objeto de evaluar la memoria del condicionamiento del miedo al contexto. Todas las muestras fueron centrifugadas y congeladas a -20 °C para la posterior determinación de los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa. En este experimento eliminamos de la evaluación 2 sujetos *outliers* que permanecieron inmóviles durante todo el tiempo de exposición al choque eléctrico, uno de cada uno de los grupos expuestos a la Shuttle-box. El protocolo de este experimento se resume en la **Tabla 5**.

		Día 1	Día 2	Día 3	Día 7	Día 9	
VEH/CONTROL	INY SC VEH o MPH 1mg/kg	SHUTT-CONT	TM SHUTT	EPM 5'	TM BASAL	TM OF 15'	
VEH/SHUTTLE		SHUTT 50 T					TM CTX SHUTT 15'
MPH/CONTROL		SHUTT-CONT					
MPH/SHUTTLE		SHUTT 50 T					
ACTH, Corticosterona y glucosa							

Tabla 5. Protocolo experimento 3

Los niveles de ACTH del DÍA 1 (día de exposición a la *Shuttle-box*) fueron analizados mediante un GzLM con 2 factores inter-sujetos: SHUTTLE (dos niveles, con y sin exposición a la *Shuttle-box*) y MPH (con dos niveles, la administración de 1 mg/kg de MPH o de vehículo). Se obtiene (**Figura 16**) un efecto significativo del factor SHUTTLE (Wald $X^2(1)=684.4$ $p<0.001$), mientras que el efecto MPH es marginalmente significativo (Wald $X^2(1)=3.0$ $p<0.082$). La interacción SHUTTLE x MPH es estadísticamente significativa (Wald $X^2(1)=3.8$ $p<0.05$) y su descomposición nos indica que los dos grupos expuestos al estímulo estresante presentan mayores niveles de ACTH que sus respectivos controles sin estrés ($p<0.001$), pero la respuesta del grupo MPH-SHUTTLE es menor que la del VEH-SHUTTLE ($p<0.01$). Vuelve por lo tanto a observarse una atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante emocional severo como el choque eléctrico. Las diferencias entre los grupos se mantuvieron a pesar de introducir como covarianza el tiempo total de choque recibido (datos no mostrados), que fue (media \pm SEM) de 143 ± 26 seg para el grupo VEH/SHUTTLE y de 84 ± 17 seg para el grupo MPH/SHUTTLE. Respecto a la corticosterona del DÍA 1 encontramos solamente efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=572.3$ $p<0.001$).

Los niveles de basales de ACTH en el DÍA 3 no muestran diferencias estadísticamente significativas ni para el factor SHUTTLE, ni para el factor MPH. La corticosterona, al igual que la ACTH, no muestra diferencias estadísticamente significativas. La intensidad del choque eléctrico no parece suficiente para incrementar los valores basales de ACTH o corticosterona a las 48 h.

En el DÍA 7 experimental (**Figura 16**) los animales fueron expuestos a un campo abierto, al objeto de evaluar la sensibilización heterotípica del eje HPA que ocurre cuando los animales son previamente sometidos a un estímulo estresante emocional severo como el choque eléctrico (Belda et al, 2008; 2015) o la inmovilización en tabla (Gagliano et al, 2008; Belda et al, 2015). Los resultados mediante GzLM de los niveles de ACTH indican efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=14.1$ $p<0.001$), pero no MPH. Sin embargo, la interacción SHUTTLE x MPH es significativa (Wald $X^2(1)=8$. $p<0.01$). La descomposición de la interacción nos indica que el grupo MPH-SHUTTLE muestra niveles mayores que el MPH-CONTROL ($P<0.001$), lo que no ocurre al comparar los grupos VEH-SHUTTLE y VEH-CONTROL. Además, los niveles son mayores en el grupo MPH-SHUTTLE que en el VEH-SHUTTLE ($p<0.05$). Estos datos indican que la exposición a un estímulo estresante emocional severo como el choque eléctrico causa sensibilización de la respuesta de la ACTH a 15 min de OF 6 días más tarde en los animales que también recibieron MPH, en contraste con la ausencia de sensibilización en los expuestos a la *Shuttle-box* sin MPH. En cuanto a los niveles de corticosterona después de la exposición al campo abierto, se observó efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=24.1$ $p<0.001$) y una interacción SHUTTLE x MPH marginalmente significativa (Wald $X^2(1)=3.1$ $p=0.079$). La descomposición de la interacción indica que los dos grupos expuestos al campo abierto tienen valores mayores que sus respectivos controles sin estrés (VEH-SHUTTLE vs VEH-CONTROL $p<0.05$ y MPH-SHUTTLE vs MPH-CONTROL $p<0.001$) y que el grupo que recibió MPH pero no fue expuesto a la tarea de evitación-escape muestra niveles menores de corticosterona que el grupo VEH-CONTROL ($p<0.05$). La sensibilización heterotípica fue similar en los dos grupos a diferencia de la observada con la ACTH.

Por último, en el DÍA 9 experimental, los animales fueron re-expuestos durante 15 min a las jaulas de condicionamiento (sin choque), para evaluar a nivel endocrino y conductual la memoria del miedo condicionado al contexto asociado al choque eléctrico (Daviu et al, 2012). En concordancia con resultados anteriores de nuestro laboratorio, los niveles de ACTH, mostraron un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=15,3$ $p<0.001$), pero no efecto MPH ni de la interacción entre ambos. Los niveles de corticosterona después de la re-exposición durante 15 min a la *Shuttle-box*, mostraron solo un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=33.4$ $p<0.001$), con igual respuesta al condicionamiento en ambos grupos.

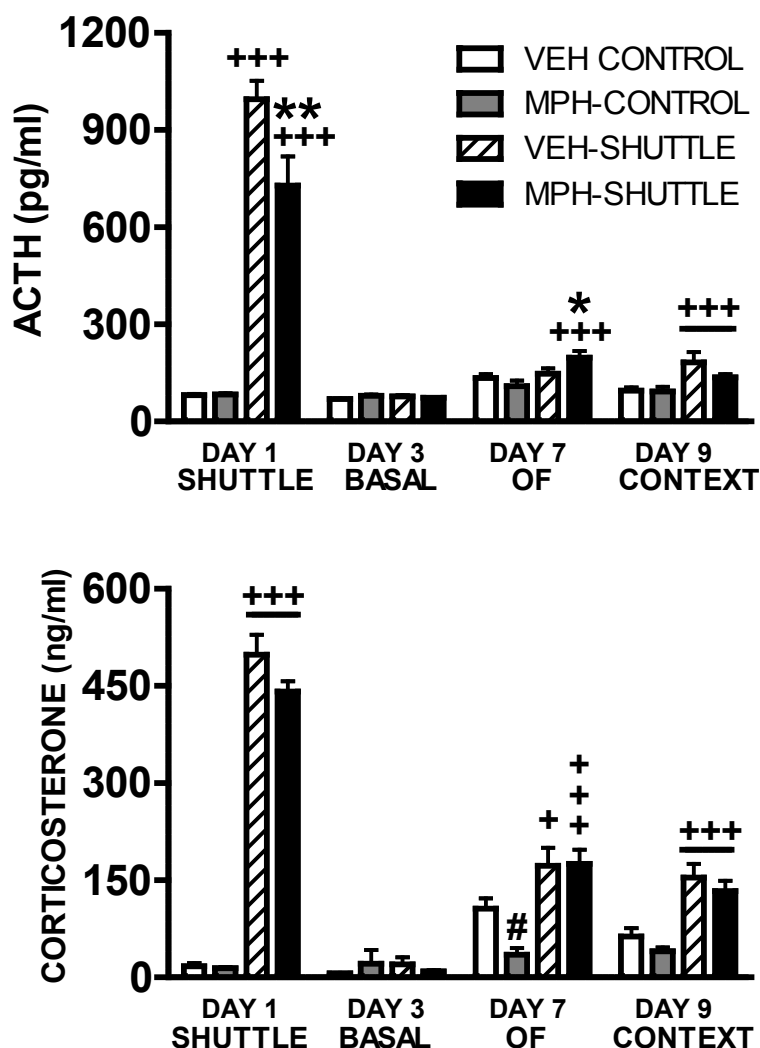


Figura 16. Respuesta de la ACTH y corticosterona a la administración de MPH combinada o no con una tarea de evitación-escape en la Shuttle-box (50 ensayos) en el DÍA 1 experimental. Posteriormente se valoran los niveles basales en el DÍA 3, la respuesta a la exposición al campo abierto rectangular (OF) en el DÍA 7 y la respuesta a la re-exposición al contexto (15 min) en el DÍA 9. VEH-CONTROL ($n=8$) es el grupo administrado con salino; MPH-CONTROL ($n=8$) es el grupo inyectado con MPH; VEH-SHUTTLE ($n=10$) es el grupo inyectado con 1 mg/kg de MPH y expuesto a la tarea en la Shuttle-box; y MPH-SHUTTLE ($n=10$) es el grupo inyectado con 1 mg/kg de MPH y expuesto a la tarea en la Shuttle-box. Se representa la media \pm SEM. +++ $p<0.001$, + $p<0.05$ respecto a su respectivo control sin estrés, +++ $p<0.001$: efecto global estrés; ** $p<0.01$ y * $p<0.05$ vs VEH-SHUTTLE y # $p<0.05$ vs VEH-CONTROL.

Los niveles de glucosa se valoraron después de la exposición al choque eléctrico en la *Shuttle-box* el DÍA 1 y en condiciones basales el DÍA 3.

El DÍA 1 (**Figura 17**) el análisis indica un efecto significativo del factor SHUTTLE (Wald $X^2(1)=75.4$ $p<0.001$) pero no del factor MPH, aunque si es significativa la interacción SHUTTLE x MPH (Wald $X^2(1)=4.2$ $p<0.05$). Su descomposición nos indica que los dos grupos sometidos a estrés muestran valores de glucosa mayores que sus respectivos controles ($p<0.001$) y que el grupo MPH-SHUTTLE muestra valores menores que el grupo VEH-SHUTTLE ($p<0.05$), poniendo en evidencia la atenuación de la respuesta de la glucosa al igual que se diera en el Experimento 1 con la natación forzada.

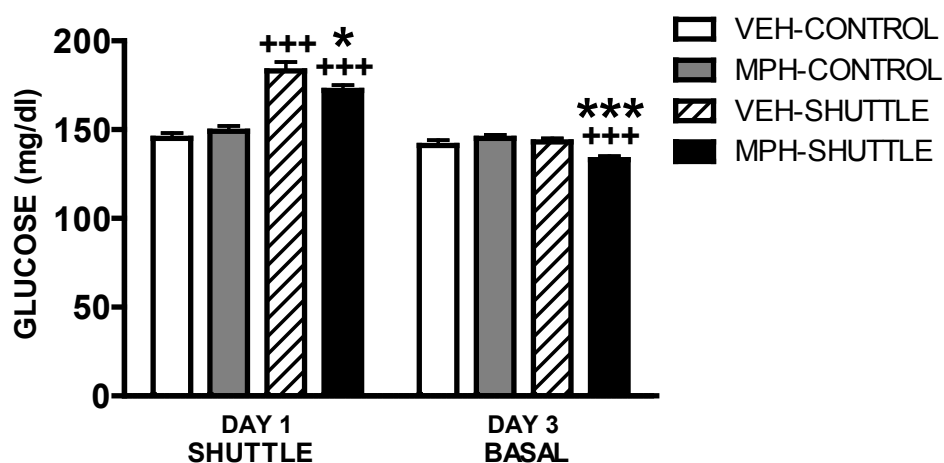


Figura 17. Respuesta de la glucosa a la administración de MPH combinada o no con una tarea de evitación-escape en la Shuttle-box (50 ensayos) en el DÍA 1 experimental y los niveles basales en el DÍA 3. Ver distribución de los grupos experimentales en la Figura 16. Se representa la media \pm SEM. +++ $p<0.001$ vs su respectivo control sin estrés; *** $p<0.001$; * $p<0.05$ respecto a VEH-SHUTTLE.

El DÍA 3, se observa efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=5.0$ $p<0.05$), ningún efecto MPH y sí una interacción significativa SHUTTLE x MPH (Wald $X^2(1)=11.9$ $p<0.001$). La descomposición de la interacción indica que el grupo MPH-SHUTTLE muestra valores menores que su respectivo control sin choque ($p<0.001$) y que el grupo VEH-SHUTTLE ($p<0.001$).

En conclusión, al igual que la AMPH (Gómez-Román et al, 2016) el MPH no altera los niveles basales de glucosa, pero disminuye la elevación inducida por un estrés emocional.

La evaluación de la conducta en la *Shuttle-box* del DÍA 1, fraccionada en cinco bloques consecutivos de 10 ensayos se muestra en la **Figura 18**. Los resultados fueron evaluados con respectivos GEE con un factor entre-sujetos, (MPH, dos niveles: con y sin la administración del fármaco) y un factor intra-sujetos (DINÁMICA, 5 niveles: 1°, 2°, 3°, 4° y 5° bloque de ensayos). Se analizaron las siguientes variables: **evitaciones o respuestas condicionadas** (*Conditioned changes*), **latencia de evitación** (*Conditioned latency*), **huidas o respuestas incondicionadas** (*Unconditioned changes*), **latencia de huida** (*Unconditioned latency*), **cruzamientos entre compartimentos inter-ensayos** (*ITI changes*), **latencia total de respuestas condicionadas e incondicionadas** (*C+U Latency*).

Los resultados estadísticos se muestran en la **Tabla 6**. Solamente encontramos efecto significativo del factor MPH en **latencia de huidas** ($p < 0.05$), lo que nos indica que los animales inyectados con MPH huyen en menos tiempo. También hay una interacción significativa entre MPH y DINÁMICA para la variable **cruzamientos entre compartimentos inter-ensayos** (Wald $X^2(4) = 9.4$ $p < 0.05$) y su descomposición nos indica que los animales del grupo MPH-SHUTTLE realizan más cruzamientos que el grupo VEH-SHUTTLE en el período entre choques del cuarto bloque ($p < 0.05$).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los cruzamientos entre compartimentos en los 5 primeros min de exploración (*Habituation changes*) y en el número de respuestas nulas (*Null responses*) evaluadas con las respectivas *t-Student*.

VARIABLE	MPH		DINAMICA		MPH X DINAMICA	
	Wald $X^2(1)$	Sig	Wald $X^2(4)$	Sig	Wald $X^2(4)$	Sig
Conditioned Changes	0,94	NS	24,9	<0,001	2,5	NS
Conditioned Latency	0,14	NS	11,8	<0,05	5,9	NS
Unconditioned Changes	0,46	NS	3,1	NS	7,2	NS
Unconditioned Latency	4,8	<0,05	29,1	<0,001	3,3	NS
ITI Changes	1,6	NS	61,9	<0,001	9,4	<0,05
C+U Latency	2,4	NS	24,8	<0,001	0,97	NS

Tabla 6. Conducta en la Shuttle-Box del DIA 1 del Experimento 3

SHUTTLE-BOX BEHAVIOR

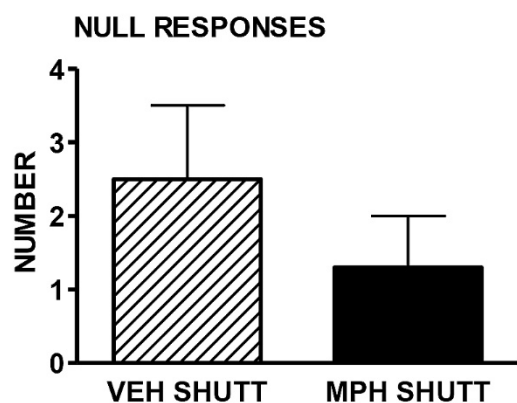
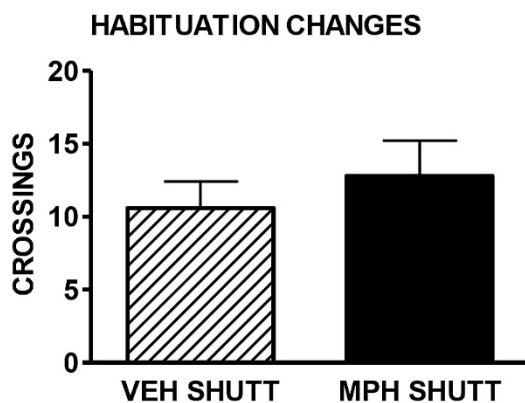
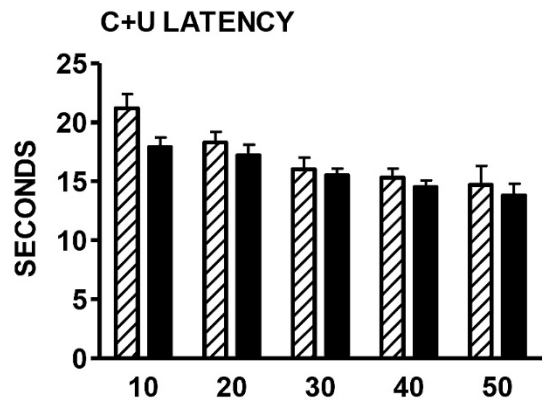
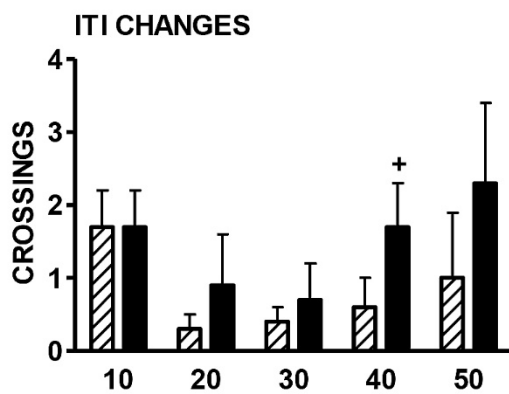
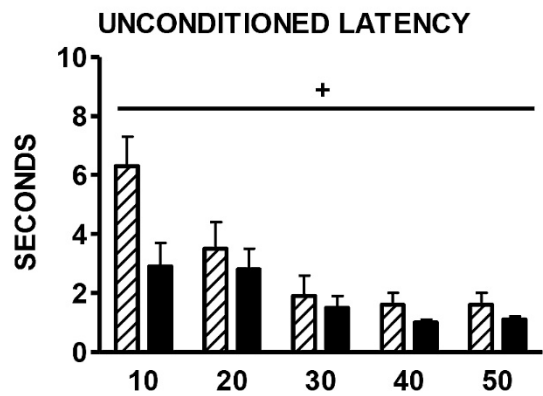
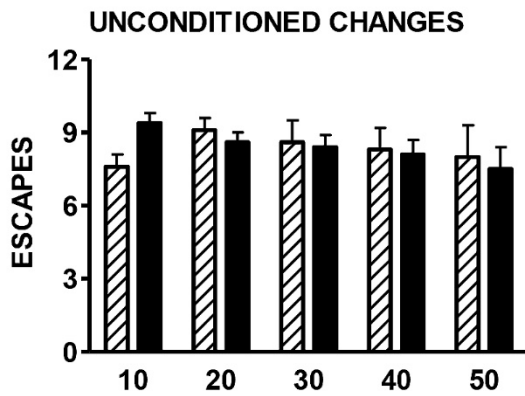
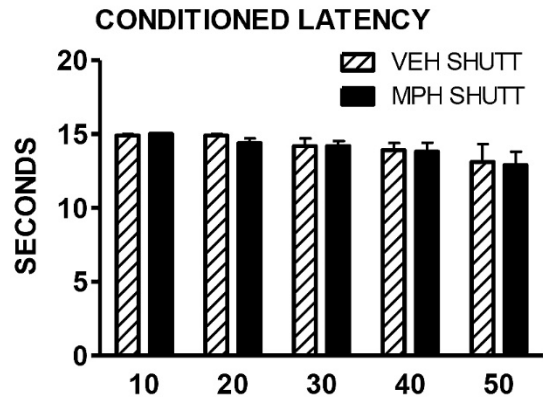
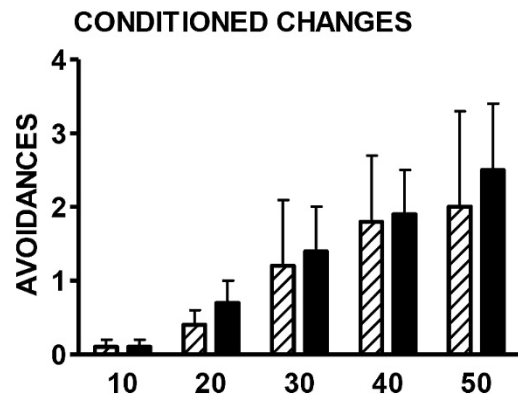


Figura 18 (página anterior). Respuesta conductual en la tarea de evitación-escape tras la administración de MPH. Variables: *CONDITIONED CHANGES* (respuestas condicionadas o evitaciones); *CONDITIONED LATENCY* (latencia de respuestas condicionadas); *UNCONDITIONED CHANGES* (respuestas incondicionadas o huidas); *UNCONDITIONED LATENCY* (latencia de respuestas incondicionadas); *ITI CHANGES* (cruzamientos en los períodos inter-ensayos); *C+U LATENCY* (latencia total de respuestas condicionadas e incondicionadas); *HABITUATION CHANGES* (cruzamientos en los primeros 5 min de exploración previos a los 50 ensayos); *NULL RESPONSES* (respuestas nulas). Ver descripción grupos experimentales en la Figura 16. Se representa la media \pm SEM. + $p < 0.05$ vs VEH-SHUTTLE o factor global MPH.

Los resultados obtenidos en el EPM del DÍA 2 fueron analizados mediante un GzLM con 2 factores inter-sujetos: SHUTTLE y MPH. Como puede observarse en la **Figura 19A**, ni el **número de entradas en brazos abiertos** ni el **número de entradas en brazos cerrados** muestran diferencias estadísticamente significativas, lo que demuestra que no hay hipoactividad al día siguiente de la exposición al choque eléctrico en la *Shuttle-box*.

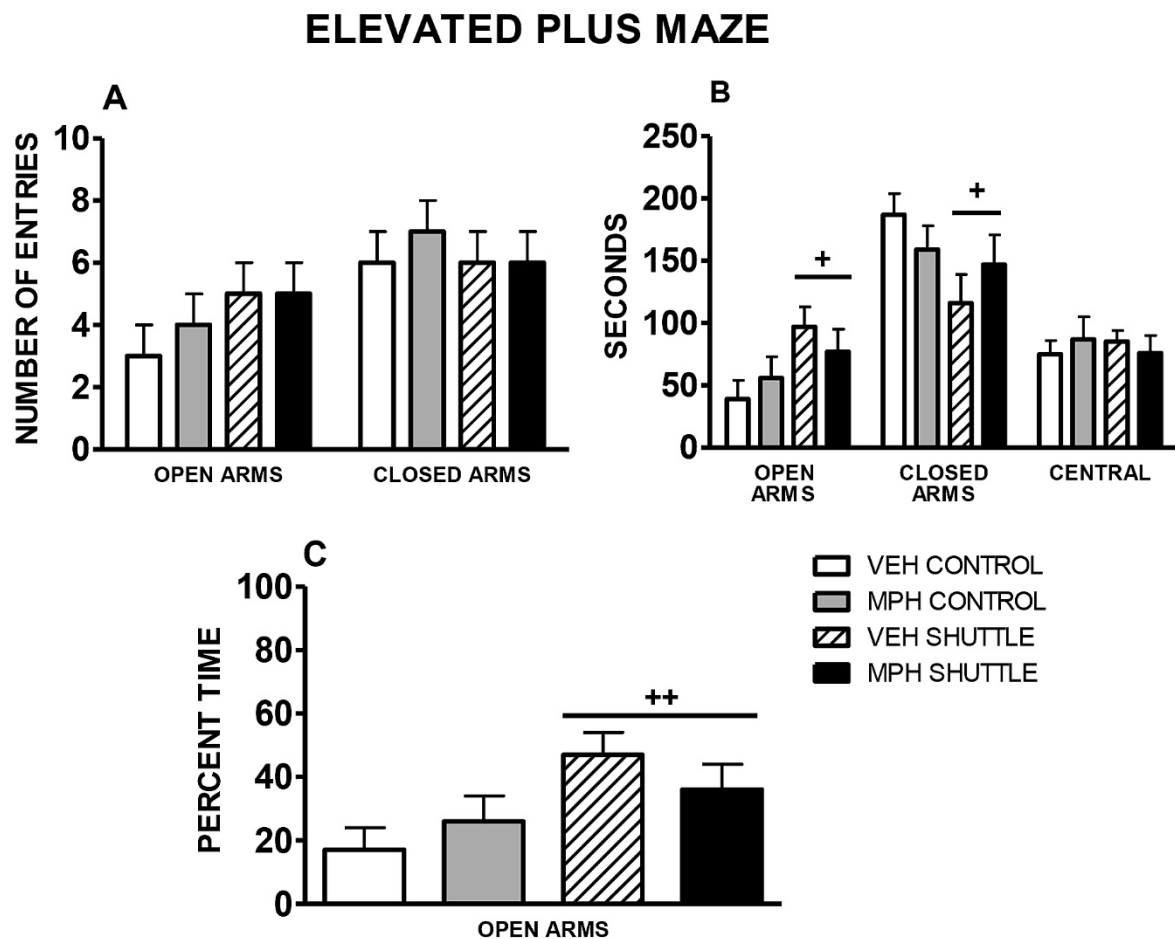


Figura 19. Medidas conductuales representativas durante la exposición a 5 min en EPM en el DÍA 2 experimental: Entradas (A), tiempo de permanencia en brazos abiertos, en brazos cerrados o en el centro del EPM (B) y porcentaje de tiempo de permanencia en abiertos respecto a abiertos más cerrados (C) del EPM. Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 16. OPEN ARMS: brazos abiertos; CLOSED ARMS: brazos cerrados. Se representa la media \pm SEM. ++ $p < 0.01$; + $p < 0.05$ efecto global SHUTTLE.

El **tiempo de permanencia en el centro** del EPM no muestra diferencias significativas entre los grupos. El **tiempo de permanencia en brazos abiertos** muestra un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=6.2$ $p<0.05$), independientemente de la administración de MPH, de tal manera que los expuestos a la *Shuttle-box* permanecen más tiempo en los brazos abiertos. En consonancia, el **tiempo de permanencia en los brazos cerrados** muestra también un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=4.05$ $p<0.05$), permaneciendo menos tiempo en los brazos cerrados los animales que fueron expuestos a la *Shuttle-box* independientemente de la administración del fármaco (**Figura 19B**). El porcentaje de tiempo en brazos abiertos respecto al abierto más cerrado (**PERCENT TIME OA**) tiene un comportamiento similar a las dos anteriores, un efecto SHUTTLE estadísticamente significativo (Wald $X^2(1)=8.07$ $p<0.01$), sin efecto MPH ni una interacción entre ambos factores (**Figura 19 C**).

En el OF del DÍA 7 se evaluaron la **distancia recorrida en la periferia** (**Figura 20A**), la **distancia recorrida en el área central** (**Figura 20B**) y el **tiempo de permanencia en el área central** (**Figura 20C**). Se utilizó GEE con dos factores inter-sujetos (SHUTTLE y MPH) y un factor intra-sujetos, DINAMICA (tres niveles: primeros, segundos y terceros 5 min de exposición al OF). Las variables **distancia recorrida en el centro** (**Figura 20B**) y **tiempo recorrido en el centro** (**Figura 20C**), no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La variable **distancia recorrida en la periferia** (**Figura 20A**), mostró un efecto significativo de la DINAMICA (Wald $X^2(2)=6.6$ $p<0.05$) y de la interacción SHUTTLE x MPH (Wald $X^2(1)=5.0$ $p<0.05$). La descomposición de esta interacción nos indica que, en los controles, la actividad motora de los inyectados con MPH es superior a los inyectados con vehículo ($p<0.05$); por otro lado, en los inyectados con MPH, los expuestos a la tarea de evitación-escape tienen menos actividad motora que los controles ($p<0.05$).

Finalmente, nueve días después de la *Shuttle-box* se re-expusieron los animales sin ningún tipo de estímulo durante 15 min para estudiar el miedo condicionado al contexto mediante la conducta de **freezing** (**Figura 21**). El GzLM de la variable **freezing** mostró efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=26.2$), con un aumento respecto a los controles ($p<0.001$), y las diferencias se mantuvieron a pesar de introducir como covarianza el tiempo total de choque recibido el DÍA 1 (datos no mostrados). Las otras dos variables evaluadas, **número de incorporaciones** (*number of rearings*) y **número de cruzamientos** (*number of crossing*) también muestran un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=36.4$ $p<0.001$; Wald $X^2(1)=29.7$ $p<0.001$ respectivamente), pero tampoco hubo efecto del MPH ni interacción entre ambos factores. Es decir, los animales expuestos a la *Shuttle-box* en el DÍA 1 realizan menos incorporaciones y menos entrecruzamientos que las que no fueron expuestas al choque eléctrico, independientemente del fármaco.

OPEN FIELD

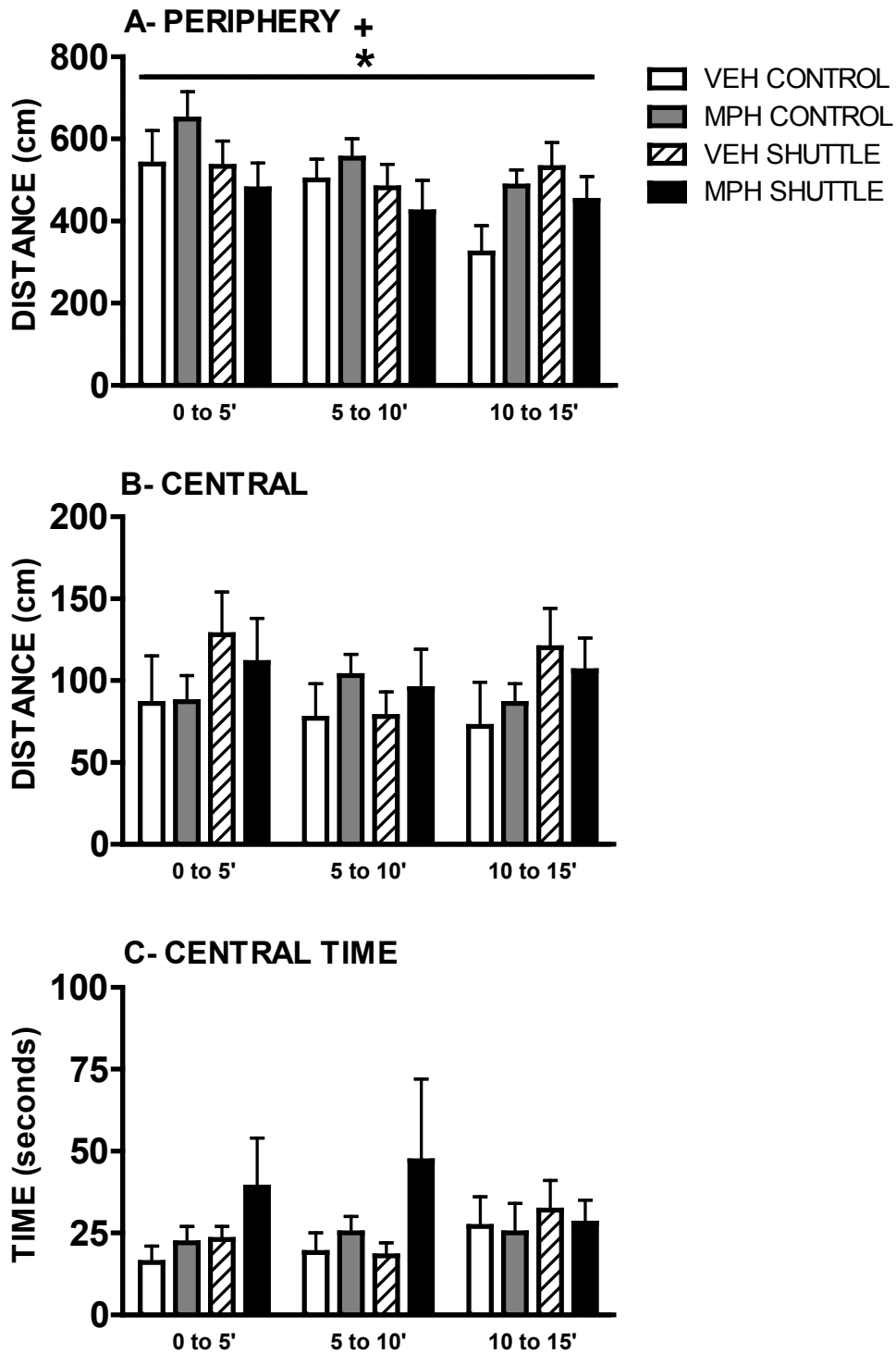


Figura 20. Medidas conductuales representativas de la exposición a 15 min de OF en el DÍA 7. Distancia recorrida en periferia (A), distancia recorrida central (B) y tiempo de permanencia central (C). Se han fraccionado en los primeros, segundos y últimos 5 min. Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 16. Se representa la media \pm SEM. * $p < 0.05$, efecto MPH sólo en controles; + $p < 0.05$ efecto SHUTTLE sólo en el grupo inyectado con MPH.

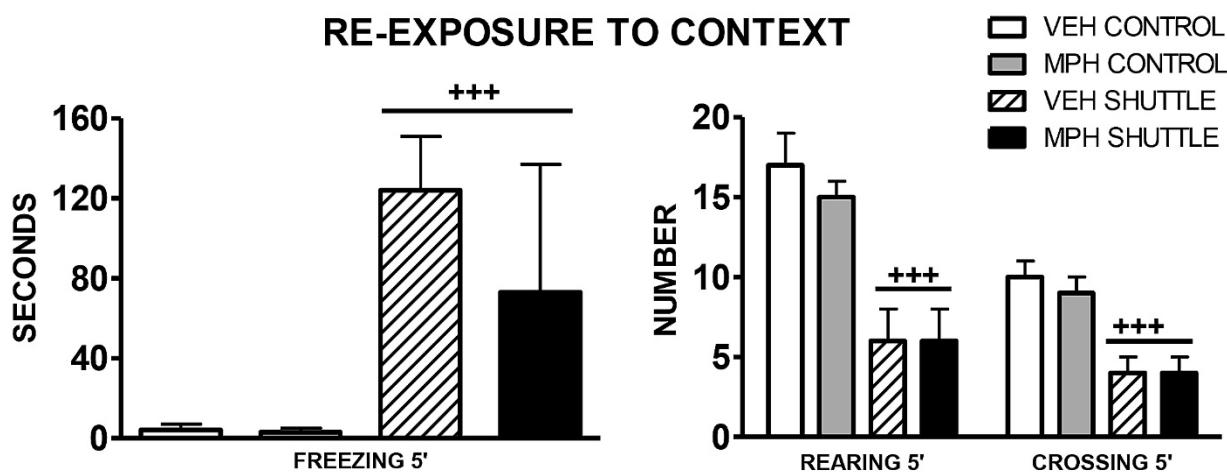


Figura 21. Respuesta de las variables de conducta analizadas durante los primeros 5 min de re-exposición a la Shuttle-box el DÍA 9: CROSSING 5' (número de cruzamientos); REARING 5' (número de rearing) y FREEZING (tiempo de inmovilidad). Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 16. Se representa la media \pm SEM. +++ $p < 0.001$ efecto global SHUTTLE.

En este experimento realizamos también un seguimiento del peso de los animales (**Figura 22**) antes de comenzar el experimento (DIA1), al día siguiente de la exposición a la *Shuttle-box* (DIA2) y después de la re-exposición al contexto (DIA9). El análisis estadístico del GzLM de la ganancia de peso entre los días 1 y 2 o entre los días 1 y 9 (variables evaluadas DAYS 1-2 y DAYS 1-9 indicó un efecto SHUTTLE (Wald $X^2(1)=26.0$ $p < 0.001$ y Wald $X^2(1)=10.0$ $p < 0.01$ respectivamente), de tal manera que la ganancia de peso de los animales expuestos a la *Shuttle-box* fue menor que la de los controles. Las diferencias se mantienen en el tiempo y fueron independientes de la administración del fármaco.

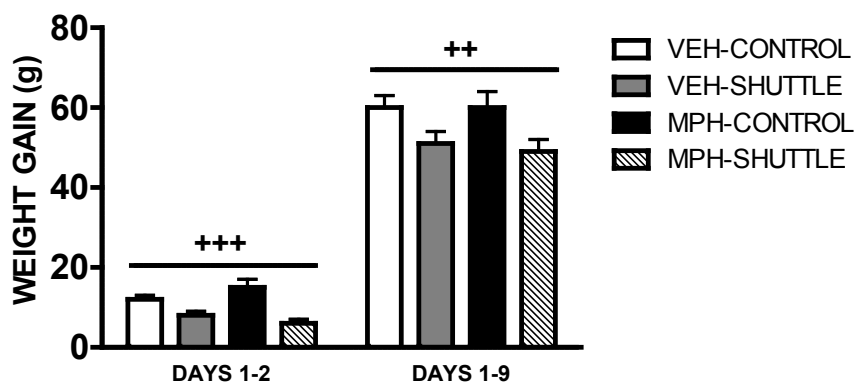


Figura 22. Seguimiento de la ganancia de peso corporal de los animales durante el experimento. Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 16. DAYS 1-2: ganancia de peso en las 24 h siguientes a la exposición a la *Shuttle-box*; DAYS 1-9: ganancia de peso durante todo el procedimiento experimental. Se representa la media \pm SEM. +++ $p < 0.001$; ++ $p < 0.01$ efecto global SHUTTLE.

Aunque se observaron algunos efectos del MPH sobre la conducta, la existencia de una gran variabilidad individual (incluso en los animales controles) nos llevó a planear un experimento adicional ampliando el número de sujetos.

Experimento 4: Replicación del efecto del metilfenidato sobre la evitación activa en dos sentidos (Exposición a la Shuttle-box).

Se decidió ampliar el número de sujetos e incluir un solo factor inter-sujetos: MPH. Se utilizaron 36 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH/SHUTTLE n=18; MPH/SHUTTLE n=18. Inmediatamente después de las inyecciones de vehículo o de MPH (1 mg/kg, sc) se expuso a todos los animales a un procedimiento de evitación activa en dos sentidos (50 ensayos). El resumen del protocolo experimental se muestra en la **Tabla 7**.

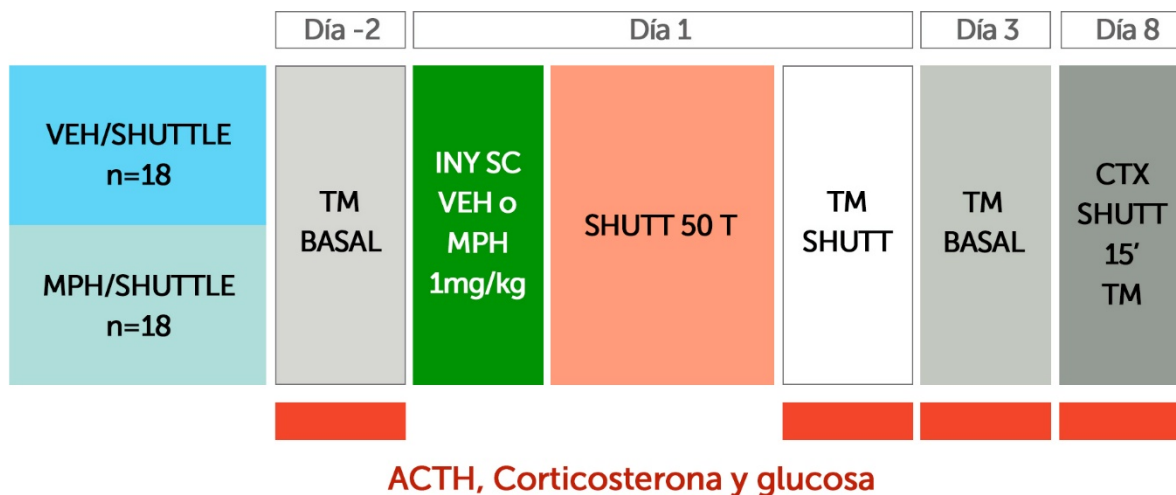


Tabla 7. Protocolo experimento 4

Se tomaron muestras basales dos días antes de comenzar el experimento (DIA -2) y dos días después de la exposición al estímulo estresante (DIA 3). El DÍA 1, todos los animales se expusieron a 50 ensayos en la *Shuttle-box* con posterior toma de muestra. Finalmente, el DÍA 8, todos los animales se re-expusieron a las cajas de condicionamiento sin ningún tipo de estímulo durante 15 min con extracción de sangre al final del procedimiento. Todos los resultados endocrinos de este experimento se evaluaron con *t-Student*. En este experimento eliminamos de la evaluación 4 sujetos *outliers*: dos de ellos permanecieron inmóviles durante toda la exposición al choque eléctrico y otros dos permanecieron dentro de uno de los compartimentos realizando movimientos muy bruscos, sin realizar ni evitaciones ni huidas; dos de ellos pertenecían al grupo VEH-SHUTTLE y dos al grupo MPH-SHUTTLE.

Respecto a los valores hormonales (**Figura 23**), solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los valores de ACTH obtenidos inmediatamente después de la exposición a la *Shuttle-box* del DÍA 1 ($t_{(30)} = 2.9$ $p < 0.01$), lo que nos indica una atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante, al igual que en el Experimento 3. No se hallaron diferencias entre los dos grupos en los niveles basales del DÍA 3 ni tras la re-exposición a la *Shuttle-box* del DÍA 8. Estos resultados no se modificaron (datos no mostrados) a pesar de introducir como covariancia el tiempo total de choque recibido que fue de (media±SEM) 92±15 seg para el grupo VEH/SHUTTLE y de 63±11 para el grupo MPH/SHUTTLE.

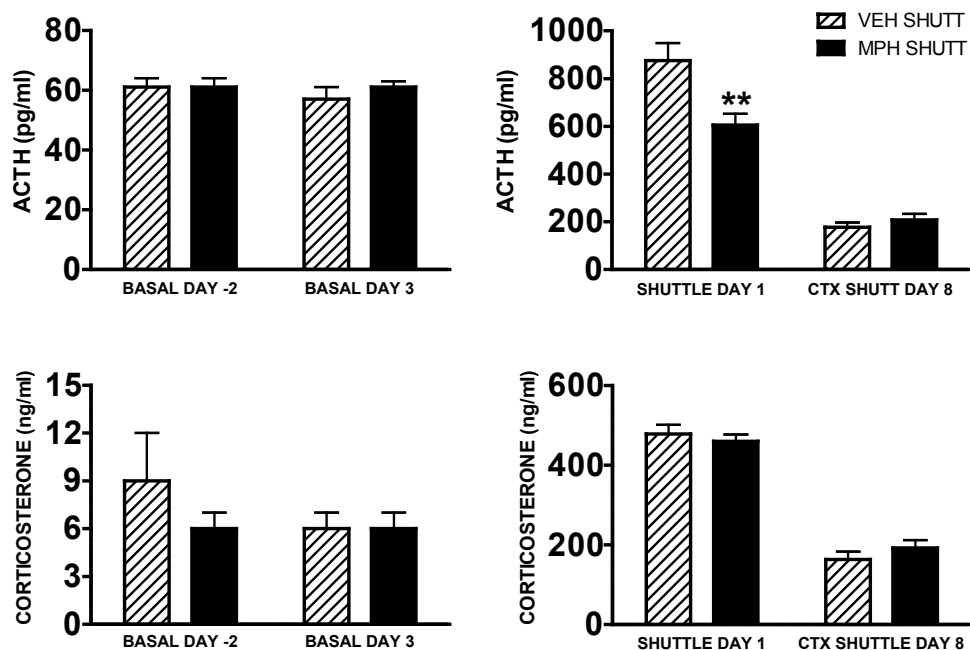


Figura 23. Respuesta de ACTH y corticosterona a la administración de vehículo o MPH combinada con una tarea de evitación-escape en la Shuttle-box (50 ensayos). Se representan los niveles basales dos días previos al estrés (BASAL DAY-2), los del DÍA 3 (posterior a la Shuttle-box), la respuesta a la Shuttle-box DÍA 1 y la respuesta a 15 min de re-exposición al contexto en el DÍA 8 (CTX-SHUTT). VEH-SHUTTLE ($n=16$) es el grupo administrado con salino; MPH-SHUTTLE ($n=16$) es el grupo inyectado con 1 mg/kg de MPH; ambos expuestos a la tarea en la Shuttle-box en el DÍA 1. Se representa la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs VEH-SHUTTLE.

Los resultados de las variables de conducta en la *Shuttle-box* del DÍA 1 (**Figura 24**) fueron evaluados mediante GEE con un factor entre-sujetos (MPH, dos niveles: con y sin la administración del fármaco) y un factor intra-sujetos (DINÁMICA, 5 niveles: 1º, 2º, 3º, 4º y 5º bloque de ensayos). El análisis estadístico (**Tabla 8**) mostró un efecto significativo del MPH para las **evitaciones** y para la **latencia de evitación**, lo que nos indica que los animales inyectados con el fármaco han realizado más respuestas condicionadas y en menos tiempo. Además, encontramos un efecto MPH para las **huidas**, lo que nos demuestra que los animales que recibieron el fármaco han huido menos. Para los **cruzamientos entre compartimentos inter-ensayos** hay efecto MPH y DINÁMICA, también una interacción MPH x DINÁMICA. Su descomposición nos indica que en el 2º, 3º y 4º bloque de ensayos, los sujetos administrados con MPH han realizado más cruzamientos entre ensayos. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en los cruzamientos entre compartimentos durante los 5 primeros min de exploración (*Habituation Changes*), ni en el número de respuestas nulas (*Null responses*) al evaluarlas con *t-Student*.

En conclusión, los animales expuestos a choque eléctrico que además recibieron 1 mg/kg de MPH exhiben mayor número de **evitaciones** y menor **tiempo de latencia** de evitación, esto es, aprenden más y más rápido a evitar el choque. A su vez, a partir del segundo bloque de estímulos, hacen menos **huidas**, probablemente por el aumento de evitaciones. También el **número de cruzamientos entre ensayos** es mayor en el grupo que recibió MPH. Es decir, el afrontamiento activo del choque eléctrico de los animales parece mejorar tras la administración de metilfenidato.

Realizamos también, para conocer mejor la relación entre las diferentes conductas, un estudio de Correlaciones de Pearson, para el número total de sujetos, entre **evitaciones** y **cruzamientos inter-ensayos totales** ($r_{(32)}=+0.83$, $p<0.001$), entre **evitaciones** y **cruzamientos inter-ensayos** en los tres primeros bloques de ensayos ($r_{(32)}=+0.637$, $p<0.001$) y para **evitaciones** y **cruzamientos inter-ensayos** en los dos últimos bloques de ensayos ($r_{(32)}=+0.92$, $p<0.001$). De igual manera, dividimos el estudio de las correlaciones en las correspondientes al grupo VEH-SHUTTLE ($r_{(16)}=+0.77$, $p<0.001$; $r_{(16)}=+0.61$ $p<0.001$ y $r_{(16)}=+0.74$, $p<0.001$ respectivamente) y al grupo MPH-SHUTTLE ($r_{(16)}=+0.80$, $p<0.001$; $r_{(16)}=+0.59$, $p<0.01$ y $r_{(16)}=+0.95$, $p<0.001$), no encontramos diferencias en la significación de las correlaciones entre ambos grupos experimentales.

VARIABLE	MPH		DINAMICA		MPH X DINAMICA	
	Wald $\chi^2(1)$	Sig	Wald $\chi^2(4)$	Sig	Wald $\chi^2(4)$	Sig
Conditioned Changes	4,1	<0,05	40,8	<0,001	1,7	NS
Conditioned Latency	5,4	<0,05	19,2	<0,001	5,7	NS
Unconditioned Changes	6	<0,05	17,4	<0,001	6,1	NS
Unconditioned Latency	3,4	NS	147,5	<0,001	2,3	NS
ITI Changes	4,5	<0,05	36,9	<0,001	11,7	<0,05
C+U Latency	5,4	<0,05	47,7	<0,001	8,3	NS

Tabla 8. GEE de la conducta en la Shuttle-Box del DIA 1 del Experimento 4

Por ultimo en la **Figura 25** podemos observar que no hay diferencias significativas ni en el **número de cruzamientos** (*Crossing*), ni en el **número de incorporaciones** (*Rearings*) durante los 5 primeros minutos de re-exposición al contexto en el DÍA 8. Por otro lado el tiempo de *freezing* de los animales expuestos al choque eléctrico es menor en los inyectados con MPH ($U=76.0$ $p<0.05$), sugiriendo que el fármaco reduce el condicionamiento del miedo al contexto. También analizamos el tiempo de *freezing* con un GzLM con un factor entre-sujetos (MPH), incluyendo o no el tiempo total de choque recibido como covarianza, sin encontrar diferencias entre ambos análisis (Wald $\chi^2(1)=3.7$ $p=0.053$).

SHUTTLE-BOX BEHAVIOR

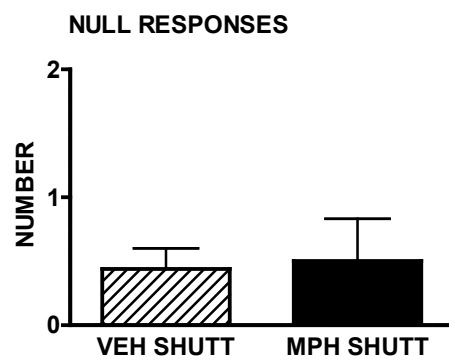
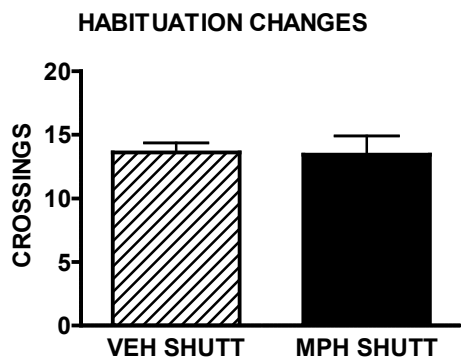
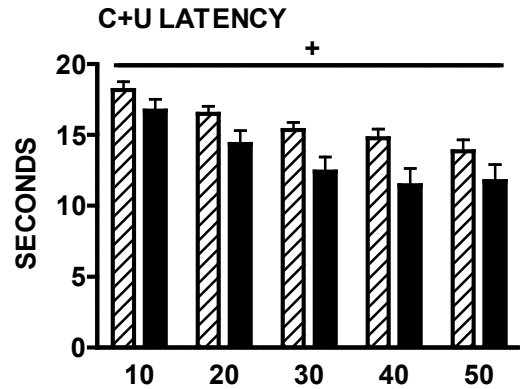
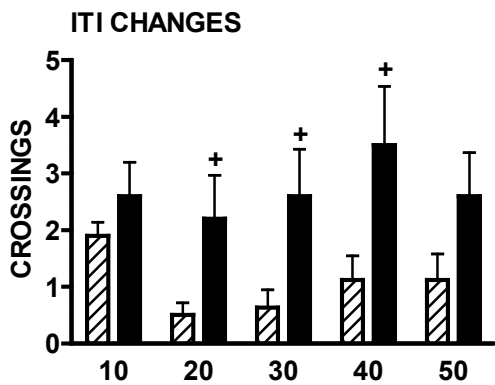
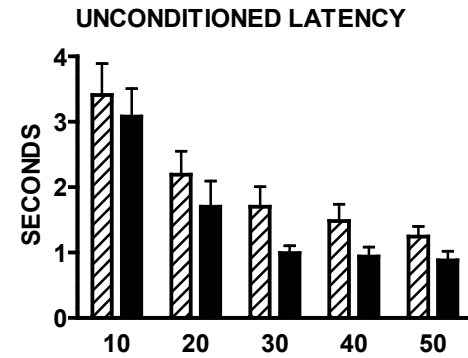
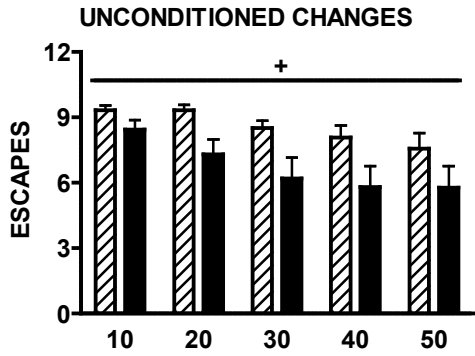
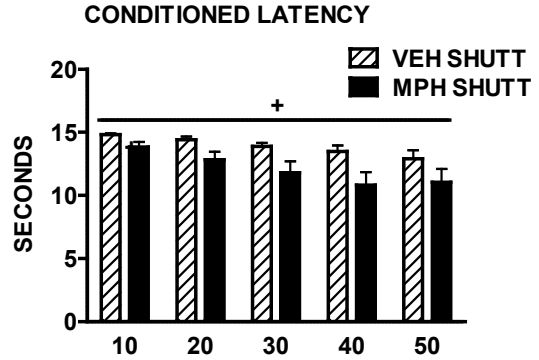
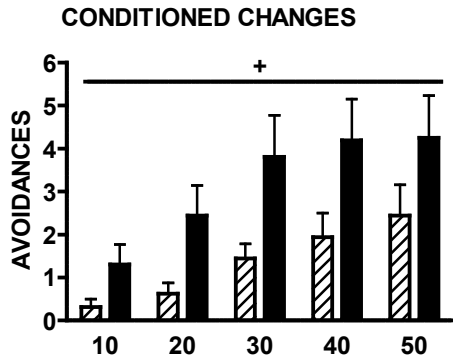


Figura 24 (página anterior). Respuesta de la conducta en la tara de evitación-escape tras la administración de vehículo o MPH. Variables: *CONDITIONED CHANGES* (respuestas condicionadas o evitaciones); *CONDITIONED LATENCY* (latencia de respuestas condicionadas); *UNCONDITIONED CHANGES* (respuestas incondicionadas o huidas); *UNCONDITIONED LATENCY* (latencia de respuestas incondicionadas); *ITI CHANGES* (cruzamientos entre los periodos inter-ensayos); *C+U LATENCY* (latencia total de respuestas condicionadas e incondicionadas); *HABITUATION CHANGES* (cruzamientos en los primeros 5 min de exploración previos a los 50 ensayos); *NULL RESPONSES* (respuestas nulas). Ver descripción grupos experimentales en la Figura 23. Se representa la media \pm SEM. + $p < 0.05$ vs VEH-SHUTTLE o factor global MPH.

RE-EXPOSURE TO THE SHUTTLE-CONTEXT

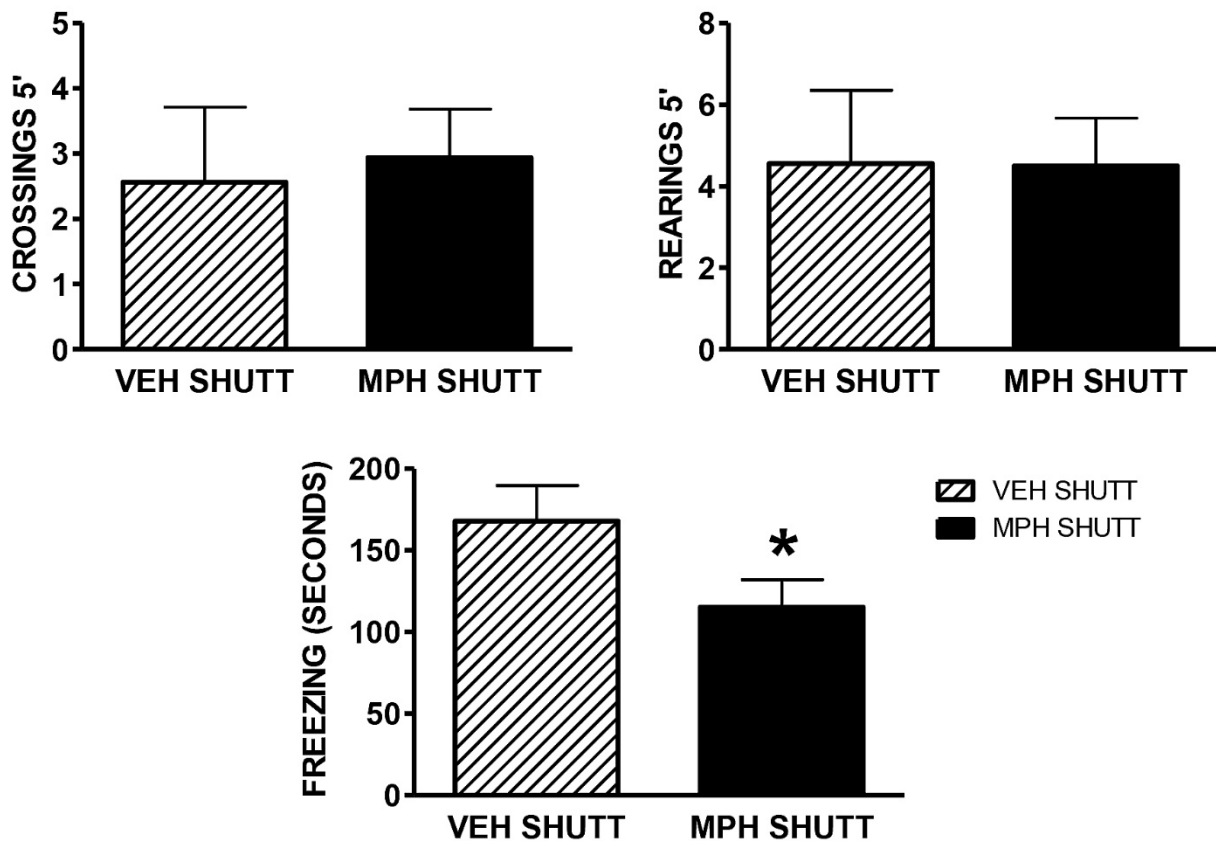


Figura 25. Respuesta de las variables de conducta analizadas durante los primeros 5 min de re-exposición a la Shuttle-box el DÍA 8: *CROSSING 5'* (número de cruzamientos); *REARING 5'* (número de rearings) y *FREEZING* (tiempo de inmovilidad). Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 23. Se representa la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs VEH-SHUTTLE.

Experimento 5: Efecto de la inyección de metilfenidato 30 minutos antes de la natación forzada sobre la respuesta periférica del eje HPA

En experimentos previos hemos confirmado la interacción entre estímulos estresantes emocionales (natación forzada y choque eléctrico) y dosis de MPH de uso terapéutico aplicados simultáneamente. Nos planteamos si la inyección de MPH previa (30 min antes de iniciada la exposición al estrés) sería capaz de atenuar la activación del eje HPA de animales expuestos a la natación forzada. Con tal propósito, se utilizaron 18 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH-SWIM, n=9 y MPH-SWIM, n=9. Después del tratamiento previo de habituación a los procedimientos experimentales, el DÍA 1 a los animales se les inyectó vehículo o MPH (1 mg/kg sc). Treinta min después se los expuso a natación forzada (30 min), extrayéndoles sangre al finalizar el estímulo estresante y tras 30 min de recuperación (R30). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa. El resumen del protocolo experimental se sintetiza en la **Tabla 9**.

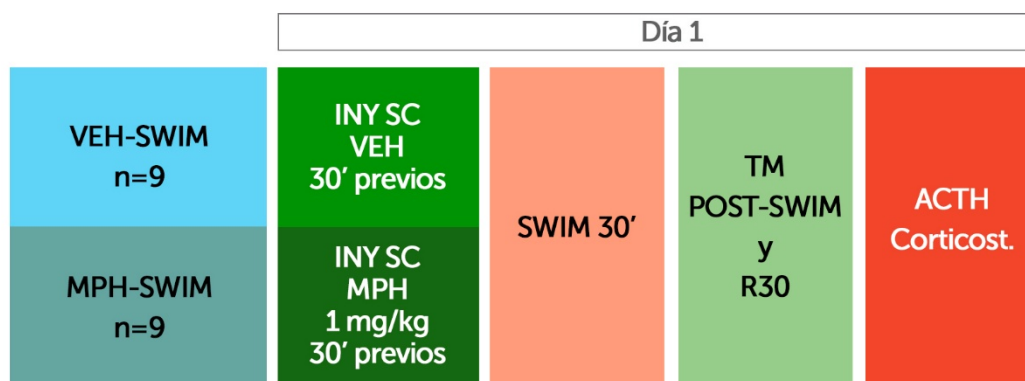


Tabla 9. Protocolo experimento 5

Los resultados de ACTH, corticosterona y glucosa se evaluaron mediante GEE con un factor inter-sujetos (MPH, dos niveles: con y sin la administración del fármaco) y un factor intra-sujetos (DINÁMICA, dos niveles: SWIM y R30).

Respecto a la ACTH (**Figura 26**), encontramos efectos significativo de MPH (Wald $X^2(1)=7.8$ $p<0.01$), DINÁMICA (Wald $X^2(1)=250.6$ $p<0.001$) y MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(1)=6.5$ $p<0.05$). La descomposición de la interacción nos indica que el grupo MPH-SWIM tiene valores de ACTH menores que el VEH-SWIM al acabar el estrés ($p<0.01$) y también en R30 ($p<0.05$). Estos resultados vuelven a mostrar la atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante emocional, al igual que sucediera con la inyección simultánea a la exposición al estímulo. Respecto a la corticosterona, solo se observa efecto del factor DINAMICA (Wald $X^2(1)=44.7$ $p<0.001$), reflejando que a R30 los valores de corticosterona son menores que al terminar el estímulo estresante, independientemente de la administración del fármaco.

Con la glucosa (**Figura 27**), se observan efectos de MPH (Wald $X^2(1)=9.2$ $p<0.01$), DINÁMICA (Wald $X^2(1)=58.3$ $p<0.001$) y MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(1)=8.1$ $p<0.01$). La descomposición de la interacción nos indica que al finalizar la exposición al estímulo estresante el grupo MPH-SWIM tiene valores menores que el VEH-SWIM ($P<0.001$) y algo similar ocurre en R30 ($p<0.01$).

Estos datos confirman que la inyección de MPH 30 min antes de la natación forzada atenúa la respuesta del eje SMA, al igual que sucediera con la inyección simultánea.

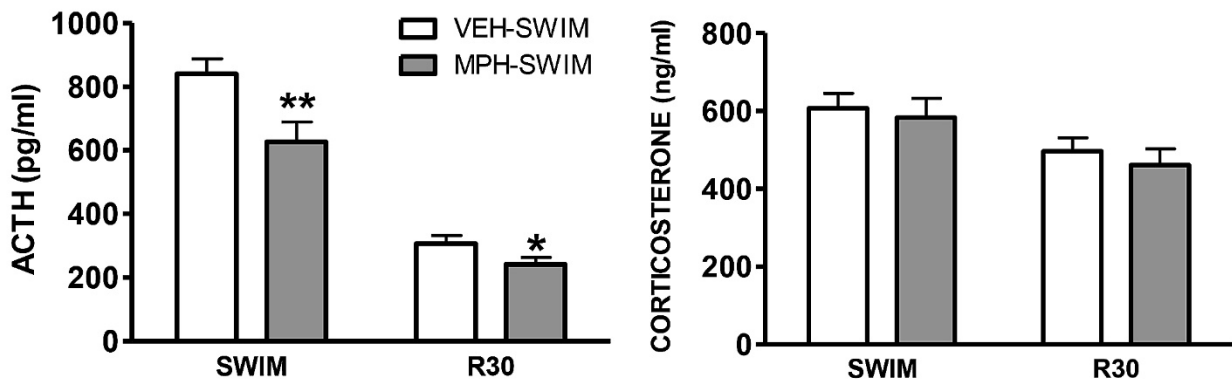


Figura 26. Respuesta de ACTH y corticosterona a la exposición a 30 min de natación forzada con/sin la administración (30 min antes) de 1 mg/kg de metilfenidato en el DÍA 1. VEH-SWIM (n=9) es el grupo administrado con salino 30 min antes de la exposición y MPH-SWIM (n=9) es el administrado con 1 mg/kg de MPH. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 la recuperación 30 min después. Se muestra la media ± SEM. ** p<0.01 y * p<0.05 vs VEH-SWIM. No se muestra el efecto DINÁMICA.

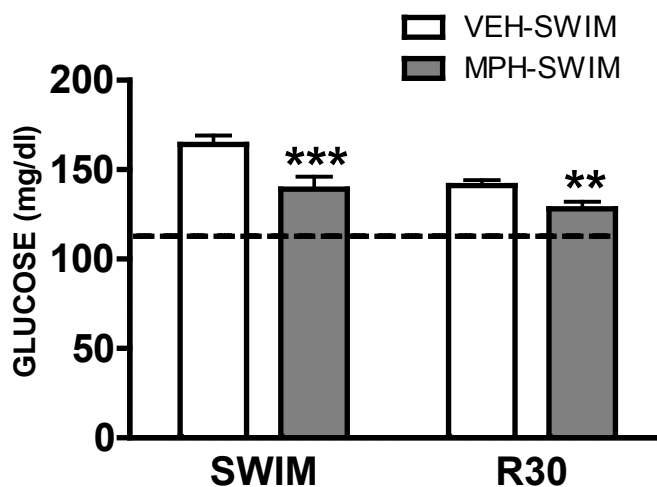


Figura 27. Respuesta de glucosa a la exposición a 30 min de natación forzada con/sin la administración (30 min antes) de 1 mg/kg de MPH en el DÍA 1. Ver descripción de grupos experimentales en la Figura 26. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 la recuperación 30 min después. Se muestra la media ± SEM. *** p<0.001 y ** p<0.01 vs VEH-SWIM. No se muestra el efecto DINÁMICA. La línea de puntos discontinua representa los valores basales obtenidos un día previo al DÍA 1 experimental.

Experimento 6: Influencia de la edad en la interacción metilfenidato-estrés

Considerando que en humanos el MPH se utiliza sobre todo para el tratamiento del TDAH en niños/adolescentes, decidimos realizar un experimento comparando SD adultas y juveniles. Dado el objetivo de este experimento, no incluimos los grupos VEH-HOME o MPH-HOME, teniendo en cuenta por los experimentos anteriores, que el MPH por sí solo no estimula el eje HPA.

Se utilizaron 20 ratas adultas (64 ± 1 días) y 20 ratas juveniles (29 ± 1 días), distribuidas en los siguientes grupos: VEH-YOUNG, $n=10$; MPH-YOUNG, $n=10$; VEH-ADULT, $n=10$ y MPH-ADULT, $n=10$. Se inyectó a los animales con vehículo o con 1 mg/kg de MPH vía sc e inmediatamente fueron expuestos a 30 min de natación forzada a 36°C . Se estudió la dinámica temporal de la respuesta con extracciones de sangre al final del estrés y a los 30 y 60 min posteriores (R30 y R60). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa. En la **Tabla 10** se resume el protocolo experimental.



Tabla 10. Protocolo experimento 6

Se evaluaron los resultados de para ACTH y corticosterona con un GEE con 2 factores inter-sujetos (EDAD, dos niveles: adultos y juveniles y MPH, dos niveles: vehículo y MPH) y un factor intra-sujeto: DINÁMICA (tres niveles: SWIM, R30 y R60). Para la glucosa se utilizó un GEE con iguales factores inter-sujetos y un factor intra-sujeto: DINÁMICA (dos niveles: SWIM y R60).

Respecto a la ACTH (**Figura 28**), el GEE indica un efecto EDAD (Wald $X^2(1)=4.9$ $p<0.05$), MPH (Wald $X^2(1)=36.8$ $p<0.001$) y DINÁMICA (Wald $X^2(2)=661.1$ $p<0.001$). Son asimismo estadísticamente significativas las interacciones EDAD x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=20.1$ $p<0.001$) y MPH x DINÁMICA (Wald $X^2(2)=42.8$ $p<0.001$), pero no la interacción EDAD x MPH, ni la triple interacción EDAD x MPH x DINÁMICA. Puesto que son significativas las interacciones EDAD x DINÁMICA y MPH x DINÁMICA, la correcta interpretación de los resultados hace necesaria las comparaciones a *posteriori* de las medias más relevantes. Podemos observar que inmediatamente después del estímulo estresante (SWIM) el grupo MPH-YOUNG tiene valores de ACTH menores que VEH-YOUNG, al igual que MPH-ADULT vs VEH ADULT ($p<0.001$ en ambos casos). Además el grupo MPH-ADULT tiene valores menores que MPH-YOUNG ($p<0.001$). En R30 los dos grupos con el fármaco muestran valores menores que los grupos con vehículo ($p<0.05$ y $p<0.001$ respectivamente) y los adultos tratados con el fármaco tienen nuevamente menores valores que los jóvenes con el mismo tratamiento ($p<0.01$). En R60 solamente el

grupo MPH-ADULT tiene valores menores que el grupo VEH-ADULT ($p < 0.001$). Se confirma de esta manera la atenuación de la respuesta del eje HPA por el fármaco tanto en ratas adultas como en juveniles, siendo la atenuación en ratas adultas mayor que en juveniles.

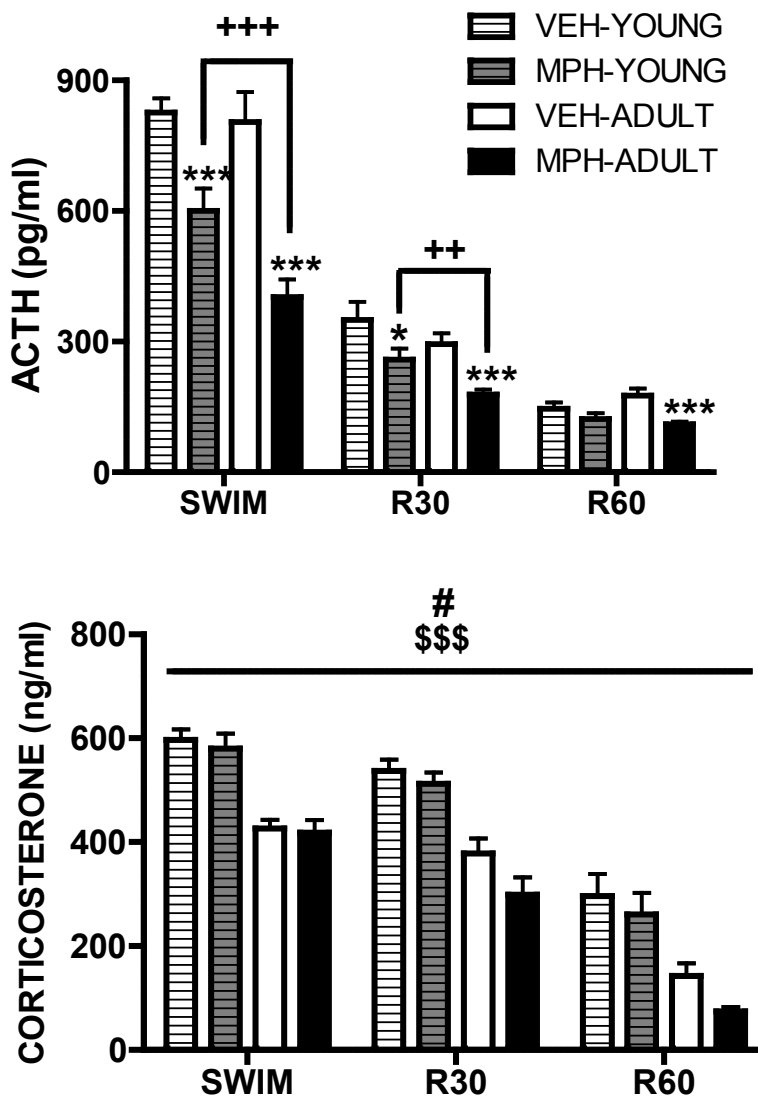


Figura 28. Respuesta de la ACTH y corticosterona a la administración de MPH combinada con 30 min de natación forzada en ratas SD adultas y juveniles. VEH-YOUNG ($n=10$) es el grupo juvenil inyectado con salino; MPH-YOUNG ($n=10$) es el grupo juvenil inyectado con 1 mg/kg de MPH; VEH-ADULT ($n=10$) es el grupo adulto inyectado con salino; MPH-ADULT ($n=10$) es el grupo adulto inyectado con 1 mg/kg de MPH. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 las tomadas a los 30 y 60 min de finalizado en nado. Se representa la media \pm SEM. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs su respectivo control sin fármaco; +++ $p < 0.001$ y ++ $p < 0.01$ vs MPH-YOUNG; \$\$\$ $p < 0.001$ (efecto global edad), # $p < 0.05$ (efecto global MPH).

El análisis de los resultados de la corticosterona (Figura 28), señala efecto EDAD (Wald $X^2(1)=99.6$ $p < 0.001$), MPH (Wald $X^2(1)=4.9$ $p < 0.05$) y DINÁMICA (Wald $X^2(2)=304.8$ $p < 0.001$). No alcanzó significación ninguna de las interacciones. Los efectos principales reflejan

que: (i) los niveles de corticosterona ante un estímulo estresante emocional son menores en adultos que en juveniles; (ii) los animales inyectados con MPH muestran menores niveles de corticosterona que los inyectados con vehículo (efecto global MPH, independientemente de la edad); y (iii) la recuperación progresiva de los niveles basales de corticosterona en la fase post-estrés. En resumen la atenuación inducida por el MPH se observa en la corticosterona tanto en jóvenes como en adultos.

Respecto a la glucosa (**Figura 29**), se analizaron los niveles inmediatamente posteriores al nado pero también en R60 para ver si había diferencias en la dinámica de recuperación entre jóvenes y adultos. El GEE muestra solo efecto estadísticamente significativo de MPH (Wald $X^2(1)=6.7$ $p<0.01$), pero no de la EDAD ni de la DINÁMICA, como así tampoco de ninguna interacción. (**Figura 29**). El efecto MPH indica que, independientemente de la edad y la dinámica, el fármaco disminuye los niveles de glucosa respecto al grupo inyectado con vehículo.

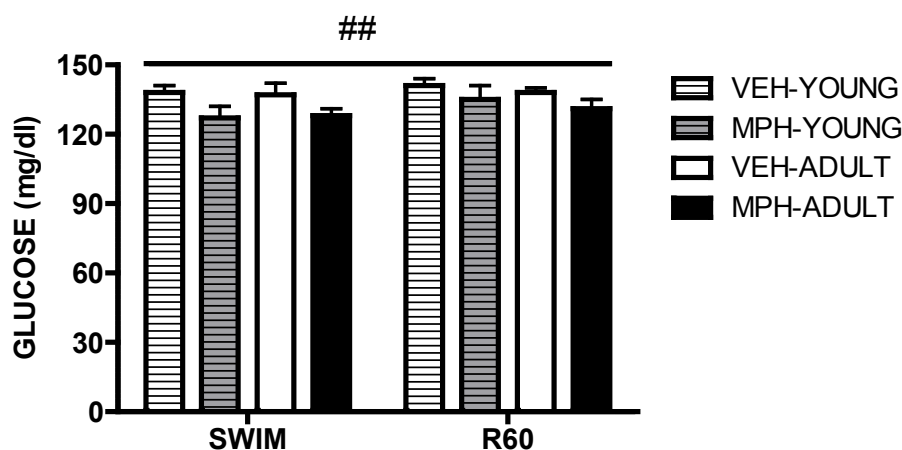


Figura 29. Respuesta de la glucosa a la administración de MPH combinada con 30 min de natación forzada en ratas SD adultas y juveniles. Ver descripción de los grupos experimentales en la Figura 28. SWIM es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R60 la tomada a los 60 min de finalizado en nado. Se representa la media \pm SEM. ## $p<0.01$ (efecto global MPH).

En conclusión, la atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante emocional como la natación forzada en ratas SD se da tanto en la edad adulta como en la juvenil y lo mismo sucede con la atenuación de la respuesta del eje SMA.

Discusión

Datos previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto una interacción negativa entre AMPH y estímulos estresantes de naturaleza diferente como la IMO, la natación forzada y la inyección de IL-1 β . La AMPH estimuló los niveles de hormonas del eje HPA sin aumentar los niveles de glucosa, pero administrada simultáneamente con la exposición a los estímulos estresantes redujo el aumento de los niveles periféricos de las hormonas del eje HPA y la hiperglicemia provocados por la exposición a los mismos. También se puso de manifiesto un bloqueo de la expresión del gen del CRF a nivel del PVN (Gómez-Román et al, 2016). Además, la AMPH disminuyó la expresión de *c-fos* inducida por el estrés en áreas críticas para el procesamiento de estímulos estresantes como el PVN, el LS y la PFC, aunque no así en la MeA, AcbSh o CPuDL donde se observa un efecto sumatorio, o en CPuVL donde se evidencia una sinergia positiva (Gómez-Román, 2011). Para ampliar nuestro conocimiento de la interacción entre psicoestimulantes y estímulos estresantes, iniciamos nuestro trabajo de Tesis con un estudio dosis-respuesta de la interacción AMPH-estrés, incluyendo la respuesta durante el período de recuperación posterior a la finalización del estrés (natación forzada).

Tras realizar este estudio, nos hemos centrado en la caracterización de la respuesta fisiológica a dos estímulos estresantes emocionales (natación forzada y choque eléctrico) bajo los efectos de otro psicoestimulante como el MPH a dosis de uso farmacológico para el tratamiento del TDAH. Hemos utilizado como variables a nivel periférico, la activación del eje HPA (niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona) junto a otros marcadores de estrés (niveles plasmáticos de PRL y glucosa), y a nivel central, la expresión del gen de CRF en el PVN por su implicación directa en el eje HPA y la expresión de *c-fos* como índice de activación del SNC. Las hormonas del eje HPA se elevan frente a situaciones estresantes tanto de tipo sistémico como emocional (Armario et al, 2012) y también ante la administración de estimulantes del SNC como AMPH (Rotlant et al, 2007; Gagliano et al, 2009) o cocaína (Borowsky y Kuhn, 1991). Nuestros resultados demuestran una importante interacción negativa entre los efectos del estrés y la administración de dosis de uso terapéutico de MPH, a pesar de que éste por sí mismo no active a esas dosis, el eje HPA. El hecho de que la respuesta al estrés puede modificarse sustancialmente por la exposición a los estímulos emocionales bajo el efecto del MPH, plantea interesantes interrogantes respecto a los beneficios que ésta interacción pueda tener sobre las posibles consecuencias negativas y patológicas de la exposición al estrés en los pacientes con TDAH tratados con el fármaco.

Por otro lado, la exposición a estímulos estresantes emocionales da lugar a cambios conductuales y cognitivos. En el presente trabajo hemos estudiado también como algunas de esas respuestas podrían ser más apropiadas cuando el estímulo estresante se presenta conjuntamente con la administración del fármaco, dando lugar a un mejor afrontamiento de la situación y una mayor capacidad de aprendizaje.

1. Importancia de la dosis en la interacción entre anfetamina y estrés (*Experimento 0*)

El experimento se diseñó para estudiar como interactuaban diferentes dosis de AMPH, dentro de un rango alcanzable en experimentos de autoadministración, con el estrés por natación forzada respecto a la respuesta de las hormonas del eje HPA y la glucosa.

La AMPH por sí misma fue capaz de incrementar de forma dosis-dependiente la liberación de ACTH y corticosterona, siendo el efecto modesto con la dosis más baja de 1 mg/kg. Estos resultados son concordantes con los obtenidos previamente (Knych y Eisenberg, 1979; Swerdlow et al, 1993; Schmidt et al, 1999; 2001; Vanderschuren et al, 1999; Russig et al 2003; Rotllant et al, 2007), en los cuales también se puso de manifiesto que la activación del eje HPA por la AMPH venía ligada a la liberación de CRF (Knych y Eisenberg, 1979. Swerdlow et al, 1993). La estimulación causada por la AMPH es relativamente prolongada y ni siquiera con la dosis más baja los niveles de ACTH vuelven a los niveles controles a los 90 min de la administración. Los niveles de corticosterona aumentan a los 30 min de la inyección y muestran niveles máximos con 2 y 4 mg/kg, aunque siempre son menores a los valores inducidos por la natación forzada. No obstante esta menor respuesta inicial, los niveles de ACTH posteriores a la exposición a la natación forzada se recuperan rápidamente, en tanto que la respuesta a la AMPH se mantiene durante los primeros 60 min posteriores a la administración, para comenzar un descenso después, de acuerdo con resultados previos (Rotllant et al., 2007; Gagliano et al, 2009). El mismo comportamiento se observa con los niveles de corticosterona, en tanto que dichos niveles fueron decreciendo progresivamente tras la exposición a la natación forzada, pero se mantuvieron durante 90 min tras la inyección de las dosis más altas de AMPH.

Es importante tener en cuenta que los niveles máximos de corticosterona tras la administración de AMPH estuvieron siempre por debajo de los 250 ng/ml, mientras que se alcanzaron niveles de alrededor de 330 ng/ml en los grupos AMPH-SWIM, incluso en aquellas condiciones en las cuales los niveles de ACTH eran similares. Por lo tanto, parece que la proporción corticosterona/ACTH es más baja tras AMPH que tras AMP-SWIM. Esta desproporción se hace más patente cuando se mira a las AUCs, observándose que con todas las dosis de AMPH, las AUCs de la corticosterona fueron inferiores a las observadas tras la exposición simultánea a AMPH y natación forzada a pesar de obtenerse AUCs de ACTH similares o incluso inferiores en los primeros que en los últimos grupos.

Disociación entre ambas hormonas se ha encontrado en ratas bajo ciertas condiciones, como durante la fase activa del ritmo circadiano (Dallman et al, 1978; Ulrich-Lai et al, 2006), la privación de agua (Ulrich-lai y Engeland, 2002) o las exposiciones prolongadas (horas) a estímulos estresantes (Hauger et al, 1988; Rivier y Vale, 1987). Se ha propuesto repetidamente que esta disociación podría explicarse por la inervación simpática directa de la glándula adrenal que normalmente aumenta la respuesta adrenal a la ACTH circulante (Edwards y Jones, 1993). La AMPH podría actuar dentro del cerebro modificando (en este caso específico reduciendo) la respuesta de la adrenal a la ACTH. El efecto de la AMPH podría afectar a la sensibilidad de la adrenal a la ACTH circulante o a su máxima respuesta. Considerando que los cambios en la sensibilidad a la ACTH no deberían alterar la respuesta máxima de la adrenal a la AMPH y que los niveles de ACTH observados en este experimento tras la inyección de AMPH o tras la exposición a la natación forzada son suficientes como para estimular al máximo la adrenal (Armario et al, 2012), lo más probable es que la AMPH esté reduciendo la respuesta máxima de la glándula adrenal. Sin embargo, los mecanismos precisos han de ser aún caracterizados.

Cuando los animales se expusieron simultáneamente a la AMPH y a la natación forzada, se observó una inhibición parcial o total (cuando el grupo de referencia era el inyectado solo con AMPH) de la respuesta de la ACTH. Estos resultados confirman otros recientes de nuestro laboratorio demostrando que la droga reduce la inducción de *c-fos* y la expresión de CRF en el PVN (Gomez-Román et al, 2016). Por el contrario, los niveles de corticosterona no se vieron afectados, probablemente porque los niveles de ACTH alcanzados fueron suficientes para mantener una estimulación máxima de la adrenal.

Ninguna de las tres dosis de AMPH aumentó los niveles de glucosa a los 30 min de su inyección, aunque los aumentara modestamente a los 60 y 90 min. Por otro lado, la exposición a 30 min de natación forzada aumentó al finalizar la exposición al estímulo estresante los niveles de glucosa significativamente en comparación con los animales no estresados, si bien este aumento no es de la misma magnitud que los provocados por otros estímulos estresantes más intensos como la IMO (Rabasa et al, 2011). La hiperglucemia parece reflejar los niveles de liberación de adrenalina (Armario et al, 2012), sugiriendo una activación del eje SMA que solo podría ser corroborada con la medida en plasma de A y NA en ratas canuladas, lo que implicaría condiciones adicionales de estrés. Lo más interesante es que la hiperglucemia provocada por la exposición a la natación forzada es atenuada por las tres dosis de AMPH en cualquiera de los tres tiempos evaluados. De hecho, los niveles plasmáticos de glucosa tras la exposición al estímulo estresante en la ratas inyectadas con AMPH son menores que los valores de las ratas no expuestas al estímulo estresante. Este descenso no pueden ser solo consecuencia de un alto consumo de energía asociado a la actividad exacerbada causada durante la exposición al estímulo, porque esto se da solo en los animales expuestos al estímulo conjuntamente con la droga y no al comparar los animales expuestos al estímulo estresante conjuntamente con el vehículo. Demostramos por lo tanto, una interacción negativa entre la AMPH y la natación forzada también a nivel del eje SMA.

En tanto se observó una clara reducción de la repuesta de la ACTH inmediatamente después de finalizada la exposición al estrés, en el período post-estrés, fue la exposición a la natación forzada la que disminuyó los niveles de ACTH provocados por la dosis mayor de AMPH. Por lo tanto, mientras que durante la exposición al estímulo estresante, la AMPH inhibe la respuesta del eje HPA a la natación forzada, en el período post-estrés hay un efecto inhibitorio del estrés previo sobre la respuesta de ACTH (y en menor medida sobre la de corticosterona) a la AMPH. Estos resultados indican que la exposición a la natación forzada afecta negativamente a la respuesta del eje HPA a dosis altas de AMPH, sugiriendo una interacción negativa bidireccional entre ambos estímulos. Hay tres posibles explicaciones al porqué el efecto inhibitorio del nado sobre la respuesta a la AMPH se ve solo al finalizar el estímulo estresante: (i) se requeriría un tiempo para que la exposición al nado pudiera ejercer este efecto inhibitorio; (ii) el efecto inhibitorio podría afectar específicamente a la liberación de los animales de la situación estresante y (iii) la mutua inhibición entre estrés y AMPH podría ya haber estado presente durante la exposición inicial, pero sólo puede observarse cuando hay bajos niveles de ACTH inducidos por el nado asociado a altos niveles inducidos por la AMPH.

El efecto inhibitorio del estrés sobre la respuesta del eje HPA a la AMPH viene apoyado por datos de la literatura que han demostrado, utilizando la expresión de IEGs (*c-fos*, *zif268*), que distintos

tipos de estímulos estresantes emocionales (campo abierto, ruido o *restraint*) disminuyen la activación de la CeA y BST (subdivisión oval) provocada por la AMPH (Day et al, 2001; 2005; 2008). Aunque no hay evidencias consistentes respecto a un papel de la CeA en la activación del eje HPA inducida por la AMPH, la inhibición de esta área por la exposición simultánea a AMPH y estrés sugiere que ciertas respuestas a la AMPH (ya sea la repuesta del eje HPA u otras) podrían reducirse cuando los animales están bajo una situación estresante. Es importante recalcar que en otras áreas cerebrales no se ha observado interacción negativa o incluso se evidencia sinergia positiva entre AMPH y estrés en términos de expresión de *c-fos* o de actividad motora (Badiani et al, 1998; Day et al, 2001, 2005; Uslaner et al, 2001a; Ostrander et al, 2003). En conjunto, los datos sugieren que la interacción entre estrés y psicoestimulantes es más compleja de lo que se ha asumido previamente y puede afectar de forma distinta a diferentes aspectos fisiológicos o conductuales.

Los mecanismos neuroquímicos involucrados en la interacción entre AMPH y estrés son desconocidos. Se ha sugerido repetidamente que las monoaminas están involucradas en la activación del eje HPA, aunque no hay evidencias directas respecto a estímulos estresantes predominantemente emocionales, excepto para el mantenimiento de los niveles de ACTH post-estrés como la inmovilización en tabla (Belda et al, 2009). Datos previos de nuestro laboratorio (Rotllant, Nadal y Armario, no publicados) demuestran inhibición de neuronas del locus coeruleus inducidas por el estrés. La activación del eje HPA inducida por la AMPH se disminuye por el bloqueo de receptores serotoninérgicos pero no por el bloqueo adrenérgico (Knych y Eisenberg, 1979). Por otro lado, el papel de drogas dopaminérgicas sobre la liberación de ACTH inducida por la AMPH no ha sido estudiado, aunque algunas evidencias indican que la DA está involucrada en la activación del eje HPA inducida por la cocaína (Borowsky y Kun, 1991; Ikemoto y Goeders, 1998). La posible contribución del sistema dopaminérgico a la interacción entre AMPH y estrés merece ser estudiada en más detalle.

Los resultados obtenidos tienen implicación respecto a la acción terapéutica de la AMPH en el TDAH. Es posible que la AMPH no solo ejerza efectos beneficiosos sobre el comportamiento sino que también proteja de los efectos del estrés, especialmente teniendo en cuenta que la dosis más baja puede estar cercana a las terapéuticas. Dosis de alrededor de 0,5 mg/kg se usan en el tratamiento (v.g. Pelham et al, 1999) y ésta se correspondería con dosis de unos 3 mg/kg en ratas cuando se calcula la dosis biológicamente equivalente (Reagan-Shaw et al, 2008).

2. Interacción entre metilfenidato y natación forzada a nivel periférico (Experimento 1)

No existen datos en la literatura respecto a la activación del eje HPA con la administración aguda de MPH en modelos animales, aunque en humanos se ha observado activación (Joyce et al, 1986). Por ello, decidimos utilizar dos dosis dentro del rango más utilizado (0.5 y 2 mg/kg, sc) y comprobar si existía o no activación del eje HPA. Pero el objetivo fundamental del experimento fue estudiar si el MPH, como la AMPH, era capaz de inhibir la respuesta periférica del eje HPA y la glucosa a un estímulo estresante emocional de moderada intensidad como la natación forzada. Este estímulo estresante nos permitía valorar también la influencia del fármaco sobre las estrategias de afrontamiento de los animales.

Ninguna de las dosis de MPH utilizadas activa el eje HPA a nivel periférico, como podemos deducir de los niveles de ACTH y corticosterona, que no difieren, en ninguno de los tiempos estudiados, de los observados tras la administración de solución salina. La administración de 0.5 o 2 mg/kg de MPH tampoco aumentó los niveles de glucosa a los 30 min de la inyección, lo que sugiere que el fármaco tampoco es capaz de activar, al menos de forma notable, el eje SMA. Otros autores ya han observado que la administración de MPH no afecta los niveles de glucosa ni en rata (Schmidt, 1979), ni en humanos (Matochik et al, 1994). Por otro lado, ambas dosis del fármaco disminuyeron los niveles de PRL a los 30 min de la administración, de acuerdo con resultados previos (Demarest et al, 1984). El efecto bloqueante del transportador de DA (Han y Gu, 2006) elevaría los niveles de este neurotransmisor en el sistema portal, con la consiguiente inhibición de la liberación de PRL. También el tratamiento crónico en ratas SD en desarrollo con MPH (1-100 mg/kg) disminuye los niveles de PRL, pero esos niveles se normalizan inmediatamente después de suspendido el tratamiento (Greeley y Kizer, 1980), sugiriendo un efecto mayoritario agudo y dependiente de la presencia del fármaco.

La activación del eje HPA disminuye rápidamente una vez finalizada la exposición a la situación estresante, aunque esta recuperación de los niveles pre-estrés es tanto más lenta cuanto mayor es la intensidad del estímulo estresante (Garcia et al, 2000). En lo que respecta a la natación forzada, los niveles de ACTH disminuyen claramente a los 30 min y más aún a los 60 min, siendo la recuperación de los niveles basales de corticosterona mucho más lenta (Dal-Zotto et al, 2000).

La administración de las dos dosis de MPH es capaz de reducir la respuesta de la ACTH a la natación forzada, notándose el efecto no solo inmediatamente después de la exposición al estrés sino también en el período post-estrés. La dosis del fármaco tiene poco efecto, aunque se observa un efecto ligeramente superior de la dosis más alta (2 mg/kg) en el período R60. Es posible que el efecto del MPH sea ya casi máximo con la dosis más baja y que dosis aún menores podrían ser también eficaces. Por consiguiente, demostramos por primera vez una interacción negativa entre un estímulo estresante emocional moderado y dosis de uso farmacológico de MPH. En contraste con el efecto evidente del MPH sobre la respuesta de la ACTH, apenas se observa efecto en la respuesta de la corticosterona, aunque el efecto es en la dirección esperada. Cuando se tienen en consideración la respuesta global de ambas hormonas mediante las AUCs, las conclusiones son similares. Parece por lo tanto que, como ocurre con la AMPH, la reducción de la respuesta de la ACTH no es de suficiente magnitud como para reducir los niveles de corticosterona de forma notable.

La hiperglucemia causada por la exposición a la natación forzada también se reduce tras la administración 0.5 mg/kg de MPH y el efecto es aún mayor con la dosis de 2 mg/kg, lo que sugiere que el MPH está también inhibiendo la activación del eje SMA de forma dosis dependiente.

Los niveles de PRL aumentan significativamente tras la exposición a estímulos estresantes como la IMO (Belda et al, 2015) o la natación forzada (Armario et al, 1995), hecho confirmado en el presente experimento. La liberación de PRL por el estrés se ve amortiguada por la administración de 0.5 mg/kg de MPH y aún más por la de 2 mg/kg. Aunque podríamos interpretar estos datos como un apoyo a la hipótesis de que el MPH reduce muchas de las respuestas fisiológica al estrés,

es importante tener en cuenta que la inhibición de la respuesta de la PRL al estrés podría ser consecuencia de un efecto farmacológico muy específico del fármaco sobre el sistema dopaminérgico y no tanto un efecto sobre los circuitos nerviosos que regulan la respuesta de la PRL al estrés. Tanto si la activación de la secreción de PRL por el estrés es consecuencia de una inhibición de la liberación de DA al sistema portal-hipofisario como si están implicados PRFs (Gratan, 2015), el incremento en el tono dopaminérgico debido a la inhibición de la recaptación de DA causada por el MPH estaría ejerciendo un efecto inhibitorio de la estimulación de PRL.

Los resultados de la conducta en la prueba de natación forzada nos indican que la administración de MPH favorece las conductas activas. Durante los primeros 5 min de evaluación de la inmovilidad, sólo los que fueron inyectados con la dosis mayor permanecieron menos tiempo inmóviles que los vehículos. En cambio durante los 5 min intermedios y los 5 min finales de la evaluación, las dos dosis del fármaco disminuyeron la inmovilidad, siendo el efecto dependiente de la dosis. Por otro lado, la evaluación de la natación suave nos indica, especialmente en los 5 min intermedios y los 5 finales, que los animales administrados con MPH realizan más natación suave, con más efecto de la dosis más alta. En cambio, solo la dosis más alta de MPH incrementó los niveles de escape, que reflejan una actividad más intensa. Solo hemos podido identificar un estudio en ratones en el cuál dosis de MPH de 0,3 o 1 mg/kg fueron incapaces de modificar la conducta de natación forzada (Noda et al, 2000), pero se ha de tener en cuenta que la dosis equivalente para un ratón es superior a la de rata y eso puede explicar las discrepancias. El efecto del MPH sobre la natación forzada que hemos observado es compatible con los obtenidos tras la administración de AMPH (Porsolt et al, 1977; Duncan et al, 1985; Gómez-Román et al, 2016) y con otros inhibidores de la recaptación de DA y NA (v.g. Porsolt et al, 1977; Hemby et al, 1997; Cryan et al, 2005). Es importante destacar que el incremento de la conducta activa causada por el MPH es muy improbable que sea consecuencia de un incremento no específico de la actividad motora, que no se observa a las dosis utilizadas en este experimento.

3. Interacción entre el metilfenidato y la natación forzada a nivel central (*Experimento 2*)

Los resultados precedentes indican que la administración de MPH simultáneamente a la exposición al estrés reduce la respuesta fisiológica a este último. Aunque no puede descartarse la posibilidad de que el efecto tenga lugar a nivel periférico, teniendo en cuenta los antecedentes de la AMPH (Gómez-Román et al, 2011, 2016), es muy probable que este efecto se sitúe a nivel de SNC. Al objeto de identificar posibles áreas del SNC implicadas en la interacción MPH-estrés, llevamos a cabo un experimento en el que los animales fueron administrados con una dosis de 0,5 mg/Kg de MPH e inmediatamente expuestos a 30 min de natación forzada. Transcurrido este tiempo, los encéfalos se procesaron para cuantificar la expresión del gen del CRF en el PVN y la expresión de *c-fos* como índice de activación neuronal en áreas críticas.

La administración de MPH no alteró los niveles de hnRNA para el CRF. Puesto que la sonda intrónica es extremadamente sensible para detectar cambios transitorios en la expresión del gen del CRF (Herman et al, 1992; Imaki et al, 1995; Kovacs and Sawcenko, 1996), podemos concluir que el MPH no parece activar las neuronas de CRF del PVN, de acuerdo con la ausencia de efectos sobre los niveles circulantes de ACTH y corticosterona ya descritos en experimentos previos.

Esta posibilidad viene apoyada por la falta de efecto del MPH para inducir la expresión de *c-fos* en el PVN. En cambio, la exposición a la natación forzada en presencia de MPH bloqueó completamente el incremento en la expresión del CRF causada por el estímulo estresante, dando apoyo a la posibilidad de que los efectos del MPH sobre el eje HPA se sitúan a nivel central. Los resultados son similares a los obtenidos con la administración de AMPH (Gómez-Román et al, 2016). Para localizar posibles áreas de interacción entre MPH y estrés a niveles distales al PVN, se analizó la expresión de *c-fos*. Tanto el MPH *per se* como la exposición al nado inducen la expresión de *c-fos* en diversas áreas.

La natación forzada indujo un nivel importante de expresión de *c-fos* en las distintas subdivisiones de mPFC (Cg1, PrL e IL), de estriado dorsal (CPuDM, CPuDL, CPuVM y CPuVL), núcleo accumbens (*core* y *shell*), LSv, MeA and PVN. Estos resultados están básicamente de acuerdo con estudios previos utilizando la misma situación estresante (Cullinan et al, 1995; Ons et al, 2004), aunque hay algunas diferencias en cuanto a la intensidad de la activación y no se han hecho estudios tan detallados en áreas como CPu.

El MPH indujo activación de *c-fos* en Cg1 y PrL (pero no IL), en todas las subdivisiones de CPu, en AcbC y AcbSh, pero no en áreas que típicamente se activan con estrés como LSV o PVN. Además, tan solo causó una modesta activación de la subdivisión postero-ventral de la MeA (MeApv), pero no de MeA en conjunto. La comparación de nuestros resultados con datos previos es difícil dado que en general se han utilizado dosis considerablemente superiores de MPH. En cualquier caso, varios autores han descrito un aumento de la expresión de *c-fos* a nivel de PFC con la administración de dosis altas de MPH (2-20 mg/kg) (Penner et al, 2002; Chase et al, 2005; Allen et al, 2010). También se ha descrito de forma consistente aumento de la expresión de *c-fos* a nivel del CPu con la administración de dosis generalmente altas (2-40 mg/kg) (Penner et al, 2002; Brandon y Steiner, 2003; Trinh et al, 2003; Hawken et al, 2004; Yano y Steiner, 2005). El efecto en CPu es dosis-dependiente con dosis entre 2-10 mg/kg (Hawken et al, 2004), pero los resultados con 2 mg/kg no son consistentes y las dosis inferiores no parecen efectivas (Chase et al, 2003; 2005; Yano y Steiner, 2005). Esta discrepancia en cuanto a la activación con 0.5 mg/kg respecto a nuestros resultados puede deberse a que los otros autores miden la activación de *c-fos* a los 60 min posteriores a la inyección del fármaco, mientras que nosotros la hemos medido a los 30 min, cuando el pico de la expresión de *c-fos* está normalmente a su nivel máximo. Se ha descrito aumento de la expresión de *c-fos* en Acb con dosis altas de MPH en ratones adultos (Trihn et al., 2003) o en ratas juveniles (Chase et al, 2005; Allen et al, 2010), pero no con una dosis de 2 mg/kg en ratas juveniles o adolescentes (Brandon y Steiner, 2003; Chase et al, 2005; Van Waes et al, 2010). No conocemos ningún estudio en Acb con dosis tan bajas como las empleadas en el presente trabajo. Es posible que los animales adultos sean más sensibles que los jóvenes y eso explique el que hayamos podido observar efecto con una dosis baja de MPH (ver más adelante).

Independientemente de los efectos por separado del MPH y la natación forzada, la exposición conjunta a ambos estímulos no dio lugar a ninguna sinergia negativa, observándose en general un efecto meramente sumatorio de cada estímulo, excepto en CPu donde apareció una sinergia positiva. Una sinergia positiva se ha descrito previamente respecto a AMPH y estrés en CPu (v.g. Badiani et al, 1998; 1999). Los resultados sugieren que el MPH y el estrés están probablemente activando poblaciones neuronales diferentes y por consiguiente no hemos detectado los posibles

lugares en los cuales se da la interacción negativa observada respecto a la activación del eje HPA. No podemos descartar que el estudio de las áreas del tronco encefálico en las que se hallan los somas de las neuronas monoaminérgicas (núcleos del rafe, VTA o regiones A2/C2 y A1/C1) permita detectar esta sinergia negativa. Dicho estudio no se ha podido llevar a cabo en la presente tesis al requerir técnicas de doble marcaje, pero está programado para llevarse a cabo en el futuro inmediato.

Es de destacar que no se observó efecto significativo de la administración de MPH sobre la inducción de *c-fos* por la natación forzada en el PVNmpd, área crítica para la regulación del eje HPA, a pesar del bloqueo de la expresión del gen del CRF en esta misma zona. La disociación entre los cambios en *c-fos* y la transcripción del gen de CRH ha sido ya descrita en otras situaciones (Ginsberg et al, 2003; Vallés et al, 2003), reflejando el hecho de que son dos procesos relacionados pero diferenciados desde el punto de vista de los mecanismos intracelulares implicados.

Podemos concluir que la interacción del MPH con la respuesta fisiológica al estrés, parece residir fundamentalmente en el SNC, más concretamente en el PVN y en lo que respecta al eje HPA. No hemos podido caracterizar el origen de las señales que llegan al PVN para regular el descenso en la expresión de CRF (y probablemente su liberación al sistema portal-hipofisario) mediante la expresión de *c-fos* en áreas críticas del SNC, aunque aún quedan por estudiar las áreas donde se sitúan las neuronas monoaminérgicas.

4. Efecto del metilfenidato sobre la conducta de afrontamiento de situaciones aversivas (*Experimentos 3 y 4*)

Aunque la reducción de la respuesta biológica al estrés de natación forzada tiene en principio connotaciones positivas para el animal, el favorecimiento de las conductas de afrontamiento activo durante la natación podría ser una consecuencia del efecto estimulante del MPH. Por ello, decidimos estudiar los efectos del MPH sobre otro estímulo estresante emocional como es la exposición al choque eléctrico en una prueba de evitación activa en dos sentidos, prueba que también permite evaluar la conducta de afrontamiento, pero también la ansiedad y la capacidad de aprendizaje de los animales. La evitación activa en dos sentidos implica obviamente aprendizaje instrumental y clásico, pero existen muchos datos, especialmente los basados en la selección genética de animales, que apoyan un papel crítico de la ansiedad en la eficacia del aprendizaje de la tarea (Brush, 2003; Steimer y Driscoll, 2003).

Los resultados indican de nuevo que la administración de 1 mg/kg de MPH no altera por sí misma los niveles de ACTH o corticosterona; tampoco los de glucosa. Por consiguiente, los datos confirman los resultados de experimentos anteriores. Tras la exposición a 50 ensayos en la prueba de evitación activa en dos sentidos, observamos el lógico aumento de los niveles de ACTH y corticosterona en respuesta a situaciones que utilizan los choques eléctricos como estímulo estresante (Márquez et al., 2002; Belda et al., 2004) y más concretamente en tareas similares de evitación-escape (v.g. Weinberg y Levine, 1977; Knardahl y Murison, 1989; Lanza et al., 2012). Pero la exposición a la tarea inmediatamente después de la administración de 1 mg/kg de MPH, reduce la respuesta de la ACTH a dicha tarea, confirmando de nuevo la interacción negativa entre los estímulos estresantes emocionales y el MPH. De nuevo, como en experimentos anteriores, la interacción no se pone de manifiesto con los valores de corticosterona. En cambio, la

interacción sí se manifiesta con la glucosa, dado que la administración de MPH reduce la hiperglucemia causada por los choques eléctricos.

La evaluación de la ganancia de peso corporal en las 24 h siguientes a la prueba de evitación activa experimental nos indica que los animales expuestos a la *Shuttle-box* han ganado menos peso que los animales controles respectivos, efecto típico de situaciones estresantes de cierta intensidad, en gran parte ligada a la reducción de la ingesta (Martí et al, 1994; Vallès et al. 2000; Márquez et al, 2002). Sin embargo, esta reducción de la ganancia de peso no se ve afectada por la administración de MPH.

Cuando se analizaron los niveles basales de ACTH y corticosterona a las 48 h de la exposición a la tarea de evitación, no se observaron diferencias. Por el contrario, resultados previos indican que los niveles basales de ACTH y/o corticosterona sí están elevados en machos adultos SD a las 24-48 h de la exposición a la IMO o a choques eléctricos inescapables (v.g. Fleshner et al, 1995; Gagliano et al, 2014), lo que sugiere que la intensidad del choque eléctrico (0.7 mA) unida a la posibilidad de evitación no parecen ser suficiente para incrementar los valores basales de ACTH o corticosterona a las 48 h.

Los datos fisiológicos del presente experimento fueron confirmados en un nuevo experimento, en el que ampliamos el número de sujetos para delinear mejor los efectos conductuales del MPH. Y nuevamente confirmamos la interacción negativa entre el choque eléctrico de la prueba de evitación activa en dos sentidos y el MPH, tanto con la disminución de los niveles de ACTH como la disminución de la hiperglicemia provocada por la exposición a la prueba. Nuevamente, los valores de corticosterona no reflejan la interacción.

En la exposición a la prueba de evitación activa en dos sentidos en la *Shuttle-box* del Experimento 3, los animales que recibieron MPH demuestran una tendencia, aunque no significativa, a realizar más respuestas condicionadas, menor tiempo de evitación y menos huidas. En cambio, sí encontramos un efecto global del fármaco en la latencia de respuestas incondicionadas, que es más corta tras el fármaco. Por otro lado, a pesar de la gran variabilidad dentro de cada grupo, los animales inyectados con el MPH realizan más cruzamientos en los intervalos inter-ensayos, siendo la diferencia significativa en el cuarto bloque de ensayos.

Puesto que los resultados conductuales parecían sugerir un efecto del MPH, decidimos replicar el experimento obviando los grupos no expuestos a la tarea de evitación-escape, pero aumentando el número de sujetos expuestos a la prueba de evitación activa. En este caso los resultados son mucho más evidentes. Por un lado, volvimos a confirmar la reducción de la respuesta de la ACTH y de la glucosa en los animales que recibieron el fármaco. Por otro, los animales inyectados con MPH realizan más respuestas condicionadas en los 5 bloques de estudio y la latencia de respuesta también se reduce. Como consecuencia del aumento de respuestas de evitación, los animales inyectados con MPH realizan menos huidas. La latencia de respuesta (incluyendo respuestas condicionadas e incondicionadas) es menor en los animales inyectados con el fármaco. También el número de cruzamientos entre ensayos es mayor en los animales inyectados con el fármaco. Todo esto, nos estaría indicando un mejor afrontamiento de la situación y una mejora en el aprendizaje.

No podemos descartar totalmente que el aumento de cruzamientos entre ensayos pudiera deberse a un efecto estimulante motor del MPH. Sin embargo, hay tres argumentos en contra de esta posibilidad. En primer lugar, los incrementos en la actividad motora suelen observarse no con dosis en el rango de la utilizada en el presente estudio, sino con dosis más elevadas de MPH. En segundo lugar, no encontramos diferencias en los cruzamientos en los períodos de habituación, aunque el poco tiempo transcurrido desde la administración del fármaco no descarta que la actividad se incremente en tiempos posteriores. Finalmente, suele existir una buena correlación entre la eficacia en el aprendizaje de la tarea de evitación y los cruzamientos entre ensayos (v.g. Guillazo-Blanch et al, 2002; Torras-García et al, 2003; Río-Álamos et al, 2015), lo que sugiere que estos últimos reflejan más aprendizaje que actividad motora.

Generalización del miedo y ansiedad a corto plazo

En el Experimento 3, al día siguiente de la exposición al procedimiento de evitación activa en dos sentidos, expusimos a todos los sujetos a 5 min en el EPM para evaluar si la exposición al choque eléctrico generaba ansiedad en los sujetos expuestos y si esa ansiedad generada podía reducirse por la administración de MPH. No encontramos diferencias en el número de entradas en brazos abiertos o cerrados del EPM, lo que sugiere que no hay hipo-actividad al día siguiente de la exposición al choque eléctrico. Sin embargo, los dos grupos expuestos al choque eléctrico el día anterior mostraron mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos (y menor tiempo en los cerrados), que fue independiente de la administración o no del fármaco. También se pone en evidencia esta conclusión, evaluando el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos respecto al tiempo total de permanencia en brazos abiertos más cerrados.

Aunque estos datos sugieren que los animales expuestos al choque eléctrico se muestran menos ansiosos, existen otras posibles explicaciones alternativas. En tanto que la exposición a situaciones de estrés de elevada intensidad puede, al menos en algunos casos, incrementar la ansiedad, reflejada en una menor entrada/tiempo en los brazos abiertos del EPM (ver Armario et al, 2008 para una revisión del tema), los datos respecto al choque eléctrico son contradictorios. Aunque algunos estudios han demostrado un incremento aparente en la ansiedad en el EPM (Bitran et al, 2000), en otros estudios los resultados son inconsistentes o negativos (Steenbergen et al, 1991; Grahn et al, 1995; MacLean y Datta, 2007; Kinn-Rod et al, 2012), e incluso, paradójicamente, algunos observan un incremento en el tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado (v.g. Radulovic et al, 1998), como ha sido el caso del presente estudio. Un efecto consistente de la exposición a choques eléctricos es una mayor evitación de los espacios abiertos cuando el animal puede elegir estar en un lugar protegido o explorar zonas abiertas, pero no está claro de que esta conducta sea interpretable en términos de ansiedad (Bruijnzeel et al, 2001a, 2001b). Una posible explicación de este efecto paradójico es que los animales rehúyan los brazos cerrados por guardar más similitud con el lugar donde recibieron los choques, representando un fenómeno de generalización a contextos que tengan cierta similitud con el original del choque.

Cuando los animales fueron expuestos durante 15 min a un OF, apenas se observaron diferencias conductuales en función de los tratamientos. En cambio, diversos estudios ponen de manifiesto que la exposición a choques eléctricos incontrolables causa hipo-actividad en ambientes nuevos (Van Dijken et al, 1992, 1993; Radulovic et al, 1998; Daviu et al, 2010; 2014). No está clara la

razón de esta hipo-actividad, que hemos denominado generalización cognitiva (Daviu et al, 2014), para indicar que la experiencia de choques eléctricos incontrolables provoca un cierto nivel bajo de miedo a todo tipo de ambiente nuevo desconocido. Esta generalización cognitiva es diferente de la generalización, dependiente de hipocampo, cuando los animales se exponen a ambientes que sí tiene una similitud parcial con aquél donde recibieron los choques (Daviu et al, 2014). Una de las posibles explicaciones a las diferencias entre los trabajos anteriormente mencionados sea posiblemente que en nuestro caso se trata de choque eléctrico evitable (evitación activa en dos sentidos), al contrario de lo publicado anteriormente. Es decir, esta posible generalización cognitiva del miedo se provocaría en situaciones inevitables pero no cuando hay la posibilidad de evitación. Datos de nuestro laboratorio (no publicado) indican que la posibilidad de evitación es crítica dado que animales que pueden escapar (pero no evitar) el choque sí muestran hipo-actividad en ambientes nuevos.

A nivel de eje HPA, los animales expuestos a la tarea de evitación que fueron administrados con vehículo no muestran diferencias en la respuesta de la ACTH, aunque sí una mayor respuesta de corticosterona, comparados con el grupo no expuesto a la tarea. En cambio, aquellos expuestos a la tarea de evitación tras serles administrado MPH muestran una sensibilización de la respuesta de ACTH y de corticosterona. La exposición a situaciones de estrés de elevada intensidad consistentemente induce sensibilización de la respuesta del eje HPA a otras situaciones de estrés, especialmente cuando éstas son de baja intensidad y corta duración (Belda et al, 2008, 2015; Gagliano et al, 2008). Esta sensibilización es muy evidente en las primeras 48 h para reducirse progresivamente a lo largo de los días. Es posible que la sensibilización sea algo menor en el grupo no tratado con MPH y por eso no se refleje en la respuesta de la ACTH.

Condicionamiento del miedo al contexto

Cuando los animales son expuestos a un estímulo aversivo como el choque eléctrico en un compartimento específico, desarrollan miedo al lugar donde recibieron el choque; es decir, desarrollan miedo condicionado al contexto. El miedo al contexto, evaluado por el tiempo de *freezing*, se desarrolla inclusive ante un solo choque eléctrico (Phillips y LeDoux, 1992; Rudy et al, 1993). Otras medidas de ese condicionamiento al contexto pueden ser la hipo-actividad reflejada en el menor número de *crossings* y *rearings* durante la prueba (v.g. Daviu et al, 2014).

Cuando re-expusimos los animales durante 15 min al contexto del choque 8 días después de la tarea de evitación, se observó altos niveles de *freezing* e hipo-actividad en los animales expuestos previamente a la tarea. Sin embargo, la administración de MPH no alteró significativamente esta respuesta conductual. En cambio, en el Experimento 4, al aumentar el número de sujetos, observamos que los sujetos inyectados con MPH realizan igual número de *rearings* y cruzamientos que los controles sin fármaco, pero el tiempo de *freezing* es menor que en los que recibieron vehículo. Por consiguiente, el MPH reduce el miedo condicionado al contexto. Esta reducción del miedo al contexto en los animales que recibieron MPH podría explicarse por tres razones diferentes. En primer lugar, que fuera dependiente del menor número/tiempo de choques recibidos, lo que no parece probable teniendo en cuenta que el efecto se mantiene aunque se introduzcan los choques como covariable en el análisis. En segundo lugar, que el MPH tuviera efecto amnésico, reduciendo la memoria del miedo. Los resultados de la literatura no van a favor de la

última hipótesis. La dosis de 1 mg/kg de MPH no parece ejercer efecto alguno sobre la memoria espacial en laberinto acuático (Carmack et al, 2014a); por el contrario, favorece el condicionamiento del miedo al sonido y al contexto (Carmack et al, 2014b). Es interesante destacar que la dosis de 10 mg/kg mejora la memoria en el laberinto acuático en tanto que empeora el condicionamiento del miedo al tono y al contexto (Carmack et al, 2014a; 2014b), sugiriendo que distintos tipos de memoria, ambas ligadas a la función hipocampal, se ven afectadas de manera diferente según la dosis de MPH. Es posible que la componente emocional de la tarea pueda modular el efecto del fármaco. Otros resultados demuestran in vitro que el MPH a dosis que reflejan los niveles alcanzados in vivo favorecen la potenciación a largo plazo en la región CA1 del hipocampo, un efecto que parece depender tanto de NA como de DA (Dommett et al, 2008; Rozas et al, 2015).

Finalmente, cabe la posibilidad de que la posibilidad de control durante la tarea redujera el miedo condicionado al contexto. No conocemos de ningún estudio específico al respecto, pero se ha descrito que la posibilidad de controlar mediante una conducta operante la duración de choques eléctricos en la cola, reduce el condicionamiento del miedo al contexto asociado a choques eléctricos en las patas cuando se comparan con animales no expuestos previamente al estrés, en tanto que los que no ejercían control en la primera tarea muestran mayor condicionamiento (v.g. Barratta et al., 2007).

A nivel endocrino, se observó en los dos experimentos un incremento en los niveles de ACTH y corticosterona en los animales expuestos a la tarea de evitación respecto a los grupos expuestos al contexto asociado al choque pero sin recibir choques. Estos resultados están en total concordancia con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (v.g. Daviu et al, 2012; 2014), e indican que la activación del eje HPA es capaz de reflejar el condicionamiento del miedo al contexto. Sin embargo, en ninguno de los dos experimentos observamos diferencias en la respuesta de ACTH o corticosterona en la re-exposición al contexto en función de la administración de MPH el día de la tarea de evitación. Por consiguiente, podemos concluir que la conducta es más sensible que la respuesta hormonal para reflejar el condicionamiento del miedo al contexto, dando lugar, en algunos casos, a una disociación entre ambos tipos de variables.

5. ¿Aparece interacción negativa entre metilfenidato y estrés cuando el fármaco se administra con antelación? (Experimento 5)

Una vez definida la interacción negativa entre dosis de uso terapéutico de MPH y estímulos estresantes emocionales cuando el fármaco y los estímulos estresantes son simultáneos, era importante estudiar si la interacción se daba con la administración previa del fármaco un tiempo antes de la exposición al estrés. Ésta es una situación más real que la exposición simultánea, dado que el fármaco se administra por vía oral y tarda un cierto tiempo en alcanzar niveles adecuados en SNC. En primates se ha observado que el MPH entra rápidamente en el SNC cuando es administrado iv (con un pico sobre los 10 min), y lógicamente de forma mucho más lenta con la administración oral (Volkow et al, 2002), siendo su vida media en sangre de alrededor de 2,5 h en niños (Hungund et al, 1979) y de algo menos de 1 h en rata (v.g. Thai et al, 1999). La administra-

ción sc que estamos utilizando en nuestros experimentos representa una situación algo más próxima a la oral que la administración iv en la cual los niveles de fármacos se elevan de forma muy brusca y más acotada en el tiempo.

Observamos que la administración previa de MPH también era capaz de reducir la respuesta de la ACTH y de la glucosa a la natación forzada cuando la exposición al estrés tenía lugar 30 min después de la administración del fármaco. El efecto se notó no solo inmediatamente después del estrés sino también en el período post-estrés. Es por lo tanto evidente que la exposición simultánea no es una condición necesaria para que se presente la interacción, lo que sugiere que los pacientes tratados con MPH podría mostrar una menor respuesta a situaciones de estrés al menos durante un cierto tiempo después de la toma del fármaco cuando aún los niveles de MPH estén dentro del nivel terapéutico adecuado.

6. Diferencias entre ratas jóvenes y adultas respecto a la Interacción entre el metilfenidato y la natación forzada (*Experimento 6*)

Estudios longitudinales en humanos han determinado que el TDAH y sus síntomas pueden perdurar en la etapa adulta, con una tasa de persistencia superior al 75% (Faraone et al, 2000). Los estimulantes del SNC como el MPH siguen siendo la terapia de elección (Taylor y Russo, 2001). Sin embargo, el trastorno es mucho más prevalente en la población infantil (3-6 %), siendo seis veces más diagnosticado en niños que en niñas (Blomqvist et al, 2007). Por lo tanto, considerando que el principal rango de edad en humanos en el que se utiliza MPH es en niños/adolescentes, decidimos realizar un experimento de comparación del efecto del MPH en ratas SD adultas y juveniles. Considerando que el MPH por sí solo no es capaz de estimular el eje HPA, comparamos solamente la respuesta del eje HPA de ratas juveniles y adultas expuestas a 30 min de natación forzada con y sin la administración de 1 mg/kg de MPH.

Al igual que en los experimentos anteriores, el MPH vuelve a disminuir la respuesta de la ACTH al estrés tanto en ratas SD adultas como en juveniles, observándose el efecto tanto al finalizar el estímulo estresante como en el período post-estrés. Los niveles de corticosterona no muestran efecto alguno del MPH, como en los experimentos anteriores. Es importante destacar que la disminución causada por el MPH es menor en ratas juveniles que en adultas, lo que sugiere una mayor eficacia del fármaco en la etapa adulta. Por otro lado, la respuesta de la glucosa también indica una atenuación de la respuesta a la natación forzada con el MPH, siendo en este caso el efecto independiente de la edad.

Puesto que el efecto del MPH sobre la respuesta biológica al estrés que estamos estudiando se ha descrito por primera vez en la presente tesis, no existen antecedentes al respecto. El hecho de que el MPH sea más eficaz en animales adultos que en jóvenes para reducir la respuesta del eje HPA al estrés, en tanto que no aparezcan diferencias en función de la edad en la reducción de la hiperglucemia, podrían sugerir que el efecto diferencial según la edad podría depender de la variable concreta a estudiar. Sin embargo, los cambios en glucosa causados por el nado son moderados y quizás eso impide que los resultados sean concluyentes respecto a posibles diferencias en el impacto del MPH en función de la edad.

Los datos en la literatura en aspectos diferentes de los estudiados en el presente estudio tampoco son concluyentes respecto a un efecto diferencial del MPH en función de la edad (jóvenes versus adultas). Cuando se valora la actividad motora, lo que implica el uso de dosis de MPH más elevadas de las empleadas en nuestros estudios, los estudios en rata indican que no hay diferencias (Torres-Reverón et al, 2005; Yetnikoff & Arvanitogianis, 2013) o que las ratas adolescentes muestran mayor respuesta (Walker et al, 2010) o menor (Levant et al, 2011). Sin embargo, la respuesta electrofisiológica y la expresión de IEGs de la corteza cerebral es menor en ratas jóvenes (Gronier et al, 2011). Una menor respuesta en ratas jóvenes es más compatible con niveles inferiores de MPH en el cerebro respecto a adultas (Levant et al, 2011). Las diferencias entre estudios podrían estar relacionadas con el uso de diferentes dosis de MPH. Por otro lado, otros efectos conductuales de dosis altas de MPH como la aversión condicionada al gusto, utilizando sacarina como sabor novedoso y la administración posterior de MPH como factor de inducción de aversión, también es menor en ratas jóvenes que en adultas (Wetzell et al, 2014). En resumen, aunque los datos son en parte controvertidos, la mayoría de ellos apoyaría la posibilidad de una menor respuesta de los animales jóvenes al MPH, quizás en gran medida debida a unos menores niveles del fármaco en el SNC. En algunos casos, aspectos fármaco-dinámicos podrían explicar que la respuesta sea normal o incluso superior, a pesar de alcanzarse niveles inferiores de MPH.

Un aspecto adicional por discutir de nuestros resultados es la influencia de la edad en la respuesta del eje HPA y la glucosa al estrés. Nuestros resultados muestran que los niveles basales de ACTH y corticosterona no difieren en jóvenes y adultos. La hiperglucemia asociada a la natación forzada tampoco difiere en jóvenes y adultos, de acuerdo con resultados previos (Romeo et al, 2007). Tampoco difiere la respuesta de la ACTH, pero, en cambio, la respuesta de la corticosterona es claramente superior en los animales jóvenes, lo que sugiere una mayor capacidad de respuesta de la adrenal a la ACTH a esta edad.

En los últimos años han aparecido un importante número de estudios respecto a los cambios en la respuesta del eje HPA desde la etapa juvenil a la etapa adulta. Aunque los datos no son enteramente concordantes entre sí (Vázquez y Akil, 1993; Romeo et al, 2004a; 2004b; 2006b), la mayoría de los resultados indican que la respuesta inicial de la ACTH al estrés es bastante similar o a veces mayor, pero la vuelta a los niveles basales después del estrés está enlentecida en los animales jóvenes; en cambio, es más consistente que la respuesta de la corticosterona es mayor y su vuelta a la normalidad está retrasada. Cuando se han estudiado distintas edades comprendidas entre los 40 y 70 días, parece que la respuesta de la ACTH (incrementada) tarda más en parecerse a la de los adultos (madura más lentamente) que la de corticosterona (Foilb et al, 2011). No tenemos un conocimiento preciso de la razón de esta respuesta diferencial al estrés entre animales jóvenes y adultos, pero probablemente hay diferencias a nivel central y periférico (Romeo et al, 2006a; 2007; Lui et al, 2012), aunque no parece que haya una expresión diferencial de receptores de glucocorticoides (Romeo et al, 2008).

En resumen, aunque parecen existir diferencias en la regulación del eje HPA entre animales jóvenes y adultos, los efectos del MPH para reducir la respuesta fisiológica al estrés aparecen a ambas edades, lo que implica su posible aplicación no solo a los niños sino también a los adultos con TDAH.

7. Consideraciones respecto a los efectos de la administración crónica de metilfenidato.

Los estudios de la presente tesis se han centrado en los efectos de la administración aguda de MPH. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el tratamiento con MPH es crónico en las poblaciones con TDAH y una de los aspectos a desarrollar en el futuro es si el tratamiento crónico con MPH cambia o no los efectos del MPH aquí descritos. Queremos acabar la discusión de nuestros resultados haciendo al menos una breve referencia a los estudios llevados a cabo en animales respecto a las consecuencias a largo plazo de la administración de MPH en animales jóvenes. Solo haremos referencias a aquellos estudios que utilizan dosis de MPH dentro del rango terapéutico, o al menos cercanas.

La mayoría de los estudios han estudiado los efectos del MPH sobre la conducta emocional o la respuesta a distintas drogas de abuso, aunque algunos han investigado efectos generales sobre memoria y tareas cognitivas. Cuando no se indique otra cosa, los estudios se han llevado a cabo en ratas. Cuando se estudian los efectos del tratamiento con MPH a corto plazo (en los días posteriores) la administración oral de dosis entre 0,75 y 3 mg/kg no causa en ratas sensibilización motora a metanfetamina (Kuczenski y Segal 2002) y tras el tratamiento durante PND22-40 se han encontrado efectos beneficiosos sobre la memoria espacial en un laberinto radial (Zhu et al, 2007).

Existen muchos más estudios respecto a los efectos a largo plazo del MPH administrado en una cierta fase del desarrollo. La administración de MPH (4 mg/kg) durante PND20-35 altera la respuesta a la cocaína en la etapa adulta, de tal manera que favorece la aversión condicionada a la droga a dosis relativamente bajas pero reduce la preferencia condicionada a una dosis más alta, cuando se compara con animales que no recibieron MPH en etapas tempranas (Andersen et al, 2001). El tratamiento parece reducir la eficacia de la cocaína para potenciar los mecanismos de recompensa, estudiados mediante el umbral de auto-estimulación intracraneal (Mague et al, 2005). Los efectos no se limitan a las drogas, dado que el mismo procedimiento reduce la preferencia por sacarosa, favorece la adopción de una conducta pasiva en la prueba de natación forzada, disminuye la actividad en un ambiente nuevo, incrementa la ansiedad en el EPM (sin afectar a la interacción social), reduce la conducta copuladora e incrementa la respuesta de la corticosterona a una inmovilización en tubo (Bolaños et al, 2003; Carlezón et al, 2003), sugiriendo importantes consecuencias conductuales predominantemente negativas. A estos posible efectos negativos se añade la reducción de la neurogénesis hipocampal, inhibiendo la supervivencia de nuevas células más que la proliferación (Lagace et al, 2006). Otros autores han observado que el tratamiento en PND25-39 favorece la memoria del condicionamiento del miedo al contexto pero no al tono (Britton et al, 2007), habiéndose encontrado también una potenciación moderada de la memoria de miedo al contexto con tratamientos en PND27-71 cuando el condicionamiento se estudia 18 días después del tratamiento (Bethancourt et al, 2009).

En cambio, otros autores con dosis de 5 o 10 mg/kg durante 5 o 7 días observan una mayor respuesta motora a varias dosis de cocaína y un mayores tasas de auto-administración de la droga en la etapa adulta (Brandon et al, 2001). Estos efectos conductuales están asociados a una menor actividad electrofisiológica de las neuronas DA, al parecer independientemente de la sensibilidad de los autorreceptores D2 (Brandon et al, 2003). De forma similar, con el tratamiento en una fase

más temprana (PND11-20) se potencia la respuesta de CPP (*conditioned place preference*) a la morfina y la capacidad reforzante de la sacarosa en la etapa adulta (Crawford et al, 2007), sin alterar tampoco los autorreceptores D2. Adriani et al, (2006) con un tipo de tratamiento similar obtiene efectos complejos con mayor sensibilización motora a la cocaína, menor CPP y una conducta operante más flexible de elección entre recompensas de más valor pero menos probables. Estos efectos a largo plazo del MPH se asociaron a cambios en la expresión génica en genes de plasticidad sináptica como *homer*. En ratones tratados en PND26-32 no se encuentra efectos a corto plazo en la actividad o la ansiedad en ambientes nuevos o en el aprendizaje en un laberinto acuático (McFadyen et al, 2002). Sin embargo con dosis relativamente altas (10 mg/kg) se observan a largo plazo mayor actividad y sensibilización motora en respuesta a cocaína y un nivel menor de CPP pero mayor recaída por una dosis *priming* de la droga (Achat-Mendes et al, 2003).

En un estudio muy relevante para la clínica por la duración del tratamiento, la administración de MPH durante 8 meses a ratas desde PND30 reduce la auto-administración de cocaína, efecto acompañado de un incremento en la disponibilidad de los receptores D2 en estriado (Thanos et al, 2007). Finalmente, y relacionado directamente con el presente trabajo, la administración de MPH revierte el incremento en espinas dendríticas que el estrés crónico por separación maternal causa en el roedor *Octodon degus* (Zehle et al, 2007). También se han observado efecto protector del MPH frente a los efectos conductuales negativos a largo plazo causados por la exposición al choque eléctrico en animales jóvenes (Aga-Mizrachi et al, 2014).

Podemos concluir que sí parecen observarse efectos a largo plazo de la administración de MPH, aunque no está claro que estos efectos sean predominantemente negativos. Aunque muchos de los posibles efectos pueden pasar desapercibidos bajo determinadas condiciones ambientales, la posibilidad de que realmente puedan presentarse en los jóvenes y adultos tratados con el fármaco hace necesarios más estudios experimentales y clínicos al respecto.

Conclusiones

1. La administración de anfetamina inmediatamente antes de la exposición a una situación estresante como la natación forzada reduce la respuesta fisiológica (niveles plasmáticos de ACTH e hiperglucemia) asociada al estrés de forma dosis dependiente, indicando una sinergia negativa.
2. En el mismo experimento hemos demostrado que la interacción entre anfetamina y estrés se da en las dos direcciones, en tanto que la exposición al estrés reduce la activación del eje HPA (niveles de ACTH) a dosis relativamente altas de anfetamina, efecto observable en la fase de recuperación post-estrés.
3. Administrado en las mismas condiciones que la anfetamina, el metilfenidato, tratamiento de referencia del TDAH, a dosis relevantes terapéuticamente, no ejerce efecto alguno por sí mismo sobre el eje HPA, pero en cambio reduce la respuesta de ACTH y la hiperglucemia causada por la natación forzada, sugiriendo que la inhibición de la respuesta al estrés podría ser un efecto general de los fármacos psicoestimulantes.
4. Los efectos del metilfenidato se sitúan a nivel de SNC, dado que el fármaco reduce la expresión del gen del CRF (el principal factor hipotalámico de regulación del eje HPA) en el núcleo paraventricular del hipotálamo, en respuesta a la natación forzada. La expresión de *c-fos* en diversas áreas del SNC no nos ha permitido localizar áreas extra-hipotalámicas responsables de la interacción.
5. La reducción de la respuesta fisiológica por la administración de metilfenidato se observa también en una situación de estrés muy distinta como es el aprendizaje de evitación-escape (de choques eléctricos) en la *Shuttle-box*.
6. En la tarea de evitación-escape, el metilfenidato también favorece el aprendizaje al mismo tiempo que reduce el condicionamiento de miedo al contexto desarrollado durante la tarea, lo que sugiere que el fármaco podría reducir el miedo/ansiedad experimentado por el animal durante la realización de la tarea. Por consiguiente, los efectos protectores del metilfenidato frente al estrés implican aspectos fisiológicos y conductuales.
7. La reducción de la respuesta fisiológica al estrés (natación forzada) por la administración de metilfenidato se observa también cuando el fármaco se administra 30 min antes de la exposición al estrés, lo que indica que los sujetos tratados con MPH podrían afrontar mejor las situaciones cotidianas de estrés a las que se enfrentan.
8. La inhibición de la respuesta fisiológica al estrés (natación forzada) por la administración de metilfenidato se observa tanto en animales adolescentes como en adultos, siendo el efecto algo superior en estos últimos. Por consiguiente, los posibles efectos protectores del fármaco frente al estrés serían extensibles a los adultos con TDAH.
9. Los resultados obtenidos, indican que la administración de MPH no solo mejora aspectos como la atención, la hiperactividad y otras funciones cognitivas, sino que también podrían proteger frente a los efectos del estrés. Queda por caracterizar si estos efectos protectores se mantienen tras la administración crónica y profundizar en los efectos a largo plazo del tratamiento.

Abreviaturas

5-HT: serotonina
A: adrenalina
Acb: núcleo accumbens
AcbC: núcleo accumbens core
AcbSh: núcleo accumbens Shell
ACTH: hormona adreno-corticotropa
AII: angiotensina II
AMPH: anfetamina
AP-1: proteína activadora I
ARC: núcleo arqueado del hipotálamo
Arc: *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*
ATX: atomoxetina
AUC: área bajo la curva
AVP: arginina-vasopresina
BLA: amígdala basolateral
BST: núcleo del lecho de la estria terminal
CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CBG: globulina transportadora de glucocorticoids
CCK: colecistoquinina
CeA: amígdala central
CFRR2: receptor 2 de CRF
CRF o CRH: factor liberador de corticotropina
CRFR1: receptor 1 de CRF
CRFR2 α : receptor 2 α de CRF
CRFR2 β : receptor 2 β de CRF
CS: estímulo condicionado
CTFs: *constitutive transcription factors*
DA: dopamina
DAT: trasportador de DA
DBH: dopamina- β -hidroxilasa
DHEA-S: dehidroepiandrosterona-sulfato
DM: núcleo dorso-medial del hipotálamo
DR: Rafe dorsal
EM: eminencia media
EPM: laberinto elevado en cruz
FSH: hormona folículo-estimulante
GEE: Generalized Estimating Equations
GH: hormona de crecimiento
GR: receptor de glucocorticoides
GzLM: Generalized Linear Model
HF: formación hipocampal
hnRNA-CRF: RNA heteronuclear del CRF
HPA: sistema hipotálamo-pituitario-adrenal
IEGs: *immediate-early-genes*
IL-1 β : interleuquina 1 β
ISH: *in situ hybridization*
ITFs: *inducible transcription factors*
LC: locus coeruleus
LH: hipotálamo lateral
LS: lateral septum
LSV: lateral septum ventral
mPFC: Corteza prefrontal medial
MeA: amígdala medial
MePO: núcleo preóptico medial
ME: eminencia media
MLC: sistema límbico mesocortical
MPH: Metilfenidato
MR: receptor de mineralocorticoides
mRNA: RNA mensajero
MWM: laberinto acuático de Morris
NA: noradrenalina
NET: trasportador de NA
NTS: núcleo del tracto solitario
OF: campo abierto
OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminal
PAG: sustancia gris periacueductal
peri-PVN: región peri-PVN
PFC: corteza prefrontal
PFC-IL: PFC infralímbica
PFC-PrL: PFC pre-límbica
PFR: factores estimuladores de PRL
PIF: factor hipotalámico inhibidor de prolactina
PKA: protein-quinasa A dependiente de AMPc
PND: días post-nacimiento
PO: área preóptica medial del hipotálamo
POMC: pro-opio-melanocortina
PRL: prolactina
PRFs: factores liberadores de PRL
PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
PVNap: PVN parvocelular anterior
PVNdc: PVN *dorsal cup*
PVNm: PVN magnocelular
PVNmm: PVN magnocelular medial
PVNmp: PVN parvocelular medial

PVNmpd: PVN parvocelular medial dorsal
PVNmpv: PVN parvocelular medial ventral
PVNp: PVN parvocelular
PVNpe: PVN parvocelular periventricular
PVNsm: PVN submagnocelular
PVT: núcleo paraventricular del tálamo
SERT: transportador de 5-HT
SFO: órgano subfornical
SHR: ratas hipertensivas originadas en Okamoto (Japón)
SMA: sistema simpático-médulo-adrenal
SNC: sistema nervioso central
SOM: somatostatina
SON: núcleo supra-óptico

T.O.V.A.: Test de variables de atención
TDAH: Trastorno por déficit de atención con hiperactividad
TDAH-A: TDAH con predominio de falta de atención
TDAH-C: TDAH combinado
TDAH-HI: TDAH con predominio de hiperactividad
TH: tiroxina-hidroxilasa
TSH: tirotrófina
TVA: área tegmental ventral
UCN I, II y III: urocortina I, II y III
US: estímulo incondicionado
VIP: péptido intestinal vasoactivo
VLM: bulbo ventro lateral
v-SUB: subículum ventral

Bibliografía

- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y (2003) Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 45: 106-15
- Adan RA, Gispen WH (2000) Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol* 405: 13-24
- Adriani W, Leo D, Greco D, Rea M, di Porzio U, Laviola G, Perrone-Capano C (2006) Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. *Neuropsychopharmacology* 31: 1946-56
- 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. *Transl Psychiatry* 4: e447
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C (2000) Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 96: 23-9
- Aguilo J, Ferrer-Salvans P, Garcia-Rozo A, Armario A, Corbi A, Cambra FJ, Bailon R, Gonzalez-Marcos A, Caja G, Aguilo S, Lopez-Anton R, Arza-Valdes A, Garzon-Rey JM (2015) Project ES3: attempting to quantify and measure the level of stress. *Rev Neurol* 61: 405-415
- Akana SF, Chu A, Soriano L, Dallman MF (2001) Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotropic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol* 13: 625-37
- Akieda-Asai S, Ohta R, Shirota M, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K (2011) Endocrinological differences between Hatano high- and low-avoidance rats during early two-way avoidance acquisition. *Exp Anim* 60: 509-16
- Alheid GF (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985: 185-205
- Allen JK, Wilkinson M, Soo EC, Hui JP, Chase TD, Carrey N (2010) Chronic low dose Adderall XR down-regulates cfos expression in infantile and prepubertal rat striatum and cortex. *Neuroscience* 169: 1901-12
- Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon WA, Jr. (2002) Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci* 5: 13-4
- Andrzejewski ME, Spencer RC, Harris RL, Feit EC, McKee BL, Berridge CW (2014) The effects of clinically relevant doses of amphetamine and methylphenidate on signal detection and DRL in rats. *Neuropharmacology* 79: 634-41
- Antelman SM, Caggiula AR, Knopf S, Kocan DJ, Edwards DJ (1992) Amphetamine or haloperidol 2 weeks earlier antagonized the plasma corticosterone response to amphetamine; evidence for the stressful/foreign nature of drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 107: 331-6
- 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: 522-36
- Armario A (1998) Consecuencias psicológicas, fisiológicas y clínicas. In: J. T (ed) *Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. Síntesis, pp 2176-2205
- Armario A (2000) Neurobiología del estrés: una perspectiva desde el eje hipotálamo-pituitario-adrenal. In: C S, JM C (eds) *Estrés: consecuencias psicológicas, Fisiológicas y Clínicas*. Sanz y Torres, pp 47-79

- Armario A (2006b) Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorder. In: Pinaud R, Tremere L (eds) *The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressor*. Springer Science
- Armario A (2006a) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 485-501
- Armario A (2010) Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: different pathways, common outcome. *Trends Pharmacol Sci* 31: 318-25
- Armario A, Daviu N, Munoz-Abellan C, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R (2012) What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell Mol Neurobiol* 32: 749-58
- Armario A, Escorihuela RM, Nadal R (2008) Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1121-35
- Armario A, Gavalda A, Marti J (1995) Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20: 879-90
- Armario A, Gavalda A, Marti O (1988) 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. *Eur J Pharmacol* 158: 207-12
- Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Castellanos JM (1986a) Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* 39: 471-5
- Armario A, Marti J, Gil M (1990) The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15: 341-7
- Armario A, Marti O, Molina T, de Pablo J, Valdes M (1996) Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinology* 21: 17-24
- Armario A, Montero JL, Balasch J (1986b) Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav* 37: 559-61
- Armstrong (2004) Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. In: Patxinos p (ed) *The Rat Nervous System*, 369-88
- Arnsten AF, Dudley AG (2005) Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct* 1: 2-11
- Aston-Jones G, Harris GC (2004) Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 167-79
- Avital A, Dolev T, Aga-Mizrachi S, Zubedat S (2011) Environmental enrichment preceding early adulthood methylphenidate treatment leads to long term increase of corticosterone and testosterone in the rat. *PLoS One* 6: e22059
- Badiani A, Anagnostaras SG, Robinson TE (1995a) The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. *Psychopharmacology* 117: 443-52
- Badiani A, Browman KE, Robinson TE (1995b) Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. *Brain Res* 674: 291-8

- Badiani A, Camp DM, Robinson TE (1997) Enduring enhancement of amphetamine sensitization by drug-associated environmental stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 787-94
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1998) Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. *J Neurosci* 18: 10579-93
- Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (1999) Environmental modulation of amphetamine-induced c-fos expression in D1 versus D2 striatal neurons. *Behav Brain Res* 103: 203-9
- Baird AL, Coogan AN, Siddiqui A, Donev RM, Thome J (2012) Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. *Mol Psychiatry* 17: 988-95
- Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 525-57
- 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: 1495-503
- Bekker EM, Overtoom CC, Kooij JJ, Buitelaar JK, Verbaten MN, Kenemans JL (2005) Disentangling deficits in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62: 1129-36
- Belda X, Armario A (2009) Dopamine D1 and D2 dopamine receptors regulate immobilization stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Psychopharmacology* 206: 355-65
- Belda X, Daviu N, Nadal R, Armario A (2012) Acute stress-induced sensitization of the pituitary-adrenal response to heterotypic stressors: independence of glucocorticoid release and activation of CRH1 receptors. *Horm Behav* 62: 515-24
- Belda X, Fuentes S, Daviu N, Nadal R, Armario A (2015) Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* 18: 269-79
- Belda X, Marquez C, Armario A (2004) Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behav Brain Res* 154: 399-408
- Belda X, Rotllant D, Fuentes S, Delgado R, Nadal R, Armario A (2008) Exposure to severe stressors causes long-lasting dysregulation of resting and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 165-73
- Belin D, Everitt BJ (2008) Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron* 57: 432-41
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60: 1111-20
- Bethancourt JA, Camarena ZZ, Britton GB (2009) Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behav Brain Res* 202: 50-7
- Bhatnagar S, Vining C, Denski K (2004) Regulation of chronic stress-induced changes in hypothalamic-pituitary-adrenal activity by the basolateral amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 1032: 315-9

- Binder EB, Nemeroff CB (2010) The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 15: 574-88
- Birnbaumer M (2000) Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11: 406-10
- Bitran D, Klibansky DA, Martin GA (2000) The neurosteroid pregnanolone prevents the anxiogenic-like effect of inescapable shock in the rat. *Psychopharmacology* 151: 31-7
- Blomqvist M, Holmberg K, Lindblad F, Fernell E, Ek U, Dahllof G (2007) Salivary cortisol levels and dental anxiety in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Oral Sci* 115: 1-6
- Bodnar I, Hechtel D, Szekacs D, Olah M, Nagy GM (2007) Effect of local (intracerebral and intracerebroventricular) administration of tyrosine hydroxylase inhibitor on the neuroendocrine dopaminergic neurons and prolactin release. *Ideggyogy Sz* 60: 177-81
- Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ (2003) Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* 54: 1317-29
- Bonaz B, Rivest S (1998) Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *Am J Physiol* 275: R1438-49
- Borowsky B, Kuhn CM (1991) Monoamine mediation of cocaine-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activation. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 204-10
- Boudaba C, Szabo K, Tasker JG (1996) Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci* 16: 7151-60
- Brambilla F (2001) Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships. *Physiol Behav* 73: 365-9
- Brandon CL, Marinelli M, Baker LK, White FJ (2001) Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 651-61
- Brandon CL, Marinelli M, White FJ (2003) Adolescent exposure to methylphenidate alters the activity of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* 54: 1338-44
- Brandon CL, Steiner H (2003) Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur J Neurosci* 18: 1584-92
- Britton GB, Segan AT, Sejour J, Mancebo SE (2007) Early exposure to methylphenidate increases fear responses in an aversive context in adult rats. *Dev Psychobiol* 49: 265-75
- Brown SA, Vik PW, Patterson TL, Grant I, Schuckit MA (1995) Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. *J Stud Alcohol* 56: 538-45
- Brujinzeel AW, Stam R, Wiegant VM (2001a) 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: 132-9
- Brujinzeel AW, Stam R, Wiegant VM (2001b) LY354740 attenuates the expression of long-term behavioral sensitization induced by a single session of foot shocks. *Eur J Pharmacol* 426: 77-80
- Brush FR (2003) Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behav Genet* 33: 677-96
- Burow A, Day HE, Campeau S (2005) A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Res* 1062: 63-73

- Calogero AE, Gallucci WT, Kling MA, Chrousos GP, Gold PW (1989) Cocaine stimulates rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res* 505: 7-11
- Campeau S, Falls WA, Cullinan WE, Helmreich DL, Davis M, Watson SJ (1997) Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience* 78: 1087-104
- Campeau S, Watson SJ (1997) Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol* 9: 577-88
- Capriles N, Cancela LM (1999) Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. *Eur J Pharmacol* 386: 127-34
- Capriles N, Rodaros D, Sorge RE, Stewart J (2003) A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* 168: 66-74
- Caprioli D, Jupp B, Hong YT, Sawiak SJ, Ferrari V, Wharton L, Williamson DJ, McNabb C, Berry D, Aigbirhio FI, Robbins TW, Fryer TD, Dalley JW (2015) Dissociable rate-dependent effects of oral methylphenidate on impulsivity and D2/3 receptor availability in the striatum. *J Neurosci* 35: 3747-55
- Carlezon WA, Jr., Mague SD, Andersen SL (2003) Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 54: 1330-7
- Carmack SA, Block CL, Howell KK, Anagnostaras SG (2014a) Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. *Neurosci Lett* 567: 45-50
- Carmack SA, Howell KK, Rasaei K, Reas ET, Anagnostaras SG (2014b) Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. *Learn Mem* 21: 82-9
- Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T (1989) Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9569-73
- Cenci MA, Campbell K, Wictorin K, Bjorklund A (1992) Striatal c-fos Induction by Cocaine or Apomorphine Occurs Preferentially in Output Neurons Projecting to the Substantia Nigra in the Rat. *Eur J Neurosci* 4: 376-380
- Chase TD, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M (2003) Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *Neuroreport* 14: 769-72
- Chase TD, Carrey N, Brown RE, Wilkinson M (2005) Methylphenidate regulates c-fos and fosB expression in multiple regions of the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 156: 1-12
- Chen JC, Su HJ, Huang LI, Hsieh MM (1999) Reductions in binding and functions of D2 dopamine receptors in the rat ventral striatum during amphetamine sensitization. *Life Sci* 64: 343-54
- Chen YH, Lin XX, Chen H, Liu YY, Lin GX, Wei LX, Hong YL (2012) The change of the cortisol levels in children with ADHD treated by methylphenidate or atomoxetine. *J Psychiatr Res* 46: 415-6
- Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007) Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27: 2025-34
- Chong SL, Claussen CM, Dafny N (2012) Nucleus accumbens neuronal activity in freely behaving rats is modulated following acute and chronic methylphenidate administration. *Brain Res Bull* 87: 445-56
- Claussen CM, Chong SL, Dafny N (2014) Nucleus accumbens neuronal activity correlates to the animal's behavioral response to acute and chronic methylphenidate. *Physiol Behav* 129: 85-94

- Claussen CM, Dafny N (2014) Acute administration of methylphenidate alters the prefrontal cortex neuronal activity in a dose-response characteristic. *J Exp Pharmacol* 6: 1-9
- Claussen CM, Dafny N (2015) Caudate neuronal recording in freely behaving animals following acute and chronic dose response methylphenidate exposure. *Pharmacol Biochem Behav* 136: 21-30
- Cohen AL, Shapiro SK (2007) Exploring the performance differences on the flicker task and the conners' continuous performance test in adults with ADHD. *J Atten Disord* 11: 49-63
- Cole RL, Sawchenko PE (2002) Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 22: 959-69
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Berod A (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci* 26: 1011-25
- Connor DF, Grasso DJ, Slivinsky MD, Pearson GS, Banga A (2013) An open-label study of guanfacine extended release for traumatic stress related symptoms in children and adolescents. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 23: 244-51
- Conrad KL, McCutcheon JE, Cotterly LM, Ford KA, Beales M, Marinelli M (2010) Persistent increases in cocaine-seeking behavior after acute exposure to cold swim stress. *Biol Psychiatry* 68: 303-5
- Corominas-Roso M, Palomar G, Ferrer R, Real A, Nogueira M, Corrales M, Casas M, Ramos-Quiroga JA (2015) Cortisol Response to Stress in Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 18 (in press)
- Couceyro P, Pollock KM, Drews K, Douglass J (1994) Cocaine differentially regulates activator protein-1 mRNA levels and DNA-binding complexes in the rat striatum and cerebellum. *Mol Pharmacol* 46: 667-76
- Crawford CA, Villafranca SW, Cyr MC, Farley CM, Reichel CM, Gheorghe SL, Krall CM, McDougall SA (2007) Effects of early methylphenidate exposure on morphine- and sucrose-reinforced behaviors in adult rats: relationship to dopamine D2 receptors. *Brain Res* 1139: 245-53
- Crosbie J, Arnold P, Paterson A, Swanson J, Dupuis A, Li X, Shan J, Goodale T, Tam C, Strug LJ, Schachar RJ (2013) Response inhibition and ADHD traits: correlates and heritability in a community sample. *J Abnorm Child Psychol* 41: 497-507
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I (2005) Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 547-69
- 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
- Dallman MF, Engeland WC, Rose JC, Wilkinson CW, Shinsako J, Siedenburg F (1978) Nycthemeral rhythm in adrenal responsiveness to ACTH. *Am J Physiol* 235: R210-8
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2000) Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res* 114: 175-81
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2002) Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav Brain Res* 129: 187-95
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2003) Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 28: 992-1009

- Darlington DN, Barraclough CA, Gann DS (1992) Hypotensive hemorrhage elevates corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) but not vasopressin mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 130: 1281-8
- David HN, Dhilly M, Degoulet M, Poisnel G, Meckler C, Vallee N, Blatteau JE, Risso JJ, Lemaire M, Debruyne D, Abiraini JH (2015) Argon blocks the expression of locomotor sensitization to amphetamine through antagonism at the vesicular monoamine transporter-2 and mu-opioid receptor in the nucleus accumbens. *Transl Psychiatry* 5: e594
- Daviu N, Delgado-Morales R, Nadal R, Armario A (2012) Not all stressors are equal: behavioral and endocrine evidence for development of contextual fear conditioning after a single session of footshocks but not of immobilization. *Front Behav Neurosci* 6: 69
- 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. *Neurobiol Learn Mem* 94: 183-90
- Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A (2014) Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 17: 176-85
- Day HE, Badiani A, Uslaner JM, Oates MM, Vittoz NM, Robinson TE, Watson SJ, Jr., Akil H (2001) Environmental novelty differentially affects c-fos mRNA expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J Neurosci* 21: 732-40
- Day HE, Kryskow EM, Nyhuis TJ, Herlihy L, Campeau S (2008) Conditioned fear inhibits c-fos mRNA expression in the central extended amygdala. *Brain Res* 1229: 137-46
- Day HE, Masini CV, Campeau S (2004) The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res* 1025: 139-51
- Day HE, Nebel S, Sasse S, Campeau S (2005) Inhibition of the central extended amygdala by loud noise and restraint stress. *Eur J Neurosci* 21: 441-54
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14: 1143-52
- Dayas CV, Buller KM, Day TA (1999) Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci* 11: 2312-22
- Dayas CV, Day TA (2002) Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci* 15: 1712-8
- de Goeij DC, Jezova D, Tilders FJ (1992) Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 577: 165-8
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301
- de la Pena I, Gonzales EL, de la Pena JB, Kim BN, Han DH, Shin CY, Cheong JH (2015) Individual differences in novelty-seeking behavior in spontaneously hypertensive rats: Enhanced sensitivity to the reinforcing effect of methylphenidate in the high novelty-preferring subpopulation. *J Neurosci Methods* 252: 48-54

- Demarest KT, Riegler GD, Moore KE (1984) Pharmacological manipulation of anterior pituitary dopamine content in the male rat: relationship to serum prolactin concentration and lysosomal enzyme activity. *Endocrinology* 115: 493-500
- Devilbiss DM, Berridge CW (2008) Cognition-enhancing doses of methylphenidate preferentially increase prefrontal cortex neuronal responsiveness. *Biol Psychiatry* 64: 626-35
- Dhabhar FS (2009) Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16: 300-17
- 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: 360-8
- Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7: 69-76
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5274-8
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23: 4850-7
- Diaz-Moran S, Palencia M, Mont-Cardona C, Canete T, Blazquez G, Martinez-Membrives E, Lopez-Aumatell R, Tobena A, Fernandez-Teruel A (2012) Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman rat strains. *Behav Brain Res* 228: 203-10
- Dielenberg RA, Carrive P, McGregor IS (2001) The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Res* 897: 228-37
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13: 3839-47
- Do Couto BR, Rodriguez-Arias M, Fuentes S, Gagliano H, Armario A, Minarro J, Aguilar MA (2011) Adolescent pre-exposure to ethanol or MDMA prolongs the conditioned rewarding effects of MDMA. *Physiol Behav* 103: 585-93
- Dommett EJ (2014) Using the five-choice serial reaction time task to examine the effects of atomoxetine and methylphenidate in the male spontaneously hypertensive rat. *Pharmacol Biochem Behav* 124: 196-203
- Dommett EJ, Henderson EL, Westwell MS, Greenfield SA (2008) Methylphenidate amplifies long-term plasticity in the hippocampus via noradrenergic mechanisms. *Learn Mem* 15: 580-6
- DSM-V (2014) Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos mentales. Edn American Psychiatric Association. Editorial Médica Panamericana S.A. (5ta ed)
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996) Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713: 79-91
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 402-8
- Eagle DM, Tufft MR, Goodchild HL, Robbins TW (2007) Differential effects of modafinil and methylphenidate on stop-signal reaction time task performance in the rat, and interactions with the dopamine receptor antagonist cis-flupenthixol. *Psychopharmacology* 192: 193-206

- Edwards AV, Jones CT (1993) Autonomic control of adrenal function. *J Anat* 183 (Pt 2): 291-307
- Emmert MH, Herman JP (1999) Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res* 845: 60-7
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25: 132-49
- Erb S, Salmaso N, Rodaros D, Stewart J (2001) A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 158: 360-5
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Hollt V (1999) Acute injection of drugs with low addictive potential (delta(9)-tetrahydrocannabinol, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diamide) causes a much higher c-fos expression in limbic brain areas than highly addicting drugs (cocaine and morphine). *Brain Res Mol Brain Res* 71: 313-24
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP (2010) Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151: 4811-9
- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22: 3312-20
- Fair DA, Bathula D, Nikolas MA, Nigg JT (2012) Distinct neuropsychological subgroups in typically developing youth inform heterogeneity in children with ADHD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6769-74
- Fairchild G, van Goozen SH, Stollery SJ, Brown J, Gardiner J, Herbert J, Goodyer IM (2008) Cortisol diurnal rhythm and stress reactivity in male adolescents with early-onset or adolescence-onset conduct disorder. *Biol Psychiatry* 64: 599-606
- Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E, Doyle AE (2000) Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry* 48: 9-20
- Ferguson SA, Boctor SY (2010) Cocaine responsiveness or anhedonia in rats treated with methylphenidate during adolescence. *Neurotoxicol Teratol* 32: 432-42
- Ferguson SM, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003) Amphetamine-evoked c-fos mRNA expression in the caudate-putamen: the effects of DA and NMDA receptor antagonists vary as a function of neuronal phenotype and environmental context. *J Neurochem* 86: 33-44
- Fernando AB, Economidou D, Theobald DE, Zou MF, Newman AH, Spoelder M, Caprioli D, Moreno M, Hipolito L, Aspinall AT, Robbins TW, Dalley JW (2012) Modulation of high impulsivity and attentional performance in rats by selective direct and indirect dopaminergic and noradrenergic receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 219: 341-52
- 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. *Eur J Neurosci* 18: 2357-64
- Finke K, Dodds CM, Bublak P, Regenthal R, Baumann F, Manly T, Muller U (2010) Effects of modafinil and methylphenidate on visual attention capacity: a TVA-based study. *Psychopharmacology (Berl)* 210: 317-29

- Fleshner M, Deak T, Spencer RL, Laudenslager ML, Watkins LR, Maier SF (1995) A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* 136: 5336-42
- Foilib AR, Lui P, Romeo RD (2011) The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *J Endocrinol* 210: 391-8
- Forray MI, Gysling K (2004) Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 145-60
- Fredriksen M, Halmoy A, Faraone SV, Haavik J (2013) Long-term efficacy and safety of treatment with stimulants and atomoxetine in adult ADHD: a review of controlled and naturalistic studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 508-27
- Freitag CM, Hanig S, Palmason H, Meyer J, Wust S, Seitz C (2009) Cortisol awakening response in healthy children and children with ADHD: impact of comorbid disorders and psychosocial risk factors. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1019-28
- Frolov A, Reyes-Vasquez C, Dafny N (2015) Behavioral and neuronal recording of the nucleus accumbens in adolescent rats following acute and repetitive exposure to methylphenidate. *J Neurophysiol* 113: 369-79
- Gagliano H, Andero R, Armario A, Nadal R (2009) Repeated amphetamine administration in rats revealed consistency across days and a complete dissociation between locomotor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis effects of the drug. *Psychopharmacology* 207: 447-59
- Gagliano H, Fuentes S, Nadal R, Armario A (2008) Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. *Behav Brain Res* 187: 239-45
- Gagliano H, Nadal R, Armario A (2014) Sex differences in the long-lasting effects of a single exposure to immobilization stress in rats. *Horm Behav* 66: 793-801
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A (2000) Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72: 114-25
- Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL (2003) Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 15: 1075-83
- Gispén-de Wied CC, Jansen LM, Wynne HJ, Matthys W, van der Gaag RJ, Thijssen JH, van Engeland H (1998) Differential effects of hydrocortisone and dexamethasone on cortisol suppression in a child psychiatric population. *Psychoneuroendocrinology* 23: 295-306
- Goeders NE (2003) The impact of stress on addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 435-41
- Goldstein DS, Kopin IJ (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10: 109-20
- Goldstein DS, McEwen B (2002) Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 5: 55-8
- Gómez-Román A (2011) La exposición simultánea al estrés y a la anfetamina revela sinergias negativas que afectan a la respuesta neuroendocrina y a la activación del sistema nervioso central Instituto de Neurociencias. UAB, Barcelona

- Gomez-Roman A, Ortega-Sanchez JA, Rotllant D, Gagliano H, Belda X, Delgado-Morales R, Marin-Blasco I, Nadal R, Armario A (2016) The neuroendocrine response to stress under the effect of drugs: Negative synergy between amphetamine and stressors. *Psychoneuroendocrinology* 63: 94-101
- Grahn RE, Kalman BA, Brennan FX, Watkins LR, Maier SF (1995) The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 565-70
- Grattan DR (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol* 226: T101-22
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6912-6
- Greeley GH, Jr., Kizer JS (1980) The effects of chronic methylphenidate treatment on growth and endocrine function in the developing rat. *J Pharmacol Exp Ther* 215: 545-51
- Grissom NM, Bhatnagar S (2011) The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via beta-adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience* 178: 108-22
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2011) Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol* 209: 153-67
- Gronier B (2011) In vivo electrophysiological effects of methylphenidate in the prefrontal cortex: involvement of dopamine D1 and alpha 2 adrenergic receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: 192-204
- Gronier B, Aston J, Liauzun C, Zetterstrom T (2010) Age-dependent effects of methylphenidate in the prefrontal cortex: evidence from electrophysiological and Arc gene expression measurements. *J Psychopharmacol* 24: 1819-27
- Guerra A, Soares RM, Pezzi F, Karkow FJ, Faintuch J (2015) Nutritional, metabolic and cardiovascular correlations of morning cortisol in health care workers in a gastroenterology service. *Arq Gastroenterol* 52: 88-93
- Guillazo-Blanch G, Nadal R, Vale-Martinez A, Marti-Nicolovius M, Arevalo R, Morgado-Bernal I (2002) Effects of fimbria lesions on trace two-way active avoidance acquisition and retention in rats. *Neurobiol Learn Mem* 78: 406-25
- Haleem DJ, Inam QU, Haleem MA (2015) Effects of clinically relevant doses of methylphenidate on spatial memory, behavioral sensitization and open field habituation: a time related study. *Behav Brain Res* 281: 208-14
- Haller J, Mikics E, Makara GB (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol* 29: 273-91
- Han DD, Gu HH (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 6: 6-13
- Hannestad J, Gallezot JD, Planeta-Wilson B, Lin SF, Williams WA, van Dyck CH, Malison RT, Carson RE, Ding YS (2010) Clinically relevant doses of methylphenidate significantly occupy norepinephrine transporters in humans in vivo. *Biol Psychiatry* 68: 854-60
- Harbuz MS, Lightman SL (1989) Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol* 122: 705-11

- Hardin, Hilbe (2003) Generalized estimating equations. Chapman & Hall/CRC, Boca Ratón. Florida
- Hauger RL, Millan MA, Lorang M, Harwood JP, Aguilera G (1988) Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 123: 396-405
- Hawken CM, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M (2004) Long-term methylphenidate treatment down-regulates c-fos in the striatum of male CD-1 mice. *Neuroreport* 15: 1045-8
- Heal DJ, Buckley NW, Gosden J, Slater N, France CP, Hackett D (2013) A preclinical evaluation of the discriminative and reinforcing properties of lisdexamfetamine in comparison to D-amphetamine, methylphenidate and modafinil. *Neuropharmacology* 73: 348-58
- Heal DJ, Gosden J, Smith SL (2014) Dopamine reuptake transporter (DAT) "inverse agonism"--a novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. *Neuropharmacology* 87: 19-40
- Hemby SE, Lucki I, Gatto G, Singh A, Thornley C, Matasi J, Kong N, Smith JE, Davies HM, Dworkin SI (1997) Potential antidepressant effects of novel tropane compounds, selective for serotonin or dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 727-33
- Hennessy MB, Levine S (1978) Sensitive pituitary-adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol Behav* 21: 295-7
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28: 370-490
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20: 78-84
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (1994) Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6: 433-42
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-80
- Herman JP, Mueller NK (2006) Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav Brain Res* 174: 215-24
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1201-13
- Herman JP, Schafer MK, Thompson RC, Watson SJ (1992) Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol* 6: 1061-9
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50: 83-107
- Hirvikoski T, Lindholm T, Nordenstrom A, Nordstrom AL, Lajic S (2009) High self-perceived stress and many stressors, but normal diurnal cortisol rhythm, in adults with ADHD (attention-deficit/hyperactivity disorder). *Horm Behav* 55: 418-24
- Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 14: 259-68

- Hollon NG, Burgeno LM, Phillips PE (2015) Stress effects on the neural substrates of motivated behavior. *Nat Neurosci* 18: 1405-12
- Hong HJ, Shin DW, Lee EH, Oh YH, Noh KS (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Yonsei Med J* 44: 608-14
- Honkaniemi J, Kainu T, Ceccatelli S, Rechardt L, Hokfelt T, Peltö-Huikko M (1992) Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Neuroreport* 3: 849-52
- Huang-Pollock CL, Karalunas SL, Tam H, Moore AN (2012) Evaluating vigilance deficits in ADHD: a meta-analysis of CPT performance. *J Abnorm Psychol* 121: 360-71
- Hungund BL, Perel JM, Hurwic MJ, Sverd J, Winsberg BG (1979) Pharmacokinetics of methylphenidate in hyperkinetic children. *Br J Clin Pharmacol* 8: 571-6
- Ikemoto S, Goeders NE (1998) Microinjections of dopamine agonists and cocaine elevate plasma corticosterone: dissociation effects among the ventral and dorsal striatum and medial prefrontal cortex. *Brain Res* 814: 171-8
- Imaki T, Shibasaki T, Demura H (1995) Regulation of gene expression in the central nervous system by stress: molecular pathways of stress responses. *Endocr J* 42: 121-30
- Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H (1992) Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology* 131: 240-6
- Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H (1993) Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Res* 616: 114-25
- Isaksson J, Hogmark A, Nilsson KW, Lindblad F (2013) Effects of stimulants and atomoxetine on cortisol levels in children with ADHD. *Psychiatry Res* 209: 740-1
- Isaksson J, Nilsson KW, Nyberg F, Hogmark A, Lindblad F (2012) Cortisol levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Psychiatr Res* 46: 1398-405
- Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ (2004) Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16: 348-55
- Jacobsen L, Southwick S, Kosten T (2001) Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of literature. *Am J psychiatry* 158:1184-90
- Jacobson L, Sapolsky R (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12: 118-34
- Jaferi A, Bhatnagar S (2006) Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in animals that habituate to repeated stress. *Endocrinology* 147: 4917-30
- Jankord R, Herman JP (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 64-73
- Jansen LM, Gispen-de Wied CC, Jansen MA, van der Gaag RJ, Matthys W, van Engeland H (1999) Pituitary-adrenal reactivity in a child psychiatric population: salivary cortisol response to stressors. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 67-75

- Jariel-Encontre I, Salvat C, Steff AM, Pariat M, Acquaviva C, Furstoss O, Piechaczyk M (1997) Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Mol Biol Rep* 24: 51-6
- Johansson B, Lindstrom K, Fredholm BB (1994) Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger RNA induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat. *Neuroscience* 59: 837-49
- Johansson L, Guo X, Hallstrom T, Norton MC, Waern M, Ostling S, Bengtsson C, Skoog I (2013) Common psychosocial stressors in middle-aged women related to longstanding distress and increased risk of Alzheimer's disease: a 38-year longitudinal population study. *BMJ Open* 3: e003142
- Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL (1996) Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 183-91
- Jones KR, Myers B, Herman JP (2011) Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. *Physiol Behav* 104: 266-71
- Jones Z, Dafny N (2013) Dose response effect of methylphenidate on ventral tegmental area neurons and animal behavior. *Brain Res Bull* 96: 86-92
- Joyce PR, Donald RA, Nicholls MG, Livesey JH, Abbott RM (1986) Endocrine and behavioral responses to methylphenidate in normal subjects. *Biol Psychiatry* 21: 1015-23
- Kandel DB, Johnson JG, Bird HR, Canino G, Goodman SH, Lahey BB, Regier DA, Schwab-Stone M (1997) Psychiatric disorders associated with substance use among children and adolescents: findings from the Methods for the Epidemiology of Child and Adolescent Mental Disorders (MECA) Study. *J Abnorm Child Psychol* 25: 121-32
- Kaneko M, Hoshino Y, Hashimoto S, Okano T, Kumashiro H (1993) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Autism Dev Disord* 23: 59-65
- Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH (1987) Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 40: 775-9
- Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN, 3rd, Wright WL, Covington PS (1995) Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 57: 359-65
- Kariyawasam SH, Zaw F, Handley SL (2002) Reduced salivary cortisol in children with comorbid Attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 23: 45-8
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-6
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5: 1-24
- Keller-Wood ME, Shinsako J, Dallman MF (1983) Integral as well as proportional adrenal responses to ACTH. *Am J Physiol* 245: R53-9
- Kim J, Lee Y, Han D, Min K, Kim D, Lee C (2015) The utility of quantitative electroencephalography and Integrated Visual and Auditory Continuous Performance Test as auxiliary tools for the Attention Deficit Hyperactivity Disorder diagnosis. *Clin Neurophysiol* 126: 532-40
- King CA, Ghaziuddin N, McGovern L, Brand E, Hill E, Naylor M (1996) Predictors of comorbid alcohol and substance abuse in depressed adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 743-51
- Kinn Rod AM, Milde AM, Gronli J, Jellestad FK, Sundberg H, Murison R (2012) Long-term effects of foot-shock and social defeat on anxiety-like behaviours in rats: relationships to pre-stressor plasma corticosterone concentration. *Stress* 15: 658-70

- Knardahl S, Murison R (1989) Plasma corticosterone and renin activity during two-way active avoidance learning in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Behav Neural Biol* 51: 389-400
- Knych ET, Eisenberg RM (1979) Effect of amphetamine on plasma corticosterone in the conscious rat. *Neuroendocrinology* 29: 110-8
- Koda K, Ago Y, Cong Y, Kita Y, Takuma K, Matsuda T (2010) Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *J Neurochem* 114: 259-70
- Koffarnus MN, Katz JL (2011) Response requirement and increases in accuracy produced by stimulant drugs in a 5-choice serial reaction-time task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 213: 723-33
- Koob GF (2010) The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 1314: 3-14
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-8
- Koob GF, Le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci* 8: 1442-4
- Koob GF, Nestler EJ (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9: 482-97
- Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* 21: 467-76
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wohr M, Fuchs E (2011) Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1291-301
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 925-35
- Korosi A, Baram TZ (2008) The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol* 583: 204-14
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 3-38
- Kovacs, Miklos, Bali (2005) Psychological and physiological stressors. In: Steckler T (ed) *Handbook of stress and the brain*. Elsevier, Baltimore, pp 775-792
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33: 287-97
- Kovacs KJ, Sawchenko PE (1996) Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16: 262-73
- Kreek MJ, Koob GF (1998) Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51: 23-47
- Kuczenski R, Segal DS (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem* 68: 2032-7
- Kuczenski R, Segal DS (2002) Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci* 22: 7264-71

- Kuperman Y, Chen A (2008) Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 19: 122-9
- Lackschewitz H, Huthner G, Kroner-Herwig B (2008) Physiological and psychological stress responses in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Psychoneuroendocrinology* 33: 612-24
- Lagace DC, Yee JK, Bolanos CA, Eisch AJ (2006) Juvenile administration of methylphenidate attenuates adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 60: 1121-30
- LaHoste GJ, Henry BL, Marshall JF (2000) Dopamine D1 receptors synergize with D2, but not D3 or D4, receptors in the striatum without the involvement of action potentials. *J Neurosci* 20: 6666-71
- Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, Camins A, Pallas M, Armario A, Escorihuela RM (2012) Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1745-54
- Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C (2008) The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. *J Neurosci* 28: 407-14
- Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behav Brain Res* 145: 89-98
- Lazarus, Folkman (1986) *Estrés y Procesos cognitivos*. Diagràfic, S.A., Diagràfic, S.A.
- Lazarus RS (1993) From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol* 44: 1-21
- Le Moal M, Koob GF (2007) Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 17: 377-93
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155-84
- Lee MS, Yang JW, Ko YH, Han C, Kim SH, Lee MS, Joe SH, Jung IK (2008) Effects of methylphenidate and bupropion on DHEA-S and cortisol plasma levels in attention-deficit hyperactivity disorder. *Child Psychiatry Hum Dev* 39: 201-9
- Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ (2007) Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. *Eur J Neurosci* 25: 1278-86
- Levant B, Zarcone TJ, Davis PF, Ozias MK, Fowler SC (2011) Differences in methylphenidate dose response between periadolescent and adult rats in the familiar arena-novel alcove task. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 83-91
- Levin ED, Bushnell PJ, Rezvani AH (2011) Attention-modulating effects of cognitive enhancers. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 146-54
- Levin N, Blum M, Roberts JL (1989) Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 125: 2957-66
- Li HY, Ericsson A, Sawchenko PE (1996) Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2359-64
- Li HY, Sawchenko PE (1998) Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *J Comp Neurol* 393: 244-66

- Linssen AM, Vuurman EF, Sambeth A, Riedel WJ (2012) Methylphenidate produces selective enhancement of declarative memory consolidation in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 221: 611-9
- Linssen A, Sambeth A, Vuurman E, Riedel W (2014) Cognitive effects of methylphenidate in healthy volunteers: a review of single dose studies. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:961-77
- Lopez-Calderon A, Ariznavarreta C, Calderon MD, Tresguerres JA, Gonzalez-Quijano MI (1989) Role of the adrenal cortex in chronic stress-induced inhibition of prolactin secretion in male rats. *J Endocrinol* 120: 269-73
- Lu, Shaham (2005) The role of stress in opiate and psychostimulant addiction: evidence from animal models. In: Steckler, Kalin, Reul (eds) *Handbook of stress and brain*. Elsevier, Baltimore
- Lu L, Shepard JD, Hall FS, Shaham Y (2003) Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 457-91
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G (1994) Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J Neurosci* 14: 4825-30
- 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. *Physiol Behav* 107: 104-11
- Ma L, Chen YH, Chen H, Liu YY, Wang YX (2011) The function of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in children with ADHD. *Brain Res* 1368: 159-62
- Ma XM, Aguilera G (1999) Transcriptional responses of the vasopressin and corticotropin-releasing hormone genes to acute and repeated intraperitoneal hypertonic saline injection in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 68: 129-40
- Maayan R, Yoran-Hegesh R, Strous R, Nechmad A, Averbuch E, Weizman A, Spivak B (2003) Three-month treatment course of methylphenidate increases plasma levels of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 48: 111-5
- Maclean RR, Datta S (2007) The relationship between anxiety and sleep-wake behavior after stressor exposure in the rat. *Brain Res* 1164: 72-80
- Mague SD, Andersen SL, Carlezon WA, Jr. (2005) Early developmental exposure to methylphenidate reduces cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward in rats. *Biol Psychiatry* 57: 120-5
- Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 829-41
- Makara GB, Haller J (2001) Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 65: 367-90
- Makara GB, Mergl Z, Zelena D (2004) The role of vasopressin in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation during stress: an assessment of the evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 151-61
- Maldonado EF, Trianes MV, Cortes A, Moreno E, Escobar M (2009) Salivary cortisol response to a psychosocial stressor on children diagnosed with attention-deficit/hyperactivity disorder: differences between diagnostic subtypes. *Span J Psychol* 12: 707-14
- Mantsch JR, Baker DA, Funk D, Le AD, Shaham Y (2015) Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology* (in press)

- Marquez C, Belda X, Armario A (2002) Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res* 926: 181-5
- Marti J, Armario A (1993) Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. *Eur J Pharmacol* 236: 295-9
- Marti O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16: 241-60
- Marti O, Garcia A, Valles A, Harbuz MS, Armario A (2001) Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *Eur J Neurosci* 13: 129-36
- Marti O, Marti J, Armario A (1994) Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55: 747-53
- Marusich JA, Bardo MT (2009) Differences in impulsivity on a delay-discounting task predict self-administration of a low unit dose of methylphenidate in rats. *Behav Pharmacol* 20: 447-54
- Marusich JA, Beckmann JS, Gipson CD, Bardo MT (2010) Methylphenidate as a reinforcer for rats: contingent delivery and intake escalation. *Exp Clin Psychopharmacol* 18: 257-66
- Masini CV, Sasse SK, Garcia RJ, Nyhuis TJ, Day HE, Campeau S (2009) Disruption of neuroendocrine stress responses to acute ferret odor by medial, but not central amygdala lesions in rats. *Brain Res* 1288: 79-87
- Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* 8: 323-33
- Matochik JA, Liebenauer LL, King AC, Szymanski HV, Cohen RM, Zametkin AJ (1994) Cerebral glucose metabolism in adults with attention deficit hyperactivity disorder after chronic stimulant treatment. *Am J Psychiatry* 151: 658-64
- McCulloch, Seorle (2001) *Generalized linear and mixed models*. New York Eds. Willey and Sons.
- McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ (2004) Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci* 20: 2430-40
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886: 172-189
- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C (2015) Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* 18: 1353-63
- McFadyen MP, Brown RE, Carrey N (2002) Subchronic methylphenidate administration has no effect on locomotion, emotional behavior, or water maze learning in prepubertal mice. *Dev Psychobiol* 41: 123-32
- McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H (1999) The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci* 6: 289-301
- Mendelson JH, Mello NK (1996) Management of cocaine abuse and dependence. *N Engl J Med* 334: 965-72
- Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV (1982) Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat* 165: 385-96
- Merino JJ, Cordero MI, Sandi C (2000) Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur J Neurosci* 12: 3283-90

- Milstein JA, Dalley JW, Robbins TW (2010) Methylphenidate-induced impulsivity: pharmacological antagonism by beta-adrenoreceptor blockade. *J Psychopharmacol* 24: 309-21
- Miyamoto S, Snouwaert JN, Koller BH, Moy SS, Lieberman JA, Duncan GE (2004) Amphetamine-induced Fos is reduced in limbic cortical regions but not in the caudate or accumbens in a genetic model of NMDA receptor hypofunction. *Neuropsychopharmacology* 29: 2180-8
- Moeller SJ, Honorio J, Tomasi D, Parvaz MA, Woicik PA, Volkow ND, Goldstein RZ (2014) Methylphenidate enhances executive function and optimizes prefrontal function in both health and cocaine addiction. *Cereb Cortex* 24: 643-53
- Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER, Datson NA (2006) Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J Neuroendocrinol* 18: 239-52
- Mostert JC, Hoogman M, Onnink AM, van Rooij D, von Rhein D, van Hulzen KJ, Dammers J, Kan CC, Buitelaar JK, Norris DG, Franke B (2015) Similar Subgroups Based on Cognitive Performance Parse Heterogeneity in Adults With ADHD and Healthy Controls. *J Atten Disord* (in press)
- Munoz-Abellan C, Andero R, Nadal R, Armario A (2008) Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1139-50
- Munoz-Abellan C, Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A (2009) Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. *Horm Behav* 56: 465-71
- Murphy P (2002) Inhibitory control in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord* 6: 1-4
- Nash JF, Jr., Meltzer HY, Gudelsky GA (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 873-9
- Natelson BH, Tapp WN, Adamus JE, Mittler JC, Levin BE (1981) Humoral indices of stress in rats. *Physiol Behav* 26: 1049-54
- Nikulina EM, Covington HE, 3rd, Ganschow L, Hammer RP, Jr., Miczek KA (2004) Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience* 123: 857-65
- Nikulina EM, Marchand JE, Kream RM, Miczek KA (1998) Behavioral sensitization to cocaine after a brief social stress is accompanied by changes in fos expression in the murine brainstem. *Brain Res* 810: 200-10
- Nishi M, Kawata M (2007) Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies. *Neuroendocrinology* 85: 186-92
- Noda Y, Kamei H, Mamiya T, Furukawa H, Nabeshima T (2000) Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. *Neuropsychopharmacology* 23: 375-87
- O'Brien CP (1997) A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* 278: 66-70
- Ogilvie KM, Lee S, Rivier C (1998) Divergence in the expression of molecular markers of neuronal activation in the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus evoked by alcohol administration via different routes. *J Neurosci* 18: 4344-52

- Ohta R, Shirota M, Adachi T, Tohei A, Taya K (1999) Plasma ACTH levels during early, two-way avoidance acquisition in high- and low-avoidance rats (Hatano strains). *Behav Genet* 29: 137-44
- Olschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM (1982) The distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides* 3: 995-1015
- Ons S, Marti O, Armario A (2004) Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *J Neurochem* 89: 1111-8
- Ostrander MM, Badiani A, Day HE, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003) Environmental context and drug history modulate amphetamine-induced c-fos mRNA expression in the basal ganglia, central extended amygdala, and associated limbic forebrain. *Neuroscience* 120: 551-71
- Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22: 502-48
- Pace TW, Gaylord R, Topczewski F, Girotti M, Rubin B, Spencer RL (2005) Immediate-early gene induction in hippocampus and cortex as a result of novel experience is not directly related to the stressfulness of that experience. *Eur J Neurosci* 22: 1679-90
- Palma SM, Fernandes DR, Muszkat M, Calil HM (2012) The response to stress in Brazilian children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 198: 477-81
- Papa M, Diewald L, Carey MP, Esposito FJ, Gironi Carnevale UA, Sadile AG (2002) A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. *Behav Brain Res* 130: 171-9
- Paterson NE, Ricciardi J, Wetzler C, Hanania T (2012a) Sub-optimal performance in the 5-choice serial reaction time task in rats was sensitive to methylphenidate, atomoxetine and d-amphetamine, but unaffected by the COMT inhibitor tolcapone. *Neurosci Res* 69: 41-50
- Paterson NE, Wetzler C, Hackett A, Hanania T (2012b) Impulsive action and impulsive choice are mediated by distinct neuropharmacological substrates in rat. *Int J Neuropsychopharmacol* 15: 1473-87
- Pattij T, Schetters D, Schoffelmeer AN, van Gaalen MM (2012) On the improvement of inhibitory response control and visuospatial attention by indirect and direct adrenoceptor agonists. *Psychopharmacology* 219: 327-40
- Pauli-Pott U, Becker K (2015) Time windows matter in ADHD-related developing neuropsychological basic deficits: A comprehensive review and meta-regression analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 55: 165-72
- Pauls AM, O'Daly OG, Rubia K, Riedel WJ, Williams SC, Mehta MA (2012) Methylphenidate effects on prefrontal functioning during attentional-capture and response inhibition. *Biol Psychiatry* 72: 142-9
- Pelham WE, Gnagy EM, Chronis AM, Burrows-MacLean L, Fabiano GA, Onyango AN, Meichenbaum DL, Williams A, Aronoff HR, Steiner RL (1999) A comparison of morning-only and morning/late afternoon Adderall to morning-only, twice-daily, and three times-daily methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 104: 1300-11
- Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 525-9
- Penner MR, McFadyen MP, Pinaud R, Carrey N, Robertson HA, Brown RE (2002) Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of CD-1 mice after acute methylphenidate administration. *Brain Res Dev Brain Res* 135: 71-7

- Pesonen A, Kajantie E, Jones A, Pyhälä R, Lahti J, Heinonen K, Eriksson J, Strandberg T, Räikkönen K (2011) Symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in children are associated with cortisol responses to psychosocial stress but not with daily cortisol levels. *Journal of Psychiatric Research* 45:1471-76
- Perry JL, Carroll ME (2008) The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology* 200: 1-26
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, Uhl GR (1993) Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Brain Res Mol Brain Res* 20: 91-100
- Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106: 274-85
- Piazza PV, Le Moal M (1997) Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 359-72
- Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19: 67-74
- Pickens CL, Golden SA, Adams-Deutsch T, Nair SG, Shaham Y (2009) Long-lasting incubation of conditioned fear in rats. *Biol Psychiatry* 65: 881-6
- Plotsky PM (1991) Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal*. *J Neuroendocrinol* 3: 1-9
- 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. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 407-12
- Porsolt RD (1979) Animal model of depression. *Biomedicine* 30: 139-40
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-2
- Rabasa C, Gagliano H, Pastor-Ciurana J, Fuentes S, Belda X, Nadal R, Armario A (2015) Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 56: 35-49
- Rabasa C, Munoz-Abellan 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. *Physiol Behav* 103: 125-33
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26: 12967-76
- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009) A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29: 7330-40
- Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J (1998) Generalization of fear responses in C57BL/6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 95: 179-89
- Raune D, Kuipers E, Bebbington P (2009) Stressful and intrusive life events preceding first episode psychosis. *Epidemiol Psychiatr Soc* 18: 221-8
- Raz S, Leykin D (2015) Psychological and cortisol reactivity to experimentally induced stress in adults with ADHD. *Psychoneuroendocrinology* 60: 7-17
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* 22: 659-61

- Redila VA, Chavkin C (2008) Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacology* 200: 59-70
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-11
- Rezvani AH, Kholdebarin E, Cauley MC, Dawson E, Levin ED (2009) Attenuation of pharmacologically-induced attentional impairment by methylphenidate in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 141-6
- Richter RM, Weiss F (1999) In vivo CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse* 32: 254-61
- Rio-Alamos C, Oliveras I, Canete T, Blazquez G, Martinez-Membrives E, Tobena A, Fernandez-Teruel A (2015) Neonatal handling decreases unconditioned anxiety, conditioned fear, and improves two-way avoidance acquisition: a study with the inbred Roman high (RHA-I)- and low-avoidance (RLA-I) rats of both sexes. *Front Behav Neurosci* 9: 174
- Risold PY, Swanson LW (1997a) Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 91-113
- Risold PY, Swanson LW (1997b) Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 115-95
- Rivier C, Lee S (1994) Stimulatory effect of cocaine on ACTH secretion: role of the hypothalamus. *Mol Cell Neurosci* 5: 189-95
- Rivier C, Vale W (1983) Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305: 325-7
- Rivier C, Vale W (1987) Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology* 121: 1320-8
- Robbins TW (2002) The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)* 163: 362-80
- Robertson LM, Kerppola TK, Vendrell M, Luk D, Smeyne RJ, Bocchiaro C, Morgan JI, Curran T (1995) Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron* 14: 241-52
- Robinson ES (2012) Blockade of noradrenaline re-uptake sites improves accuracy and impulse control in rats performing a five-choice serial reaction time tasks. *Psychopharmacology (Berl)* 219: 303-12
- Roland BL, Sawchenko PE (1993) Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 332: 123-43
- Romeo RD, Ali FS, Karatsoreos IN, Bellani R, Chhua N, Vernov M, McEwen BS (2008) Glucocorticoid receptor mRNA expression in the hippocampal formation of male rats before and after pubertal development in response to acute or repeated stress. *Neuroendocrinology* 87: 160-7
- 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: 1664-74
- Romeo RD, Karatsoreos IN, Ali FS, McEwen BS (2007) The effects of acute stress and pubertal development on metabolic hormones in the rat. *Stress* 10: 101-6

- Romeo RD, Karatsoreos IN, McEwen BS (2006b) Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm Behav* 50: 463-8
- 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: 125-32
- Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS (2004b) Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 80: 387-93
- Romero LM, Sapolsky RM (1996) Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol* 8: 243-58
- Rotllant D, Marquez C, Nadal R, Armario A (2010) The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience* 168: 691-705
- Rotllant D, Nadal R, Armario A (2007) Differential effects of stress and amphetamine administration on Fos-like protein expression in corticotropin releasing factor-neurons of the rat brain. *Dev Neurobiol* 67: 702-14
- Rotllant D, Pastor-Ciurana J, Armario A (2013) Stress-induced brain histone H3 phosphorylation: contribution of the intensity of stressors and length of exposure. *J Neurochem* 125: 599-609
- Rozas C, Carvallo C, Contreras D, Carreno M, Ugarte G, Delgado R, Zeise ML, Morales B (2015) Methylphenidate amplifies long-term potentiation in rat hippocampus CA1 area involving the insertion of AMPA receptors by activation of beta-adrenergic and D1/D5 receptors. *Neuropharmacology* 99: 15-27
- Rudy JW (1993) Contextual conditioning and auditory cue conditioning dissociate during development. *Behav Neurosci* 107: 887-91
- Rush CR, Essman WD, Simpson CA, Baker RW (2001) Reinforcing and subject-rated effects of methylphenidate and d-amphetamine in non-drug-abusing humans. *J Clin Psychopharmacol* 21: 273-86
- Russig H, Pezze MA, Nanz-Bahr NI, Pryce CR, Feldon J, Murphy CA (2003) Amphetamine withdrawal does not produce a depressive-like state in rats as measured by three behavioral tests. *Behav Pharmacol* 14: 1-18
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1987) Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. *J Comp Neurol* 260: 256-98
- Sandi C, Venero C, Guaza C (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8: 794-800
- Sapolsky RM (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci* 18: 1344-6
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89
- Sarnyai Z, Biro E, Penke B, Telegdy G (1992) The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. *Brain Res* 589: 154-6
- Sarnyai Z, Biro E, Telegdy G (1993) Cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by different neurotransmitter systems in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 209-14

- Sassone-Corsi P, Sisson JC, Verma IM (1988) Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334: 314-9
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A (2000) Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 122: 61-78
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218: 121-44
- Schaefer TL, Ehrman LA, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT (2006) Comparison of monoamine and corticosterone levels 24 h following (+)methamphetamine, (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine, cocaine, (+)fenfluramine or (+/-)methylphenidate administration in the neonatal rat. *J Neurochem* 98: 1369-78
- Schmidt ED, Schoffemeer AN, De Vries TJ, Wardeh G, Dogterom G, Bol JG, Binnekade R, Tilders FJ (2001) A single administration of interleukin-1 or amphetamine induces long-lasting increases in evoked noradrenaline release in the hypothalamus and sensitization of ACTH and corticosterone responses in rats. *Eur J Neurosci* 13: 1923-30
- Schmidt ED, Tilders FJ, Binnekade R, Schoffemeer AN, De Vries TJ (1999) Stressor- or drug-induced sensitization of the corticosterone response is not critically involved in the long-term expression of behavioural sensitization to amphetamine. *Neuroscience* 92: 343-52
- Schmidt MJ (1979) Dopamine agonist-induced hyperglycemia in rats: effects of lergotriple mesylate. *Eur J Pharmacol* 59: 95-101
- Schneider F, Baldauf K, Wetzel W, Reymann KG (2014) Effects of methylphenidate on the behavior of male 5xFAD mice. *Pharmacol Biochem Behav* 128: 68-77
- Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A (2014) Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *Faseb J* 29: 859-67
- Segal DS, Kuczenski R (1999) Escalating dose-binge treatment with methylphenidate: role of serotonin in the emergent behavioral profile. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 19-30
- Senba E, Umemoto S, Kawai Y, Noguchi K (1994) Differential expression of fos family and jun family mRNAs in the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis after immobilization stress. *Brain Res Mol Brain Res* 24: 283-94
- Servatius RJ, Ottenweller JE, Natelson BH (1995) Delayed startle sensitization distinguishes rats exposed to one or three stress sessions: further evidence toward an animal model of PTSD. *Biol Psychiatry* 38: 539-46
- Sewer MB, Waterman MR (2003) ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61: 300-7
- Shaham Y, Erb S, Stewart J (2000) Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 13-33
- Shalev U, Erb S, Shaham Y (2010) Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res* 1314: 15-28
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* 54: 1-42

- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-85
- Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG (1989) The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev* 3: 60-72
- Siegmund A, Wotjak CT (2007) A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* 41: 848-60
- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K (2011) The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology* 36: 793-804
- Sinha (2005) *Handbook of stress and brain*. Elsevier, Baltimore
- Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS (2000) Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)* 152: 140-8
- Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324-31
- Slezak JM, Anderson KG (2011) Effects of acute and chronic methylphenidate on delay discounting. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 545-51
- Slezak JM, Katz JL (2013) An influence of delayed reinforcement on the effectiveness of psychostimulants to enhance indices of attention under a five-choice serial reaction time procedure in male rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 21: 355-62
- Slezak JM, Ricourte GA, Tallarida RJ, Katz JL (2014) Methylphenidate and impulsivity: a comparison of effects of methylphenidate enantiomers on delay discounting in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231: 191-8
- Snoek H, Van Goozen SH, Matthys W, Buitelaar JK, van Engeland H (2004) Stress responsivity in children with externalizing behavior disorders. *Dev Psychopathol* 16: 389-406
- Snyder-Keller AM (1991) Striatal c-fos induction by drugs and stress in neonatally dopamine-depleted rats given nigral transplants: importance of NMDA activation and relevance to sensitization phenomena. *Exp Neurol* 113: 155-65
- Spencer RC, Klein RM, Berridge CW (2012) Psychostimulants act within the prefrontal cortex to improve cognitive function. *Biol Psychiatry* 72: 221-7
- Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6517-21
- Sprague RL, Sleator EK (1977) Methylphenidate in hyperkinetic children: differences in dose effects on learning and social behavior. *Science* 198: 1274-6
- Stalder T, Kirschbaum C (2012) Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions. *Brain Behav Immun* 26: 1019-29
- Stamp JA, Herbert J (1999) Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. *Neuroscience* 94: 1313-22
- Steenbergen HL, Farabollini F, Heinsbroek RP, Van de Poll NE (1991) Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav Brain Res* 43: 159-65

- 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
- Steiner H, Gerfen CR (1993) Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci* 13: 5066-81
- Steiner H, Gerfen CR (1995) Dynorphin opioid inhibition of cocaine-induced, D1 dopamine receptor-mediated immediate-early gene expression in the striatum. *J Comp Neurol* 353: 200-12
- Steiner H, Van Waes V (2013) Addiction-related gene regulation: risks of exposure to cognitive enhancers vs. other psychostimulants. *Prog Neurobiol* 100: 60-80
- Stewart J (2000) Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci* 25: 125-36
- Suda T, Tozawa F, Yamada M, Ushiyama T, Tomori N, Sumitomo T, Nakagami Y, Demura H, Shizume K (1988) Insulin-induced hypoglycemia increases corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid levels in rat hypothalamus. *Endocrinology* 123: 1371-5
- Sumner BE, Cruise LA, Slattery DA, Hill DR, Shahid M, Henry B (2004) Testing the validity of c-fos expression profiling to aid the therapeutic classification of psychoactive drugs. *Psychopharmacology* 171: 306-21
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36: 165-86
- Swerdlow NR, Koob GF, Cador M, Lorang M, Hauger RL (1993) Pituitary-adrenal axis responses to acute amphetamine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 629-37
- Tanno T, Maguire DR, Henson C, France CP (2014) Effects of amphetamine and methylphenidate on delay discounting in rats: interactions with order of delay presentation. *Psychopharmacology* 231: 85-95
- Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK (2011) Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E11-24
- Taylor FB, Russo J (2001) Comparing guanfacine and dextroamphetamine for the treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 21: 223-8
- Teuns GB, Geys HM, Geuens SM, Stinissen P, Meert TF (2014) Abuse liability assessment in preclinical drug development: predictivity of a translational approach for abuse liability testing using methylphenidate in four standardized preclinical study models. *J Pharmacol Toxicol Methods* 70: 295-309
- Thai DL, Yurasits LN, Rudolph GR, Perel JM (1999) Comparative pharmacokinetics and tissue distribution of the d-enantiomers of para-substituted methylphenidate analogs. *Drug Metab Dispos* 27: 645-50
- Thanos PK, Michaelides M, Benveniste H, Wang GJ, Volkow ND (2007) Effects of chronic oral methylphenidate on cocaine self-administration and striatal dopamine D2 receptors in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 426-33
- Torras-Garcia M, Costa-Miserachs D, Morgado-Bernal I, Portell-Cortes I (2003) Improvement of *Shuttle-box* performance by anterodorsal medial septal lesions in rats. *Behav Brain Res* 141: 147-58
- Torres G, Horowitz JM (1999) Drugs of abuse and brain gene expression. *Psychosom Med* 61: 630-50

- Torres G, Rivier C (1992) Differential effects of intermittent or continuous exposure to cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and c-fos expression. *Brain Res* 571: 204-11
- Torres-Reveron A, Dow-Edwards DL (2005) Repeated administration of methylphenidate in young, adolescent, and mature rats affects the response to cocaine later in adulthood. *Psychopharmacology* 181: 38-47
- Torres-Reveron A, Gray JD, Melton JT, Punsoni M, Tabori NE, Ward MJ, Frys K, Iadecola C, Milner TA (2009) Early postnatal exposure to methylphenidate alters stress reactivity and increases hippocampal ectopic granule cells in adult rats. *Brain Res Bull* 78: 175-81
- Trinh JV, Nehrenberg DL, Jacobsen JP, Caron MG, Wetsel WC (2003) Differential psychostimulant-induced activation of neural circuits in dopamine transporter knockout and wild type mice. *Neuroscience* 118: 297-310
- Turner DC, Robbins TW, Clark L, Aron AR, Dowson J, Sahakian BJ (2003) Cognitive enhancing effects of modafinil in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 165: 260-9
- Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser MB, Moser EI (2003) Selective hippocampal lesions do not increase adrenocortical activity. *J Neurosci* 23: 4345-54
- Ubeda-Contreras (2015) Quality or Intensity? Brain activation pattern in response to emotional stressors. A study with histone H3 phosphorylation Instituto de Neurociencias. UAB, Barcelona
- Ulrich-Lai YM, Engeland WC (2002) Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology* 76: 79-92
- 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E965-73
- Urban KR, Waterhouse BD, Gao WJ (2012) Distinct age-dependent effects of methylphenidate on developing and adult prefrontal neurons. *Biol Psychiatry* 72: 880-8
- Uslaner J, Badiani A, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001a) Environmental context modulates the ability of cocaine and amphetamine to induce c-fos mRNA expression in the neocortex, caudate nucleus, and nucleus accumbens. *Brain Res* 920: 106-16
- Uslaner J, Badiani A, Norton CS, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2001b) Amphetamine and cocaine induce different patterns of c-fos mRNA expression in the striatum and subthalamic nucleus depending on environmental context. *Eur J Neurosci* 13: 1977-83
- Valentino, Bockstaele V (2002) *Hormones, Brain and Behaviour*. Academic press, San Diego.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19: 1826-36
- Valles A, Marti O, Armario A (2003) Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *Eur J Neurosci* 18: 1353-61
- Valles A, Marti O, Garcia A, Armario A (2000) Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1138-44
- van der Schaaf ME, Fallon SJ, Ter Huurne N, Buitelaar J, Cools R (2013) Working memory capacity predicts effects of methylphenidate on reversal learning. *Neuropsychopharmacology* 38: 2011-8

- van Dijken HH, de Goeij DC, Sutanto W, Mos J, de Kloet ER, Tilders FJ (1993) Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58: 57-64
- Van Dijken HH, Van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ (1992) Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav* 51: 787-94
- Van Waes V, Beverley J, Marinelli M, Steiner H (2010) Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants potentiate methylphenidate (Ritalin)-induced gene regulation in the adolescent striatum. *Eur J Neurosci* 32: 435-47
- van West D, Claes S, Deboutte D (2009) Differences in hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning among children with ADHD predominantly inattentive and combined types. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 18: 543-53
- Vanderschuren LJ, Di Ciano P, Everitt BJ (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci* 25: 8665-70
- Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer AN (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci* 19: 9579-86
- Vazquez DM, Akil H (1993) Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. *Pediatr Res* 34: 646-53
- Vicens-Costa E, Martinez-Membrives E, Lopez-Aumatell R, Guitart-Masip M, Canete T, Blazquez G, Tobena A, Fernandez-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. *Physiol Behav* 103: 148-56
- Vigas (1984) Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. Gordon and Breach Sci. New York
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Ding YS, Gatley SJ (2002) Role of dopamine in the therapeutic and reinforcing effects of methylphenidate in humans: results from imaging studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 12: 557-66
- Voon V, Chang-Webb YC, Morris LS, Cooper E, Sethi A, Baek K, Grant J, Robbins TW, Harrison NA (2015) Waiting Impulsivity: The Influence of Acute Methylphenidate and Feedback. *Int J Neuropsychopharmacol* (in press)
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27: 468-74
- Vranjkovic O, Gasser PJ, Gerndt CH, Baker DA, Mantsch JR (2014) Stress-induced cocaine seeking requires a beta-2 adrenergic receptor-regulated pathway from the ventral bed nucleus of the stria terminalis that regulates CRF actions in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 34: 12504-14
- Walker E, Mittal V, Tessner K (2008) Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 4: 189-216
- Walker QD, Morris SE, Arrant AE, Nagel JM, Parylak S, Zhou G, Caster JM, Kuhn CM (2010) Dopamine uptake inhibitors but not dopamine releasers induce greater increases in motor behavior and extracellular dopamine in adolescent rats than in adult male rats. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 124-32

- Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise RA, You ZB (2005) Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J Neurosci* 25: 5389-96
- Wang B, You ZB, Rice KC, Wise RA (2007) Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF(2) receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacology* 193: 283-94
- Wang LJ, Huang YS, Hsiao CC, Chen CK (2012) The Trend in Morning Levels of Salivary Cortisol in Children With ADHD During 6 Months of Methylphenidate Treatment. *J Atten Disord*
- Wang LJ, Huang YS, Hsiao CC, Chiang YL, Wu CC, Shang ZY, Chen CK (2011) Salivary dehydroepiandrosterone, but not cortisol, is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *World J Biol Psychiatry* 12: 99-109
- Weinberg J, Levine S (1977) Early handling influences on behavioral and physiological responses during active avoidance. *Dev Psychobiol* 10: 161-9
- Weiss F (2005) Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. *Curr Opin Pharmacol* 5: 9-19
- Weiss JM (1972) Psychological factors in stress and disease. *Sci Am* 226: 104-13
- Weizman R, Dick J, Gil-Ad I, Weitz R, Tyano S, Laron Z (1987) Effects of acute and chronic methylphenidate administration on beta-endorphin, growth hormone, prolactin and cortisol in children with attention deficit disorder and hyperactivity. *Life Sci* 40: 2247-52
- Wetzel B, Muller M, Cobuzzi J, Hurwitz Z, DeCicco-Skinner K, Riley A Effect of age on methylphenidate-induced conditioned taste avoidance and related BDNF/TrkB signaling in the insular cortex of the rat (2014). *Psychopharmacology* 231:1493-501
- White BP, Mulligan SE (2005) Behavioral and physiologic response measures of occupational task performance: a preliminary comparison between typical children and children with attention disorder. *Am J Occup Ther* 59: 426-36
- Wiersma A, Bohus B, Koolhaas JM (1993) Corticotropin-releasing hormone microinfusion in the central amygdala diminishes a cardiac parasympathetic outflow under stress-free conditions. *Brain Res* 625: 219-27
- Williams (2008) *Textbook of Endocrinology*, 8 edn. Eds. Wilson and Foster. Saunders, And Imprint of Elsevier Company, Saunders
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-83
- Wooters TE, Bardo MT (2011) Methylphenidate and fluphenazine, but not amphetamine, differentially affect impulsive choice in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 1396: 45-53
- Yang L, Zhao Y, Wang Y, Liu L, Zhang X, Li B, Cui R (2015) The Effects of Psychological Stress on Depression. *Curr Neuropharmacol* 13: 494-504
- Yano M, Steiner H (2005) Topography of methylphenidate (ritalin)-induced gene regulation in the striatum: differential effects on c-fos, substance P and opioid peptides. *Neuropsychopharmacology* 30: 901-15
- Yetnikoff L, Arvanitogiannis A (2013) Differential sensitivity to the acute and sensitizing behavioral effects of methylphenidate as a function of strain in adolescent and young adult rats. *Behav Brain Funct* 9: 38

- Zangenehpour S, Chaudhuri A (2002) Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Brain Res Mol Brain Res* 109: 221-5
- Zehle S, Bock J, Jezierski G, Gruss M, Braun K (2007) Methylphenidate treatment recovers stress-induced elevated dendritic spine densities in the rodent dorsal anterior cingulate cortex. *Dev Neurobiol* 67: 1891-900
- Zhu N, Weedon J, Dow-Edwards DL (2007) Oral methylphenidate improves spatial learning and memory in pre- and periadolescent rats. *Behav Neurosci* 121: 1272-9
- Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2002) Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 448: 217-29
- Zombeck JA, Lewicki AD, Patel K, Gupta T, Rhodes JS (2010) Patterns of neural activity associated with differential acute locomotor stimulation to cocaine and methamphetamine in adolescent versus adult male C57BL/6J mice. *Neuroscience* 165: 1087-99
- Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF (2014) Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol* 35: 234-44

Agradecimientos

Mucho ha pasado desde los primeros días de Mayo de 2005. No llegué aquí con ánimos de ser Dr. en Neurociencias, llegué con ánimos de trabajar en un laboratorio como la había hecho durante 15 años en mi ciudad, ofrecer toda mi capacidad y responsabilidad con un solo objetivo: hacer las cosas bien, correctamente, con cariño y orden, cuidando los materiales disponibles y tratando de ofrecer coherencia en los resultados, interpretando esos resultados, como si se los entregara a un paciente, que es a lo que estaba habituado, como me enseñaron Sandra, Lili, la Dra Edith o Gustavo. Pero me encontré con mucho más, posiblemente más de lo que merezca.

Sería imposible nombrar a todas las personas que me han ayudado, con las que he compartido tanto tiempo, tanto trabajo, tantos experimentos, tantas colaboraciones, tantos tubos, tantos sueros, tantas alegrías y tristezas, tantas galletitas. Todos los becarios, estudiantes de master, estudiantes de intercambio, estudiantes de grado, titulares, técnicos, secretarías; sois muchos, han pasado más de 10 años! No voy a nombrarlos, son mi familia catalana, mis amistades cosmopolitas, los que me han aguantado todo este tiempo, los que reemplazaron a todo lo que dejé en Córdoba. Sin todos ustedes no soy nada, ni nadie. Seguir en contacto con todos, que me llame por teléfono de vez en cuando, o me envíe un mail o un mensaje me emociona y enorgullece. Saber de vuestros éxitos es una gran alegría. En estos pasillos están mis mejores amigos, a los que acudo cuando necesito algo y para quienes estoy disponible siempre, igual que mis amigos del otro lado del charco. Y créanme, junto con mi querido José, mi Madre y mis hermanos, sois lo mejor que tengo en la vida, no hay nada que merezca más la pena que el amor y cariño de todos vosotros, nada. JuanAn, Jordi, Joan Carles, gracias por vuestra ayuda en el tramo final. Xavi, qué puedo decirte?.

Si quiero agradecer particularmente a mis directores y jefes: Roser y Antonio, y por vuestro intermedio a esta Universidad, sin vuestro trabajo, entrega, paciencia y dedicación absolutos, nada de todo esto sería posible. He respondido como he podido, creo haber sido útil en más de una situación, no pretendo una gran carrera investigadora, si aportarles lo mejor de mi desde el laboratorio y complementar vuestro trabajo científico, como he intentado hacerlo hasta hoy. Creo que es la mejor manera de trabajar.

