



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

Tesis Doctoral
Programa de Doctorado en Neurociencias

Sensibilización de la respuesta emocional y neuroendocrina al estrés:

Contribución de las características de los estímulos estresantes y mecanismos implicados

Xavier Belda Poyato

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona



Director

Antonio Armario García

Institut de Neurociències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal

Facultat de Biociències

Universitat Autònoma de Barcelona

2015

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

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

PM98-0175

SAF2002-00623

SAF2005-0358

SAF2008-O1175

SAF2011-28313

SAF2014-53876-R

Instituto de Salud Carlos III

(G03/005, RD06/0001/0015 y RD12/008/0014

Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo)

Generalitat de Catalunya

(SGR2001-203, SGR2009-16, SGR2014-1020)

Plan Nacional sobre Drogas

Ref. PNSD2007, DROG2011/021

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral, Xavier Belda Poyato se desarrolló como Profesor Asociado (2000-2003), Profesor Ayudante (2003-2007) e Investigador PIF (2007-2009) en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biociencias de la UAB. Actualmente es Técnico de soporte a la investigación (TSR) en el mismo Departamento desde 2009.

*“Más vale arrepentirse de lo que has hecho
que no de lo que has dejado por hacer”*

A mi familia

Resumen

En animales de laboratorio, la exposición previa a estímulos estresantes de naturaleza emocional suele inducir una reducción de algunas respuestas de estrés cuando los animales son re-expuestos al mismo estímulo, mientras que generalmente da lugar a respuestas normales o acentuadas (sensibilización cruzada) frente a un estímulo estresante diferente (heterotípico). En las últimas décadas ha habido un creciente interés por los procesos de sensibilización ya que se postula que están en gran medida implicados en la aparición de un número considerable de alteraciones fisiológicas y psicopatologías, incluyendo desordenes gastrointestinales, dolor crónico, trastorno por estrés post-traumático (PTSD), psicosis o adicción, entre otras.

La presente tesis se ha centrado en el estudio de las características de los estímulos estresantes que contribuyen a la inducción y la expresión de la sensibilización cruzada inducida por una única exposición al estrés, así como la exploración de posibles mecanismos implicados en el proceso. Para ello, hemos utilizando ratas macho adultas como sujetos experimentales y se ha valorado la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y aspectos conductuales relacionados con actividad/exploración y ansiedad.

Nuestros resultados muestran que una sola exposición a un estímulo estresante de elevada intensidad (inmovilización en planchas, IMO) induce una sensibilización de la respuesta del eje HPA a ambientes nuevos y un incremento en la ansiedad, evaluada mediante el laberinto elevado en cruz (EPM), que son observables durante la semana posterior a la IMO pero no a los diez días. No obstante, la sobreimposición de una sesión breve de choques eléctricos (FS) justo antes del EPM incrementa notablemente la ansiedad en los animales previamente expuestos a una IMO diez días antes, sin afectar a los animales sin experiencia previa con la IMO. Estos datos indican que una sola IMO causa un estado de sensibilización endocrina y conductual a nuevas situaciones de estrés, siendo el efecto más duradero a nivel conductual. Ni la inhibición de la síntesis de glucocorticoides, ni la administración de antagonistas de los receptores de glucocorticoides o del receptor CRHR1 antes de la IMO afectaron a los efectos de la IMO sobre la conducta o a la sensibilización del eje HPA en respuesta a un ambiente nuevo al día siguiente, sugiriendo que ni los glucocorticoides ni los CRHR1 juegan un papel relevante. La comparación de la exposición a la IMO con la exposición a otros estímulos que difieren en intensidad (choques eléctricos y natación forzada), pone de manifiesto que la sensibilización del eje HPA en respuesta a un ambiente nuevo es directamente proporcional a la intensidad del estímulo inductor. Aunque una breve exposición a la IMO es suficiente para inducir sensibilización cruzada del eje HPA, el grado de sensibilización es mayor y más duradero cuanto más prolongada es la exposición a la IMO. Finalmente, demostramos que la sensibilización cruzada del eje HPA tras una exposición previa a la IMO es más evidente cuando el estímulo estresante heterotípico es de menos intensidad, aunque es mucho más crítica la duración de la exposición al estímulo heterotípico, de tal manera que ésta es máxima con 5 min de exposición para desaparecer tras una exposición de 30 min.

En conjunto, los datos experimentales presentados en esta tesis, apoyados por el artículo de revisión, permiten delimitar las características de la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por la exposición aguda a distintas situaciones de estrés y su relación con la sensibilización conductual. La importancia de la intensidad y duración de los estímulos estresantes tanto respecto a la inducción como a la expresión de la sensibilización aportan luz sobre muchas de las discrepancias que aparecen en la literatura.

Índice

Introducción [15]

Concepto de estrés [17]

Procesamiento y respuesta al estrés [20]

Procesamiento central de los estímulos estresantes [23]

Núcleo Paraventricular del Hipotálamo y eje HPA [28]

Hormonas periféricas: ACTH y Corticosterona [30]

Eje HPA y otros marcadores de estrés [38]

Consecuencias del estrés: tolerancia y sensibilización [40]

Exposición previa al estrés y tolerancia [41]

Exposición previa al estrés y sensibilización [51]

Hipótesis y objetivos [65]

Materiales y métodos [69]

Resultados [77]

Artículo 1.

A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors [79]

Artículo 2.

Acute stress-induced sensitization of the pituitary–adrenal response to heterotypic stressors: independence of glucocorticoid release and activation of CRH1 receptors [103]

Artículo 3.

The stressor characteristics determine the induction and expression of heterotypic sensitization of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in adult male rats [129]

Artículo 4.

Stress-induced sensitization: the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and beyond [151]

Discusión general [153]

Conclusiones [169]

Referencias [173]

Agradecimientos [197]

Abreviaturas

- 11 β -HSD:** 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
- ACTH:** hormona adrenocorticotropa
- ADX:** adrenalectomía
- ADX+B:** adrenalectomía y suplementación con corticosterona
- Arc:** núcleo arqueado del hipotálamo
- AVP:** arginina-vasopresina
- BLA:** amígdala, subdivisión basolateral
- BNST:** núcleo del lecho de la estría terminal
- BNSTav:** núcleo del lecho de la estría terminal, anteroventral
- BNSTp:** núcleo del lecho de la estría terminal, posterior
- CBG:** globulina de unión a corticosteroides o transcortina
- CeA:** amígdala, subdivisión central
- CRH:** hormona liberadora de corticotropina
- CRHR1:** receptor de CRH tipo 1
- CRHR2:** receptor de CRH tipo 2
- DMH:** núcleo dorsomedial del hipotálamo
- DMHvl:** núcleo dorsomedial del hipotálamo, ventrolateral
- EPM:** Laberinto elevado en cruz
- GR:** receptor de glucocorticoides
- GRE:** elemento de respuesta a glucocorticoides
- HF:** formación hipocampal
- hnRNA:** RNA heteronuclear
- HPA:** eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
- IL:** corteza infralímbica
- IL-1 β :** interleuquina 1 β
- IMO:** inmovilización en plancha
- LC:** locus coeruleus
- LH:** hipotálamo lateral
- LS:** septum lateral
- LSv:** septum lateral, ventral
- MeA:** amígdala, subdivisión medial
- mPFC:** corteza prefrontal medial
- MR:** receptor de mineralocorticoides
- mRNA:** RNA mensajero
- nGRE:** elemento de respuesta a glucocorticoides negativo
- NTS:** núcleo del tracto solitario
- OXT:** oxitocina
- POAm:** área preóptica, subdivisión medial
- Pgp:** glicoproteína P
- POMC:** proopiomelanocortina
- PRL:** corteza prelímbica
- PTSD:** trastorno de estrés postraumático
- PVN:** núcleo paraventricular del hipotálamo
- PVNdc:** núcleo paraventricular del hipotálamo, dorsal parvocelular
- PVNm:** núcleo paraventricular del hipotálamo, magnocelular
- PVNmpd:** núcleo paraventricular del hipotálamo, medial parvocelular dorsal
- PVNmpv:** núcleo paraventricular del hipotálamo, medial parvocelular ventral
- PVNsm:** núcleo paraventricular del hipotálamo, submagnocelular
- PVT:** núcleo paraventricular del tálamo
- PVTp:** núcleo paraventricular del tálamo, posterior
- RIA:** radioinmunoanálisis
- SGA:** síndrome general de adaptación
- SMA:** sistema simpático-médulo-adrenal
- SO:** núcleo supraóptico
- TH:** tirosina hidroxilasa
- UCN:** urocortina
- V1a:** receptor de AVP tipo 1a
- V1b:** receptor de AVP tipo 1b
- V2:** receptor de AVP tipo 2
- vSUB:** subículo ventral

Introducción

1. Concepto de estrés

Las bases para la visión actual del concepto de estrés provienen de las aportaciones realizadas en la primera mitad del siglo XX por el fisiólogo Walter B. Cannon y el endocrinólogo Hans Selye (revisión en Goldstein y Kopin, 2007; Le Moal, 2007). A principios de siglo, Cannon introdujo el término “homeostasis” para describir el conjunto de procesos fisiológicos coordinados que mantienen dentro de rangos aceptables la mayoría de variables fisiológicas, como los niveles de glucosa en sangre, la presión de oxígeno y la temperatura corporal, permitiendo la supervivencia del organismo frente a perturbaciones del ambiente. Este concepto no solo fue fundamental para la posterior aparición del término “estrés” sino que se ha mantenido inherente a la definición de estrés hasta nuestros días. Cannon demostró que la exposición a estímulos que ponían en riesgo la homeostasis inducía la activación del sistema simpático-médulo-adrenal (SMA) y que esta activación era esencial para restaurarla. Además extendió el concepto de homeostasis para incluir estímulos adversos tanto de naturaleza física como psicológica y describió por primera vez la respuesta tanto conductual como endocrina de “lucha-huida” (fight or flight) frente a situaciones amenazantes, ambos aspectos de gran relevancia en las posteriores definiciones de estrés.

Pese a la existencia de cierta controversia sobre si fue Cannon o Selye quien utilizó por primera vez el término estrés en un contexto biológico, fue Selye quien años más tarde lo definió tal y como lo conocemos hoy en día. Según su definición, el estrés es “la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda sobre él”. Por “no específica” Selye se refería a que, independientemente de la naturaleza del agente causante, el estrés originaría un mismo cuadro sintomático, al que denominó “Síndrome General de Adaptación” (SGA), y que se desarrollaría en tres fases: (i) una reacción de alarma, con pérdida de sustancia cromafina de las adrenales, reducción del tamaño del timo y nódulos linfáticos y úlceras estomacales, entre otros síntomas, (ii) si el estímulo continuase, se entraría en un período adaptativo de resistencia, con hipertrofia adrenal, hemodilución, hiperclorremia, anabolismo, entre otros efectos y (iii) si la exposición se perpetuase, se produciría un agotamiento del organismo (Selye, 1936). Posteriormente se demostró más directamente que la aparición de estos síntomas estaba asociada a la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). La subsiguiente liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal contribuiría a la resistencia pero también sería responsable de los cambios patológicos.

Los principios generales que emergen de los estudios de Cannon y Selye son tanto la existencia de una respuesta fisiológica característica del estrés como que una parte integral de esta fisiología está relacionada con la función adrenal (revisión en Levine, 2005; Le Moal, 2007). Pese a que ambos pusieron énfasis en el papel de la adrenal, existen claras distinciones entre ambos: (i) Mientras Cannon se centró en el sistema SMA y el papel de las hormonas de la médula adrenal (adrenalina y noradrenalina) en respuesta a situaciones de emergencia, Selye y sus estudiantes dieron especial énfasis al eje HPA y a los glucocor-

ticoides en la respuesta del organismo a agentes nocivos o peligrosos, formulando así entre los dos autores las bases de lo que hoy entendemos como respuesta endocrina de estrés. (ii) Cannon describió las respuestas a un daño agudo, mientras que Selye se centró en la adaptación a estímulos crónicos. (iii) Para Cannon, el estrés se definía en términos de los estímulos necesarios para dar lugar a estas respuestas. Selye, por el contrario, describió las respuestas que él asumía que constituían el estrés (hipertrofia adrenal, ulceración estomacal e involución del timo); es decir, Selye definía estrés en términos de respuesta. La confusión existente en la terminología forzó a Selye a crear un neologismo, *stressor*, para referirse al agente causante y conservar *stress* para la respuesta inespecífica del organismo. La terminología actual distingue entre estímulo estresante (*stressor*), estrés (el estado generado en el organismo) y respuesta de estrés (Armario, 2006b).

El concepto de homeostasis fue posteriormente revisado por Sterling y Eyer tras la observación de que muchas variables fisiológicas, tales como la presión sanguínea, la temperatura o los niveles de glucosa en sangre, varían según las necesidades del organismo en cada momento (v.g. en estado de reposo respecto a un estado de actividad). Utilizando la respuesta cardiovascular como referencia, estos autores introdujeron el concepto de *alostasis* (que literalmente significa “estabilidad a través del cambio”) para referirse a los procesos activos por los que el cuerpo mantiene la homeostasis frente a los sucesos diarios (Sterling y Eyer, 1988). McEwen incorporó este término al campo del estrés para distinguir entre el mantenimiento de la estabilidad (“homeostasis”) de los parámetros que son esenciales para la vida (como temperatura, pH o presión osmótica) y los sistemas que tienen como finalidad mantener estos parámetros en los niveles adecuados, como sería el caso de las hormonas, cuando se producen cambios físicos, psicosociales i/o ambientales (“alostasis”). De esta manera, la *alostasis* se centra más en los mecanismos fisiológicos que se activan frente a perturbaciones tanto del medio interno como del externo. Según McEwen, un estado *alostático* implicaría una actividad alterada y sostenida de los mediadores primarios de la *alostasis* (como los glucocorticoides) que podría tener cierto coste sobre el organismo (como la inmunosupresión), denominado *carga alostática*. Las consecuencias patológicas asociadas al estrés se deberían a una *carga alostática* excesiva o muy sostenida en el tiempo (McEwen, 1998; 2003).

Uno de los aspectos que ha suscitado mayor crítica de la definición de Selye es la referente a la inespecificidad de la respuesta de los organismos frente a diversas situaciones de estrés. Actualmente se considera que la exposición de un organismo a un estímulo estresante puede desencadenar dos tipos de respuestas fisiológicas (revisión en Armario, 2006b): (i) Una respuesta específica, característica del estímulo estresante concreto y no relacionada con las cualidades estresantes del estímulo. (ii) Una respuesta inespecífica común a todos los estímulos estresantes. Así, las respuestas fisiológicas ante una perturbación de la homeostasis que puede ser solventada mediante mecanismos específicos normales deberían diferenciarse de aquellas respuestas que requieren de un sistema adicional de emergencia. Este sistema de emergencia es común (no específico) a un gran rango de situaciones y conformaría lo que se considera la respuesta de estrés, que incluiría tanto la reacción de alarma (*fight or flight*) descrita por Cannon como el SGA observado por

Selye. Por consiguiente, la respuesta fisiológica evaluada en una situación concreta podría representar la suma de las respuestas tanto específicas como inespecíficas.

Debido al avance en el conocimiento más exhaustivo de los elementos implicados en la percepción, el procesamiento y las respuestas de los organismos frente a estímulos estresantes han sido múltiples las revisiones y ampliaciones del concepto de estrés desde su uso original por Selye. Una aportación clave ha sido el reconocimiento de la importancia de la evaluación psicológica o emocional de la situación de estrés. John Mason, a partir de sus observaciones en primates, destacó en la defensa de esta concepción llegando a señalar que la respuesta endocrina no específica observada por Selye era debida a la componente emocional que encierra la experiencia asociada con la exposición a los diferentes estímulos estresantes (Mason, 1968), aunque las conclusiones se basaban en datos experimentales que pueden interpretarse de manera diferente. Centrándose en los aspectos psicológicos, Richard Lazarus y sus colaboradores (ver Lazarus, 1993) han remarcado la importancia del procesamiento cognitivo (appraisal) de las situaciones de estrés (independientemente de su naturaleza) y de los mecanismos psicológicos subyacentes, para comprender cómo los individuos afrontan las situaciones adversas. Para este autor, la respuesta de estrés aparecería cuando los sucesos sobrepasan las estrategias de afrontamiento de los individuos. Las situaciones resultarían estresantes solo si se perciben como amenazadoras, peligrosas e incontrolables. La reacción afectiva ante una situación requiere de la evaluación cognitiva, consciente o no, de la misma por parte del individuo, evaluación que a su vez depende de su historia personal y puede modificar sus estrategias de afrontamiento 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 comporta. Estas observaciones matizaron la idea previa de una respuesta estereotipada de todos los individuos ante una misma situación estresante, incorporando el hecho relevante de las diferencias individuales. Aunque actualmente sabemos que se puede producir activación del eje HPA sin necesidad de que estén implicados mecanismos conscientes ni que haya una activación emocional, el uso del término estrés en relación a situaciones de componente emocional es preponderante hoy en día.

También importante ha sido la aportación de Weiss (1972) sobre la relevancia de la predictibilidad y la controlabilidad de una situación estresante para determinar los efectos negativos que ésta pueda tener sobre el organismo. Recientemente se ha argumentado que la percepción cognitiva de impredecibilidad y/o falta de control debe ser un factor determinante para considerar una situación como un factor de estrés (Koolhaas et al, 2011). Según los mismos autores, ya que no es posible conocer la representación interna de lo que los animales están experimentando, se debe prestar especial atención al análisis sutil y detallado de las respuestas fisiológicas y el comportamiento. Este análisis detallado es imprescindible debido a que actualmente está bien aceptado que la presencia de una respuesta fisiológica o conductual aislada no es evidencia directa de estrés ni indicativa de la existencia de un estímulo estresante (Armario, 2006b).

Pese a los avances producidos en el estudio del estrés, todavía no se ha conseguido consensuar una definición sencilla. Según Levine y Ursin (1991), el mayor problema radica en que se trata de un concepto compuesto y multidimensional que engloba la información entrante (estímulo estresante), los sistemas de procesamiento (incluyendo la experiencia subjetiva de estrés), la respuesta de estrés y la interacción que puede darse entre estos tres elementos (revisión en Levine, 2005). Por lo tanto, los efectos del estrés no se manifiestan solo a nivel fisiológico (alteración en la función neuroendocrina, del sistema nervioso autónomo y sistema inmune), sino que también lo hacen a nivel conductual, afectando a la experiencia subjetiva y a las funciones cognitivas. Por otro lado, ante una situación concreta de estrés, las estrategias de afrontamiento dependen tanto de la evaluación cognitiva inicial de la situación (v.g. si se considera que se puede hacer algo por cambiar la situación o no), como de la evolución de esta evaluación a lo largo de la exposición al estrés (Lazarus et al, 1993).

Una de las definiciones que consideramos más completa y apropiada para poder situar nuestro trabajo en un marco teórico adecuado es la propuesta por Vigas (1984), según la cual el estrés (o la respuesta de estrés) sería “la respuesta del organismo, desarrollada a lo largo de la filogenia, frente a agentes, reales o simbólicos, que ponen en peligro la integridad del organismo y que no pueden afrontarse mediante los mecanismos homeostáticos normales”. Esta definición recoge la visión de Herman y Cullinan (1997), distinguiendo entre estímulos que suponen una alteración directa de la homeostasis, como hemorragia, infección o hipoglucemia estímulos sistémicos o físicos) y aquellos que no constituyendo una amenaza directa para el equilibrio homeostático tienen carácter anticipatorio de un peligro potencial, como es el caso de la exposición a ambientes desconocidos, la detección de olor a depredador o la misma presencia del depredador (estímulos emocionales o psicológicos).

A pesar de esta división entre estímulos sistémicos y emocionales, algunos modelos animales de estrés comparten características de ambos componentes, por lo que se consideran estímulos mixtos (Kovács et al, 2005). Por ejemplo, algunos métodos de inmovilización, cuya componente principal es fundamentalmente emocional, pueden dar lugar a procesos inflamatorios locales en las extremidades. De forma similar, los modelos que implican choque eléctrico (tanto en la cola como en las patas) son estímulos que pueden ser dolorosos y que podrían causar algún daño tisular local y el modelo de natación forzada implica ejercicio físico y puede producir hipotermia si la temperatura del agua está claramente por debajo de 36°C (Dal-Zotto et al., 2000; Porsolt et al., 1979).

2. Procesamiento y respuesta al estrés

En mamíferos, los dos componentes neuroendocrinos mejor caracterizados en respuesta al estrés son los ejes SMA y HPA. La activación del eje SMA da lugar a un gran número de respuestas fisiológicas mediante la liberación inmediata de catecolaminas: noradrenalina (norepinefrina) por parte de los terminales nerviosos simpáticos (y en menor medida, la médula adrenal) y adrenalina (epinefrina) por la médula adrenal. Entre las respuestas

fisiológicas mediadas por la actividad simpática y las catecolaminas se encuentran la inducción de la glucogenólisis hepática y el incremento del ritmo cardíaco y la presión sanguínea (Kvetnansky and McCarty, 2000). A diferencia del eje SMA, la activación del eje HPA involucra diferentes sustratos anatómicos y la liberación de hormonas intermedias que finalmente producirán la liberación de glucocorticoides por la corteza adrenal (**Figura 1**). La liberación de glucocorticoides en respuesta a estrés tiene un gran número de efectos fisiológicos destinados a controlar una correcta movilización de los recursos, prevenir una respuesta excesiva por parte de los diferentes sistemas activados por el estrés (incluyendo la del propio eje HPA) y preparar al organismo para un estrés futuro (Frank et al, 2013; Sapolsky et al. 2000). Los glucocorticoides también juegan un papel muy relevante tanto en la elaboración de estrategias de afrontamiento conductual como en la consolidación de las memorias relacionadas con la situación de estrés (de Kloet et al., 1999). Además, se ha relacionado directamente al eje HPA con las consecuencias fisiopatológicas y psicopatológicas derivadas de la exposición a estímulos estresantes (Charmandari et al, 2005; Radley et al., 2011). Todas estas razones han dado lugar a que el eje HPA sea uno de los sistemas neuroendocrinos mejor caracterizados (Armario, 2006b) y que ocupe una posición central en los trabajos relacionados con el estrés.

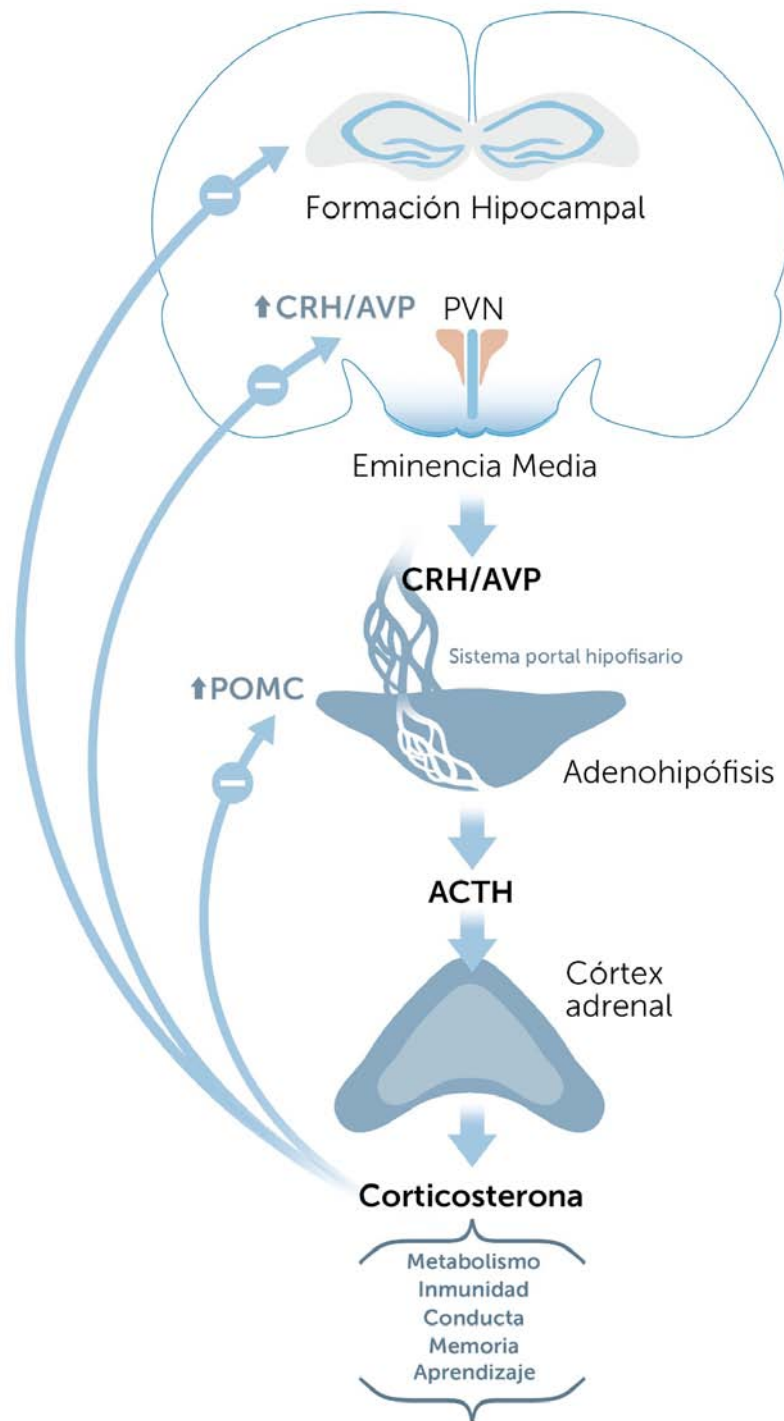


Fig. 1. Eje HPA

La exposición a un estímulo estresante inducirá la activación de neuronas hipofisiotrópicas de la región medial dorsal parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (mpdPVN). Tras su activación, estas neuronas secretarán factores de liberación, como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP), al sistema portal hipofisario desde la eminencia media. Estas hormonas actuarán sobre la hipófisis anterior promoviendo la secreción al sistema circulatorio de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez actuará sobre la corteza adrenal (zona fasciculada) induciendo la síntesis y liberación de glucocorticoides (corticosterona en rata y ratón; predominantemente cortisol en humanos y otros mamíferos). Los glucocorticoides circulantes tienen un gran número de efectos fisiológicos sobre otros sistemas (por ejemplo, sobre el metabolismo y la función inmune). Un efecto principal de los glucocorticoides es la de inhibir la propia actividad del eje HPA a través de mecanismos de retroinhibición, actuando sobre múltiples áreas como la hipófisis anterior, el PVN y estructuras suprahipotalámicas (como la formación hipocámpal) (Adaptado de Armario, 2015).

2.1 Procesamiento central de los estímulos estresantes

La respuesta neuroendocrina de estrés es un proceso temporal, altamente regulado, que comprende la integración de múltiples modalidades de información sensorial tanto para activar rápidamente la secreción de glucocorticoides como para inhibirla. Una característica de todos los estímulos estresantes, independientemente de su naturaleza, es que su procesamiento por el sistema nervioso central (SNC) origina señales tanto activadoras como inhibitorias que acaban convergiendo en el PVN. Esto permite señalar al PVN como el principal núcleo integrador de las señales de salida de la respuesta fisiológica al estrés. La activación del eje HPA implica la estimulación de un grupo específico de neuronas localizadas en la subdivisión parvocelular medial dorsal del PVN (mpdPVN).

Aunque convergiendo en el PVN, las áreas del SNC involucradas en el procesamiento del estrés dependen de la naturaleza del estímulo (Pacák y Palkovits, 2001; Sawchenko et al, 2000; Kovács et al, 2005). Los estímulos estresantes sistémicos, por representar un desequilibrio real de la homeostasis, requieren de una activación rápida y directa del PVN. El procesamiento de estos estímulos se realiza fundamentalmente por sistemas catecolaminérgicos del tronco encefálico y por los órganos circunventriculares (Herman et al, 2003; Ulrich-Lai y Herman, 2009). El tronco encefálico recibe información referente a las perturbaciones de la homeostasis, como hemorragia, inflamación o dolor somático o visceral. En el núcleo del tracto solitario (NTS; región A2/C2) y en el bulbo ventrolateral (región A1/C1) se originarán aferencias predominantemente adrenérgicas y noradrenérgicas de naturaleza excitadora que inervan directamente al PVN. Los órganos circunventriculares consisten en una serie de regiones carentes de barrera hematoencefálica, característica que les permite recoger información sobre el estado osmótico del organismo (v.g. presión osmótica y balance de electrolitos).

Estas estructuras, mediante proyecciones directas al PVN, inducirán la activación del eje HPA en respuesta a alteraciones de los parámetros osmóticos normales.

La información relativa al balance energético se transmite al PVN sobre todo a través del núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) y del hipotálamo lateral (LH), que tienen neuronas sensibles a los niveles circulantes de glucosa, leptina e insulina (Woods et al, 1998). Otras regiones hipotalámicas como el núcleo dorsomedial (DMH) o el área preóptica medial (mPOA) 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. 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 una inhibición del eje HPA, en tanto que su inhibición podría activarlo (Cole y Sawchenko, 2002).

Una estructura probablemente crítica en la regulación de la respuesta al estrés es el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST). En concreto, sus efectos sobre el eje HPA dependen de la subdivisión concreta de este núcleo (Choi et al, 2007). Las lesiones del BNST 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 inhibitor o estimulador, respectivamente.

Los estímulos estresantes emocionales dan lugar a una respuesta anticipatoria del eje HPA que implica que el organismo interprete y evalúe el estímulo, su relación con experiencias previas y sus posibles consecuencias (Radley, 2012). Un ejemplo de respuesta anticipatoria sería la generada por reacciones innatas de miedo, como la presencia del olor a un depredador o la exposición a espacios abiertos. Ciertos estímulos, como la inmovilización en tubo (*restraint*) o en plancha (IMO) y el choque eléctrico en las patas, pese a poseer cierta componente sistémica, también son procesados por las mismas estructuras del SNC, considerándose modelos de estrés predominantemente emocional (Dayas et al, 2001; Herman y Cullinan, 1997; Sawchenko et al, 2000). La respuesta neuroendocrina frente a estímulos emocionales se elabora principalmente mediante proyecciones telencefálicas multisinápticas hacia el mpdPVN. Estudios funcionales y de lesión implican a la corteza prefrontal medial (mPFC), la formación hipocampal (HF), la amígdala y el septum lateral (LS) en las principales estructuras de control de la actividad del eje HPA frente a estímulos emocionales (**Figura 2**). Estas estructuras no inervan directamente al mpdPVN, sino que hacen relevo en numerosos núcleos hipotalámicos y del telencéfalo basal, como el BNST, el mPOA, el DMH, el ARC, el LH y la zona peri-PVN (Herman et al, 2005; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Las proyecciones provenientes de las áreas de control pueden ser tanto estimuladoras (v.g. mPFC y HF) como inhibitoras (GABAérgicas; v.g. amígdala y LS), pero las proyecciones desde los núcleos de relevo hacia el mpdPVN son fundamentalmente, aunque no exclusivamente, GABAérgicas (v.g. BNST, mPOA y zona peri-PVN).

Múltiples estudios, tanto de lesión como de estimulación, indican que la HF ejerce un efecto inhibitor sobre el eje HPA (Herman et al, 2003; Jacobson y Sapolsky, 1991). En los estudios de lesión, los efectos se observan fundamentalmente durante la fase de recuperación posterior a la finalización de la situación de estrés, implicando a la HF en la regulación de la dinámica post-estrés. Por su gran densidad de receptores de glucocorticoides se le ha relacionado con la retroinhibición de la actividad del eje HPA mediada por los glucocorticoides (Jacobson y Sapolsky, 1991). En conjunto, los datos indican que la HF está involucrada específicamente en la regulación de la respuesta endocrina frente a estímulos emocionales (Herman et al, 1998), en consonancia con su papel en el procesamiento emocional y cognitivo. Los efectos inhibitoros de la HF sobre el mpdPVN se canalizarán a través de una población neuronal circunscrita a la parte ventral del subíulum (vSUB). Estas neuronas envían eferencias estimuladoras (glutamatérgicas) que harán sinapsis en neuronas de proyección GABAérgica hacia el mpdPVN desde la subdivisión posterior del BNST (pBNST), mPOA, DMH, zona peri-PVN y otras estructuras hipotalámicas (**Figura 2**; Herman et al 2005; Jankord y Herman, 2008).

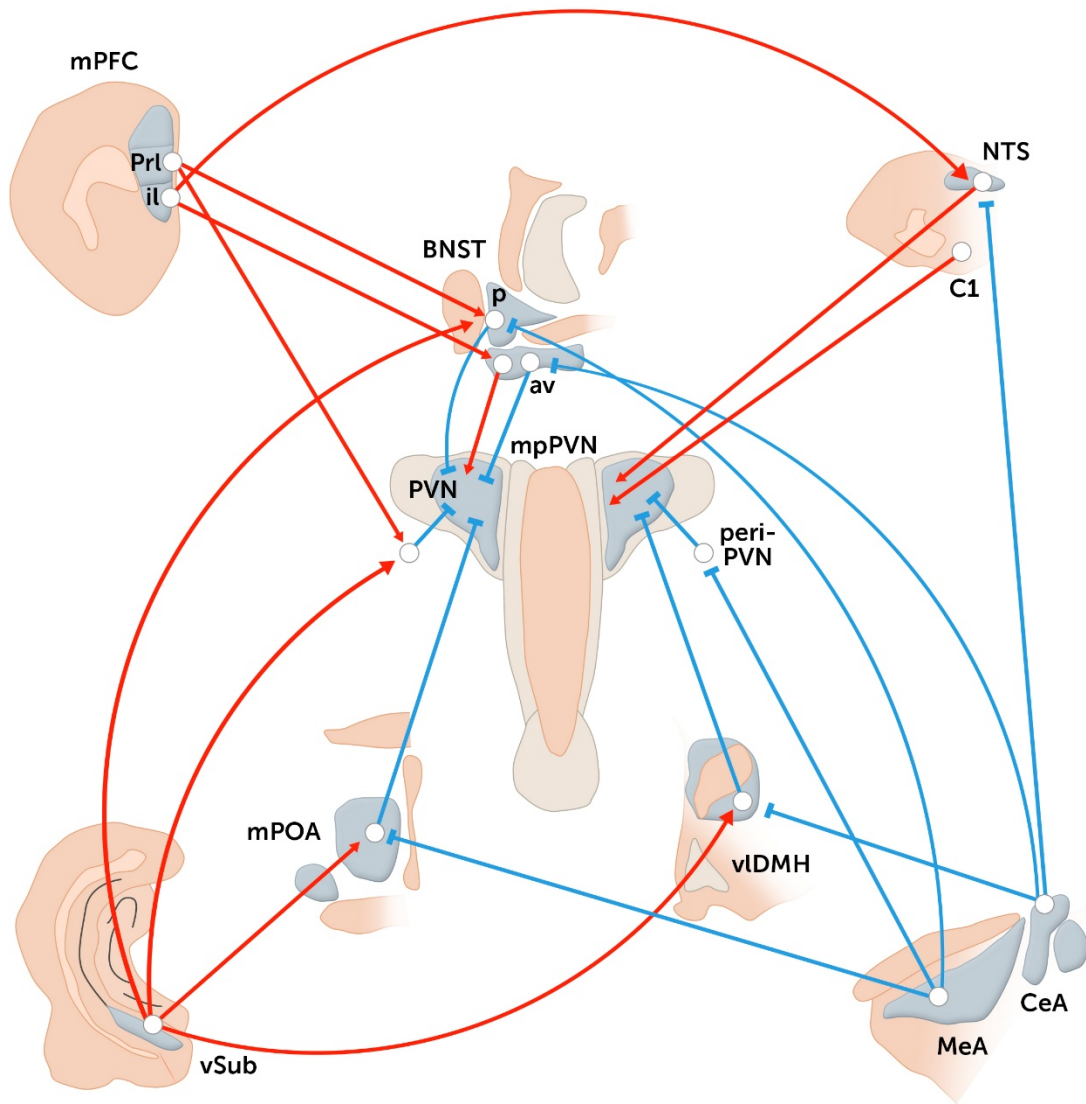


Fig. 2. Vías límbicas de integración del estrés desde la corteza prefrontal medial (mPFC), la amígdala y el hipocampo

La mPFC proyecta desde neuronas de la corteza prelámbica (PrL) e infralímbica (IL), que tienen diferentes acciones sobre la respuesta del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) al estrés. La PrL envía proyecciones excitatorias (círculos oscuros y líneas rojas) a regiones como la zona peri-PVN (peri-núcleo paraventricular del hipotálamo) y subdivisión posterior del núcleo del lecho de la estría terminal (pBNST), las cuales envían proyecciones GABAérgicas (círculos blancos y líneas de puntos azules) directas hacia la subdivisión parvocelular medial del PVN (mpdPVN). En cambio, la IL proyecta a estructuras como el núcleo del tracto solitario (NTS) y la subdivisión anteroventral del BNST (avBNST), desde donde se enviarán proyecciones excitatorias hacia el mpdPVN, implicando una vía de estimulación del mpdPVN desde esta región cortical. La formación hipocámpal envía proyecciones excitatorias a través del subículo ventral (vSUB) a numerosas regiones subcorticales, como el pBNST, la zona peri-PVN, el área preóptica medial (mPOA) y la región ventrolateral del núcleo dorsomedial del hipotálamo (vDMH), todos ellos de proyección GABAérgica hacia el mpdPVN. El núcleo de la amígdala medial (MeA) envía sinapsis inhibitorias a estructuras de proyección GABAérgica hacia el mpdPVN, como el pBNST, el mPOA o la zona peri-PVN, provocando una desinhibición transináptica. De forma similar, el núcleo central de la amígdala (CeA) envía proyecciones GABAérgicas al avBNST y, en menor medida, al vDMH. Neuronas GABAérgicas de la CeA también proyectan sobre interneuronas GABAérgicas del NTS, permitiendo que la CeA pueda desinhibir las aferencias desde este núcleo al mpdPVN. (Adaptado de Herman, 2005, y Ulrich-Lai, 2009).

La mPFC parece tener un papel complejo en la regulación de la actividad del eje HPA (**Figura 2**). Aunque se ha demostrado que la mPFC no tiene ningún papel en la regulación de los niveles basales del eje HPA y que todas las subdivisiones de la mPFC se activan por el estrés, la modulación de la actividad del eje HPA en respuesta a estrés es región dependiente (Jankord y Herman, 2008; Radley, 2012), observándose diferencias notables entre la corteza prelímbica (PrL) y la infralímbica (IL). La PrL es importante en la inhibición del mpdPVN en respuesta exclusivamente a estímulos emocionales. Numerosos estudios muestran que la lesión de esta región prolonga la respuesta del eje HPA frente a estímulos emocionales, sin afectar la respuesta a los sistémicos (Diorio et al, 1993; Figueiredo et al, 2003b; Radley et al, 2006), mientras que su estimulación inhibe las respuestas de estrés (Jones, 2011). Por el contrario, lesiones de la IL muestran una disminución de la respuesta autónoma e inhibición de la actividad del eje HPA en respuesta a un estrés emocional (Tavares et al, 2009; Radley et al, 2006). De esta manera, las cortezas PrL e IL parecen tener efectos opuestos sobre la integración del estrés. Es importante destacar que las eferencias de las diferentes subdivisiones de la mPFC no hacen sinapsis directa en el mpdPVN sino que hacen relevo en diferentes áreas intermedias. La acción inhibitoria de la actividad del eje HPA por parte de la PrL se explica porque desde este núcleo se envían proyecciones glutamatérgicas a áreas como la división posterior de BNST (pBNST), el complejo basolateral de la amígdala (BLA), el núcleo paraventricular del tálamo (PVTh) y la zona peri-PVN, donde hacen sinapsis sobre neuronas de proyección GABAérgica hacia el mpdPVN. En cambio, la acción estimuladora de la IL tiene lugar mediante proyecciones glutamatérgicas que hacen sinapsis sobre otras neuronas de proyección estimuladora hacia el mpdPVN que se localizan en áreas como la subdivisión anteroventral del BNST (avBNST), la amígdala central (CeA) o el NTS (Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008; Ulrich-Lai y Herman; 2009).

Al contrario que la HF y la corteza PrL, la amígdala ejerce un papel claramente activador de la respuesta del eje HPA. Esta estructura está compuesta por numerosos núcleos con funciones en parte diferenciadas, algunos de los cuáles pueden participar en la estimulación del eje HPA. Mientras que la amígdala medial (MeA) estaría implicada en las respuestas anticipatorias frente a estímulos emocionales, la CeA se relaciona con la respuesta a estímulos sistémicos (Dayas et al, 1999; 2001; Sawchenko et al. 2000). La estimulación del eje HPA se conseguiría mediante eferencias GABAérgicas que harían sinapsis sobre estructuras de proyección también GABAérgica hacia el mpdPVN (**Figura 2**). Así, la MeA envía sinapsis inhibitorias a estructuras de proyección GABAérgica hacia el mpdPVN como el pBNST, el mPOA o la zona peri-PVN, provocando una desinhibición transináptica. De forma similar, la CeA envía proyecciones GABAérgicas al avBNST y, en menor medida, al vDMH. Neuronas GABAérgicas de la CeA también proyectan sobre interneuronas GABAérgicas del NTS, permitiendo que la CeA pueda desinhibir las eferencias desde este núcleo al mpdPVN (Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008; Ulrich-Lai y Herman; 2009). Por último, el complejo BLA estaría relacionado con la respuesta a estímulos emocionales, aunque no están claro ni las vías precisas ni su papel sobre la respuesta del eje HPA en situaciones de estrés agudo. En cambio, parece que el complejo

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). Una gran proporción de eferencias de este complejo se dirigen hacia la CeA y la MeA; sin embargo, también salen axones hacia el BNST y otros núcleos de proyección al mpdPVN, sugiriendo que puede interactuar con el mpdPVN independientemente de los otros núcleos amigdalinos (Jankord y Herman, 2008).

Respecto al LS, aunque hasta recientemente se había asumido que participaba de la inhibición del eje HPA en respuesta a estímulos estresantes emocionales (Herman et al, 1996; Singewald et al, 2011), en la actualidad existe datos que le atribuyen también un papel estimulador (Anthony et al, 2014). Por un lado, se ha sugerido que proyecciones serotoninérgicas desde el rafe participarían en la regulación del eje HPA por el LS, involucrando receptores 5-HT_{1A} de serotonina, dado que la administración local de un agonista de este receptor serotoninérgico reduce la respuesta del eje HPA mientras que la administración de un antagonista la incrementa. Es probable que el LS ejerza un efecto predominantemente inhibitorio sobre el eje HPA actuando como mediador del rafe (Singewald et al, 2011). Por otro lado, recientemente se ha propuesto que la activación de un subgrupo de neuronas CRFR2 del LS estaría mediando el incremento en ansiedad inducido por el estrés y la activación del eje HPA (Anthony et al, 2014). Puesto que las eferencias del LS son fundamentalmente GABAérgicas, en base a estudios con trazadores anterógrados y retrógrados, se han propuesto dos vías alternativas por las que el LS podría inhibir la actividad del eje HPA: i) las eferencias GABAérgicas del LS harían relevo en neuronas excitadoras (glutamatérgicas) del hipotálamo posterior, que proyectarían sobre el mpdPVN, y ii) mediante la consecución tres sinapsis GABAérgicas consecutivas; interneuronas del LS inhibirían la actividad de las neuronas eferentes del LS hacia estructuras de proyección GABAérgica hacia el PVN, como el DMH, el mPOA y el avBNST (Myers et al, 2014; 2015; Singewald et al, 2011). No obstante, a través de las eferencias directas a estas estructuras de proyección GABAérgica al PVN, así como a áreas peri-PVN, el LS también podría ejercer un rol importante en la activación del mpdPVN. De hecho, existe 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, 2006).

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 (PVTh) 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 PVTh recibe numerosas proyecciones desde áreas sensibles al estrés como el vSUB, la mPFC, el BNST, el NTS, el Rafe y el núcleo parabraquial y, a su vez, inerva regiones como la mPFC, la CeA y la BLA, capaces de modular la actividad del eje HPA (Herman et al, 2003).

2.2 Núcleo Paraventricular del Hipotálamo y eje HPA

El PVN consiste en un complejo de estructuras involucradas en la regulación de la función endocrina y autónoma (Swanson y Sawchenko, 1983). En base a criterios funcionales y morfológicos, este se puede dividir en diferentes regiones (**Figura 3**): lateral magnocelular (mPVN), dorsal parvocelular (dcPVN), medial dorsal parvocelular (mpdPVN), medial ventral parvocelular (mpvPVN) y submagnocelular (smPVN) (revisión en Armario, 2006b). La región mPVN está constituida por neuronas que producen vasopresina (argi-nina-vasopresina, AVP, en la mayoría de los mamíferos) y oxitocina (OXT), las cuales envían sus proyecciones axónicas hacia la neurohipófisis a través de la eminencia media interna, participando del control de varias respuestas fisiológicas como el control de la diuresis (AVP) o la contracción del músculo liso (OXT). Las regiones dcPVN, mpvPVN y smPVN contienen neuronas que sintetizan hormona liberadora de corticotropina (CRH) y otros neuropéptidos, y están implicadas en el control de la respuesta autónoma al estrés mediante sus proyecciones al tronco encefálico. Por último y como se ha mencionado anteriormente, las neuronas parvocelulares de la región mpdPVN están implica-das en la activación del eje HPA (**Figura 1**).

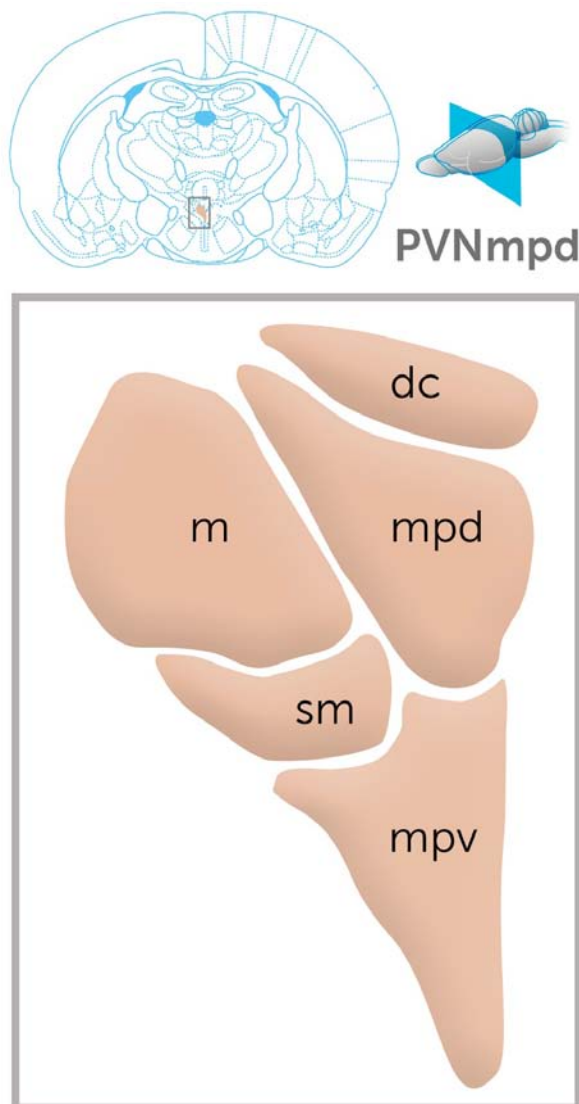


Fig. 3. Esquema de las subdivisiones del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

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

Estas neuronas sintetizan CRH que, mediante sus proyecciones axónicas hacia la zona externa de la eminencia media, será liberada por exocitosis al sistema portal-hipofisario y, a través de éste, alcanzará la adenohipófisis. En todas las especies estudiadas, incluyendo rata, ratón y humanos, existe una proporción de las neuronas de CRH de la subdivisión mpdPVN que también expresan AVP. Además de la AVP, estas neuronas pueden co-expresar otros péptidos, como angiotensina II, péptidos opiáceos y neurotensina, todos ellos capaces de modular la respuesta del eje HPA al estrés (Swanson, 1987; Watts, 1996).

CRH y receptores de CRH

El CRH es el principal miembro de una familia de neuropéptidos que también incluye a las urocortinas 1, 2 y 3 (Ucn1, Ucn2 y Ucn3; Bale y Vale, 2004). Aunque el PVN constituye el principal lugar de producción del CRH, neuronas de CRH se encuentran en otras zonas del SNC (Sawchenko y Swanson, 1985). La acción del CRH a nivel del SNC se ha implicado con múltiples acciones, como regulación del grado de actividad del SNC (“arousal”), funciones cognitivas y ejecutivas, refuerzo, miedo, ansiedad y depresión, además de efectos sobre la función metabólica y cardiorespiratoria, entre otras (v.g. Koob y Heinrichs, 1999; Arlt et al, 2003; Bale y Vale, 2004; Binder y Nemeroff, 2010; Koob, 2010). Las urocortinas, que pertenecen a la misma familia que el CRH, también se expresan en el SNC. Las Ucn1 y 2 median efectos conductuales, en muchos casos contrarrestando los efectos del estrés y el CRH (Bale y Vale, 2004), en tanto que la Ucn3 media efectos relacionados con el metabolismo, como la inhibición de las conductas de alimentación y el incremento de los niveles plasmáticos de glucosa (Kuperman y Chen, 2008).

Dejando de lado el PVN, las áreas donde el CRH juega un papel más relevante son probablemente la CeA y el BNST. La expresión de CRH en estas áreas está relacionada con un gran número de respuestas adaptativas al estrés, incluyendo efectos sobre la conducta, la actividad del sistema autónomo y la función inmune. Además, se localizan neuronas que expresan CRH en otros núcleos hipotalámicos (v.g. LH y núcleo supraóptico (SO)), en la corteza cerebral y en la HF, así como en estructuras del tronco encefálico (v.g. núcleo de Barrington y NTS). También en algunas de estas últimas áreas el CRH estaría implicado en la respuesta al estrés. Por ejemplo, las interneuronas de CRH de la HF ejercen una gran influencia sobre los efectos del estrés en los procesos de memoria y aprendizaje (Schwabe, 2012; Maras y Baram, 2012) y se ha implicado al CRH de mPFC en conductas inducidas por estrés (Jaferi y Bhatnagar, 2007; Bijlsma et al, 2011; Miguel et al, 2014).

El CRH ejerce sus efectos sobre las células corticotropas de la adenohipófisis y otras células diana mediante su unión a receptores de membrana acoplados a proteínas G (Bale y Vale, 2004). Existen dos tipos principales de receptores de CRH: los CRHR1 y los CRHR2. El CRHR1 se localiza en el SNC, en las células corticotropas de la adenohipófisis, así como en tejidos periféricos (v.g. órganos reproductores y células del sistema inmune), y es el receptor por el que el CRH y la Ucn1 tienen una mayor afinidad. Dentro del SNC se localiza principalmente en el sistema límbico, ciertos núcleos hipotalámicos y la corteza cerebral y cerebelar (Aguilera, 2012). El CRHR1 es el más importante en las respuestas de estrés, siendo esencial para la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH)

por la adenohipófisis y para las respuestas conductuales de estrés. El receptor CRHR2 tiene una elevada afinidad por las tres urocortinas (no por el CRH) y se localiza mayoritariamente en la periferia. En el SNC, el CRHR2 está restringido a básicamente a zonas límbicas, como el hipotálamo, la HF y el LS (Aguilera, 2012). En relación al eje HPA, mientras que los CRHR1 se han relacionado con una función activadora durante la fase aguda de la respuesta al estrés, los CRHR2 parecen implicados en la reducción de la actividad del eje HPA durante la fase de recuperación post-estrés (Korosi y Baram, 2008), aunque su papel es probablemente limitado.

AVP y receptores de AVP

El nonapéptido AVP se sintetiza principalmente en neuronas del SO y en la región mPVN (revisión en Engelmann et al, 2004). Estas neuronas proyectan axones hacia la neurohipófisis y liberan la AVP a la circulación periférica, a través de la cual participa de la regulación osmótica. La AVP también se sintetiza en neuronas de CRH del mpdPVN, co-liberándose ambos péptidos al sistema portal hipofisario en respuesta a estrés. La AVP ejerce sus efectos mediante tres tipos de receptores acoplados a proteínas G: V1a, V1b (también denominado V3) y V2, siendo el V1b el responsable de las acciones de la AVP sobre las células corticotropas de la hipófisis y el V2 el que media las acciones de la AVP en el SNC. Aunque la actividad de la AVP como secretagogo de la ACTH es débil, es capaz de potenciar los efectos del CRH sobre la liberación de ACTH. Es importante destacar que en condiciones normales tan solo una fracción de neuronas CRHérgicas del mpdPVN co-expresan AVP, mientras que en condiciones de activación continuada del eje HPA (v.g. situaciones de estrés crónico) hay un incremento notable de la co-expresión (De Goeij et al, 1992). Teniendo en cuenta que la estimulación sostenida del eje HPA induce una regulación a la baja de los receptores de CRH en la adenohipófisis (Hauger et al, 1988; 1990), el incremento de AVP podría estar participando en el mantenimiento de la liberación de ACTH en respuesta al estrés. Por otra parte, se ha relacionado la activación de neuronas de AVP de la MeA y el BNST que proyectan hacia el LS y la HF con la modulación de la memoria y la conducta durante el estrés (Alescio-Lautier et al, 2000).

2.3 Hormonas periféricas: ACTH y Corticosterona

A través del sistema portal-hipofisario, el CRH y la AVP accederán a sus receptores de las células corticotropas de la adenohipófisis, donde estimularán la síntesis (CRH) y liberación (CRH y AVP) de la ACTH al torrente circulatorio (revisión en Armario et al, 2006b; Figura 1). La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos derivado de una proteína precursora mayor, la proopiomelanocortina (POMC). El curso temporal de la liberación de ACTH es rápido, alcanzando su máximo a los 10-15 min del inicio del estímulo estresante. Una vez liberada, la ACTH alcanzará la zona fasciculada de la corteza adrenal donde será reconocida por los receptores de membrana MC2-R (receptor de la melanocortina 2) (Adan y Gispen, 2000). La interacción de la ACTH con su receptor induce, entre otras acciones, un incremento del transporte de colesterol libre hacia la membrana mitocondrial interna

y la conversión del colesterol a pregnenolona, paso limitante de la síntesis de glucocorticoides. Una vez en la membrana interna, se finalizará la síntesis de glucocorticoides gracias a la acción de varias esteroide-hidroxilasas de la familia P450, incluyendo la 11β -hidroxilasa, paso final de la síntesis de glucocorticoides (Sewer y Waterman, 2003). Como consecuencia, el principal efecto fisiológico de la liberación de ACTH es la síntesis y liberación de glucocorticoides (corticosterona en rata y ratón; predominantemente cortisol en humanos y otros mamíferos). 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 sostenidos en el tiempo (Sewer y Waterman, 2003).

Aunque la ACTH es el principal mecanismo responsable de la síntesis y liberación de glucocorticoides, diferentes estudios demuestran una disociación entre la liberación de ambos. En este sentido, existen muchos factores que poseen la capacidad de modular la corteza adrenal con cierta independencia de los niveles de ACTH circulantes (Bornstein et al, 2008). La corteza adrenal está en contacto con células cromafinas, terminaciones nerviosas y células endoteliales e inmunitarias que sintetizan y liberan factores que afectan a la estereoidogénesis y pueden modificar la respuesta de la corteza adrenal. En condiciones fisiológicas, uno de los elementos que se ha implicado en la regulación de los glucocorticoides es la inervación directa de la adrenal por el nervio esplácnico, cuya estimulación favorecería la liberación de corticosterona, actuando sinérgicamente con la ACTH. Así, se ha demostrado que 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 (Urich-Lai et al, 2006a). Existen otros ejemplos de disociación de ACTH y corticosterona, aunque el papel de la inervación de la adrenal no está claro o no se ha investigado. Lesiones del avBNST inducen cambios en la liberación de la corticosterona sin ninguna alteración de la ACTH en respuesta a un estrés agudo (Choi et al, 2007). El estrés crónico también puede dar lugar a una disociación de las respuestas de ACTH y corticosterona, que en este caso parece ligada a la hipertrofia e hiperplasia adrenal resultado de la exposición crónica al estrés; cambios que contribuirían a incrementar la respuesta máxima de la adrenal a la ACTH sin afectar a la sensibilidad (Armario et al, 1985; 1988; Ulrich-Lai et al, 2006b). Dada la buena correlación entre esta capacidad máxima de secreción de corticosterona y el peso de la adrenal (Márquez et al, 2004), es posible que la primera sea consecuencia de la segunda, pero no es descartable la participación de otros mecanismos.

La secreción de glucocorticoides por la adrenal sigue un ritmo circadiano, observándose niveles más elevados alrededor de la hora de inicio de actividad (día en humanos y noche en rata y ratón), manteniéndose elevados durante un cierto tiempo, para luego descender progresivamente. Complementariamente, la secreción de glucocorticoides presenta ritmos ultradianos dando lugar a una secreción pulsátil. La preservación tanto del ritmo circadiano como del ultradiano es esencial para la función normal celular y la transcripción genética dependiente de glucocorticoides (Lightman y Conway-Campbell, 2010).

Los glucocorticoides ejercen multitud de funciones en el organismo, que pueden agruparse en dos categorías principales: moduladoras y preparatorias (revisión en Sapolsky, 2000). Las funciones moduladoras afectan directamente la respuesta del organismo frente al estrés, pudiéndose distinguir tres subtipos según las acciones que lleven a cabo: permisivas, supresoras o estimuladoras. Por acciones permisivas se entienden aquellas que facilitan la acción de otros sistemas que participan en la fase inicial de la respuesta de estrés. Estas acciones requieren de niveles mínimos de glucocorticoides previos a la situación, que prepararían los mecanismos de defensa frente al estrés. Se relacionan con las respuestas fisiológicas inmediatas (v.g. incremento en el ritmo cardíaco). Las acciones supresoras, en cambio, sí dependen de la magnitud del incremento en los niveles de glucocorticoides en respuesta a estrés y aparecen tras una hora o más después del inicio del estímulo. Su función es prevenir los efectos negativos de una respuesta sostenida del organismo al estrés, inhibiendo las respuestas inmune e inflamatoria y la actividad del propio eje HPA (mediante mecanismos de retroinhibición). Las acciones estimuladoras siguen el mismo patrón temporal que las supresoras y también dependen de la magnitud de respuesta de los glucocorticoides, pero, a diferencia de las acciones supresoras, estas últimas potencian los efectos de otras hormonas liberadas durante el estrés sobre funciones como la lipólisis o la glucogénesis. Respecto a las funciones preparatorias, son aquellas que no afectan la respuesta inmediata al estímulo estresante sino que modulan la respuesta del organismo frente a una futura situación de estrés. Las consecuencias pueden ser tanto estimuladoras como inhibitorias, por lo que estos efectos preparatorios de los glucocorticoides pueden ser especialmente relevantes en el estudio de los efectos a largo plazo de la exposición a situaciones estresantes (tanto agudas como crónicas).

Receptores de glucocorticoides

Los glucocorticoides ejercen sus acciones a través de mecanismos genómicos y no genómicos (de Kloet et al, 1998; 2009; Haller et al, 2008). Los efectos genómicos de los glucocorticoides se realizan mediante su unión a dos tipos de receptores citoplasmáticos: el tipo I (o mineralocorticoide, MR) y el tipo II (glucocorticoide, GR). Existen varias observaciones importantes respecto a la función de los receptores MR y GR:

i) Estos receptores muestran una distribución diferencial en el SNC (Reul y De Kloet, 1985). Los GR, además de encontrarse en las células corticotropas de la adenohipófisis, están ampliamente distribuidos por todo el SNC, incluyendo zonas claves para el control de la actividad del eje como el mPFC, HF, amígdala, LS, BNST, tronco encefálico y el propio PVN. Los MR tienen una localización más restringida en el SNC, concentrándose básicamente en el mPFC, HF y amígdala.

ii) Los MR tienen 10 veces más afinidad por los glucocorticoides naturales (cortisol y corticosterona) que los GR, por lo que en condiciones basales están ocupados fundamentalmente los MR (hasta un 80% en rata) (De Kloet et al., 1998; Reul y de Kloet, 1985). Los MR también presentan afinidad por la aldosterona, metabolitos del cortisol y corticoste-

rona, y progesterona. Los GR muestran una ocupación progresiva dependiente del incremento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, ya sean debidos a los cambios en la concentración producidos por el ritmo circadiano o como respuesta a una situación estresante. Además, los GR poseen gran afinidad por los glucocorticoides sintéticos, como la dexametasona.

iii) Los receptores genómicos son factores de transcripción ligando dependientes que, tras su unión al ligando, se translocarán al núcleo e interactuarán con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) o GRE negativos (nGRE), localizados en las regiones promotoras de ciertos genes (Morsink et al., 2006; Cain y Cidlowski, 2015). La interacción con los GREs se ha asociado tradicionalmente con una activación de la transcripción, mientras que la unión a nGREs da lugar a una inhibición de la transcripción. De forma complementaria, los GR son capaces 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 que podrían estar encaminadas a disminuir la reacción inicial de estrés. Posteriormente prevalecerían mecanismos de transactivación (acción sobre GREs), aunque también de transrepresión (acción sobre nGREs), que actuarían sobre procesos más lentos, relacionados con la recuperación frente a la situación y posibles mecanismos adaptativos.

Adicionalmente a estas acciones genómicas, existen claras evidencias acerca de acciones no genómicas de los glucocorticoides. Algunos efectos biológicos de los glucocorticoides son demasiado rápidos para ser mediados por acciones genómicas (que requieren de la síntesis proteica) y se asume que dependen de receptores de membrana celular (Evanson et al, 2010; Groeneweg et al, 2012). Aparte de la observación de una acción de los glucocorticoides a nivel de membrana mediada por los receptores MR y GR, también se sospecha que debe existir otros receptores aún no identificados que ejercerían su acción a través de su interacción con proteínas G). Los receptores GR y MR de membrana tienen menor afinidad por la corticosterona. Los MR promueven la neurotransmisión excitadora mediante el incremento de la liberación pre-sináptica de glutamato y el aumento de la excitabilidad post-sináptica. Por el contrario, los GR tendrían fundamentalmente un papel inhibitorio vía neurotransmisión GABAérgica y endocannabinoides (Tasker et al, 2006). Estas acciones rápidas no genómicas añaden una nueva dimensión a la plasticidad de las neuronas clave en los circuitos de estrés, al disminuir drásticamente el tiempo necesario para que se produzcan cambios en la plasticidad sináptica. Por ejemplo, se ha observado que la corticosterona, a través de una acción no genómica mediada por receptores MR, incrementa la frecuencia de potenciales post-sinápticos excitadores en miniatura y reduce la facilitación por pulsos apareados en neuronas piramidales de la HF (Karst et al, 2005).

En conjunto y en referencia al control del eje HPA, las diferentes propiedades de estos receptores refuerzan la idea de que, mientras que los MR estarían relacionados con los efectos tónicos de los glucocorticoides, los GR estarían implicados en el retorno a las condiciones basales tras la activación producida en respuesta a estrés (Ratka et al, 1989). Además, MR y GR operarían de manera complementaria en el control de la plasticidad, la

resiliencia y la adaptación al estrés. Así, mientras que los MR modularían los procesos de evaluación implicados en el inicio de las reacciones psicológicas de estrés, los GR estarían más involucrados en la gestión de las adaptaciones posteriores. Según la hipótesis del balance MR:GR, la alteración del balance en las acciones mediadas por los MR y GR da lugar a que el individuo pierda la capacidad de mantener la homeostasis si ésta se ve comprometida. Tales alteraciones en el balance pueden llevar a una condición de desregulación neuroendocrina y una deficiente adaptación conductual que potencialmente podrían promover la susceptibilidad a trastornos mentales y neurodegenerativos asociados al estrés (De Kloet, 2013).

Mecanismos de retroinhibición de los glucocorticoides

Una de las funciones más importante de los glucocorticoides, encaminada a evitar las consecuencias negativas del estrés sobre el organismo, es la de regular la propia actividad del eje HPA mediante mecanismos de retroinhibición. Esta retroinhibición tiene efectos a diferentes niveles anatómicos, entre los que se incluye la adenohipófisis, el PVN y algunas regiones suprahipotalámicas como el mPFC o la HF (revisión en Armario, 2006b; **Figura 4**).

Desde un punto de vista temporal, se pueden diferenciar tres tipos mecanismos de retroinhibición: rápidos, intermedios y lentos (Keller-Wood y Dallman, 1984). Sin embargo, estos autores denominan intermedio a lo que otros autores consideran lento, siendo para ellos este último, el correspondiente a situaciones de elevación crónica patológica o administración muy prolongada (días) de glucocorticoides. Nosotros adoptaremos la terminología más clásica que distingue entre rápido y lento. La retroinhibición rápida se inicia inmediatamente después de la liberación de glucocorticoides y depende solo de la tasa de incremento de éstos en sangre, dejando de actuar cuando los niveles se estabilizan. Dada la velocidad con la que se produce, es incompatible con la acción de los glucocorticoides mediada por receptores genómicos. Pese a que los receptores implicados en los mecanismos de retroinhibición rápida aún no se han identificado, se apunta tanto a un papel de los endocannabinoides en el bloqueo de señales glutamatérgicas aferentes al mPFC (Di et al, 2003; 2009; Evanson et al, 2010), como a un papel del óxido nítrico en la potenciación de las señales GABAérgicas aferentes (Di et al, 2009). A diferencia del anterior, los mecanismos lentos dependen del área bajo de la curva de los niveles plasmáticos de glucocorticoides durante la exposición a estrés. 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. Los mecanismos lentos vienen mediados fundamentalmente por los receptores MR y GR e implican mecanismos genómicos. Entre estos mecanismos se incluyen el bloqueo de los genes de CRH, AVP y POMC, tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés (Watts, 2005). Igualmente, se considera que la acción de los glucocorticoides sobre estructuras límbicas que controlan la actividad del eje, como la mPFC y la HF, forma parte de los mecanismos genómicos (lentos) de retroinhibición (Herman et al, 2012). En la actualidad también se sugiere que algunos mecanismos de retroinhibición lenta podrían ser debidos a una acción no genómica de los glucocorticoides que afectaría a la estabilidad

del mRNA (Zhang et al, 2006; Uchoa et al, 2014). Por ejemplo, se ha observado que la exposición a estrés o glucocorticoides dan lugar a una reducción del mRNA de preproglucagón, el cual codifica el un neuropéptido estimulador del eje HPA denominado GLP1 (glucagon-like peptide 1), en neuronas del NTS que proyectan al PVN (**Figura 4**). Este efecto es dependiente de glucocorticoides y no afecta al incremento del transcrito primario (RNA heteronuclear) de preproglucagón inducido por estrés (Zhang et al, 2006).

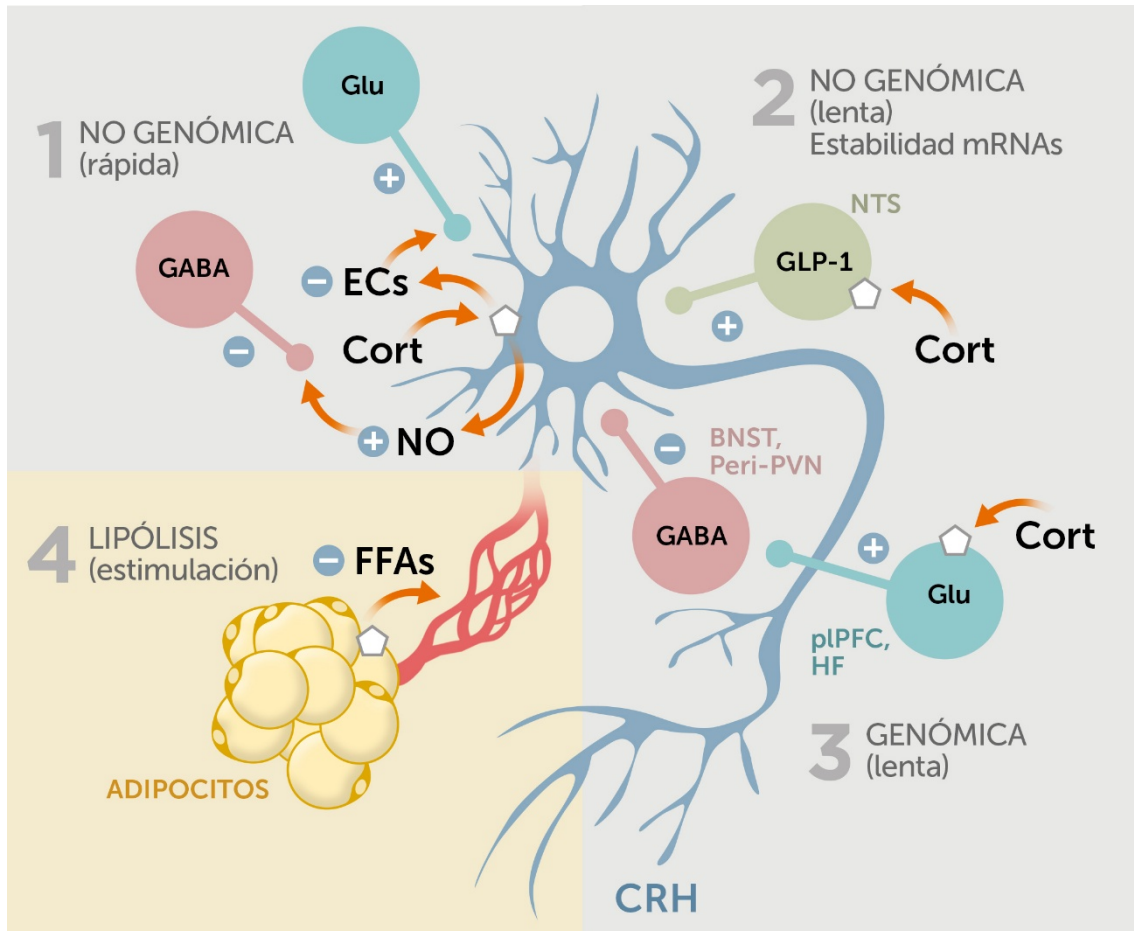


Fig. 4. Vías de retroinhibición de los glucocorticoides (GC) que regulan la actividad de las neuronas CRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

La retroinhibición de los GC se puede dividir en varios dominios que interactúan entre sí: i) Retroinhibición rápida no genómica; tanto por la inhibición mediada por endocannabinoides (EC) de las señales glutamatergicas, como por la potenciación mediante óxido nítrico (NO) de las señales GABAérgicas. ii) Retroinhibición lenta no genómica; mediante desestabilización del mRNA que codifica el péptido estimulador GLP1 (glucagon-like peptide 1). iii) Retroinhibición lenta genómica; mediante acción directa sobre las neuronas CRHérgicas del PVN o a través de estructuras telencefálicas, como la corteza prefrontal medial (mPFC) y la formación hipocámpica (HF). Tanto la mPFC como la HF envían sinapsis glutamatergicas a núcleos de relevo de proyección GABAérgica al PVN, como el núcleo del lecho de la estria terminal (BNST) y la zona peri-PVN. iv) Finalmente, los GC actúan en la periferia (v.g. sobre los adipocitos) para generar mensajeros inhibidores, como los ácidos grasos libres (FFAs), que pueden inhibir las neuronas del PVN. (adaptado de Myers et al, 2012, y Uchoa et al, 2014).

Un hecho muy importante es la posibilidad que los glucocorticoides puedan regular la actividad del eje HPA mediante la modulación de señales metabólicas periféricas. En este sentido, el laboratorio de Dallman ha aportado datos que sugieren una acción periférica

de los glucocorticoides sobre la liberación de glucosa que daría como resultado la inhibición del PVN. Por ejemplo, permitir beber sacarosa a ratas adrenalectomizadas (ADX) revierte la marcada activación del eje HPA observada tras adrenalectomía (Laugero et al, 2001). El mecanismo de acción de la sacarosa es periférico, ya que la administración central de glucosa no es capaz de reducir la activación central del eje HPA inducida por la adrenalectomía (Dallman et al, 2003). También se ha observado que el incremento de los depósitos de grasa mediante la ingesta voluntaria de dietas grasas reduce la respuesta del eje HPA al estrés (la Fleur et al, 2005). Recientemente, se ha involucrado al papel lipolítico de los glucocorticoides y la subsiguiente liberación de ácidos grasos libres a la circulación como un posible mecanismo de retroinhibición (Uchoa et al, 2014). El papel inhibitorio de los ácidos grasos libres sobre el eje HPA se produciría mediante su unión a receptores específicos localizados en las neuronas del PVN. Así, se ha observado que el tratamiento con un agonista de estos receptores inhibe tanto el grado de actividad del PVN como la liberación de corticosterona (Ryan et al, 2012), mientras que la infusión directa de un antagonista en el PVN incrementa la liberación de ACTH.

Moduladores de la acción de los glucocorticoides

Como se deriva de los múltiples efectos que tienen los glucocorticoides, tanto a nivel fisiológico como psicológico, una acción inadecuada de los mismos sobre el organismo, es fundamental que su acción esté altamente regulada. Por este motivo, las acciones de los glucocorticoides no solo están determinadas por sus niveles en sangre y por la densidad y tipo de receptores en las células diana, sino que también existen un conjunto de elementos que modulan su capacidad de acción. Entre los principales moduladores de la acción de los glucocorticoides se encuentran: la transcortina (o globulina de unión a corticosteroides, CBG), la glicoproteína P (Pgp) y las enzimas 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD).

La CBG es la proteína circulante a la cual se unen los glucocorticoides con alta afinidad. Se considera que los glucocorticoides unidos a estas proteínas son biológicamente inactivos y constituyen un reservorio de hormona inactiva. La CBG está presente en la vida joven y adulta, pero parece estar ausente durante las primeras semanas de vida, lo que podría explicar el alto grado de retroinhibición de los glucocorticoides en el periodo postnatal temprano (Enthoven et al, 2008; Schmidt et al, 2005). Ante ciertos estímulos estresantes y durante estrés crónico, la expresión de la CBG puede disminuir al mismo tiempo que se produce un incremento de los glucocorticoides (Armario et al, 1994, Martí et al 1997); en consecuencia, hay mayores niveles de glucocorticoides biológicamente activos capaces de unirse a sus receptores y ejercer su función biológica. Actualmente se postula que la CBG también podría ejercer acciones moduladoras más específicas mediante su unión a receptores en la membrana celular o de localización intracelular (incluyendo dentro del SNC) (Henley y Lightman, 2011).

La glicoproteína P (Pgp, también conocida como MDR1 o ABCB1) pertenece a una familia de proteínas transportadoras de membrana con amplia especificidad de sustrato. La

Pgp actúa como una bomba de exclusión en contra de gradiente, transportando el sustrato desde el lado citoplasmático al exterior de la célula. Se considera que este transportador limita el acceso de los glucocorticoides al SNC gracias a su afinidad por éstos y su localización en la membrana externa de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (de Kloet et al, 1998). Sin embargo, la Pgp no muestra la misma afinidad por todos los glucocorticoides. Estudios con ratones deficientes en Pgp han mostrado que estos animales no presentan diferencias en la entrada neta de corticosterona al SNC, mientras que el acceso de cortisol está incrementado (Mason et al, 2008). Igualmente, estudios post-mortem en humanos han demostrado que la corticosterona está relativamente más concentrada en el SNC que el cortisol, observándose una proporción de corticosterona en el SNC del 30 % mientras que periféricamente representa el 5-10 % (Karssen et al, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que el acceso real del glucocorticoide sintético dexametasona al SNC es muy pobre debido a la acción de la Pgp (Mason et al, 2008; Meijer et al, 1998). Este transportador también se ha observado en neuronas corticales y en el giro dentado del hipocampo (Karsen et al, 2004; Lazarowski et al, 2007; Volk et al, 2004), aunque se desconoce hasta la fecha si tiene algún papel en el control de la acción de los glucocorticoides en estas estructuras. En conjunto, las Pgp representan un mecanismo de regulación de la accesibilidad de los glucocorticoides a las células diana del SNC (limitándola), por lo que podría representar un mecanismo de protección en situaciones prolongadas de elevada liberación de glucocorticoides.

Por último, las 11 β -HSD son enzimas que metabolizan los glucocorticoides y, por tanto, regulan los niveles intracelulares de glucocorticoides disponibles para que puedan unirse a sus receptores (revisión en Holmes y Seckl, 2006). Existen dos isoformas, la 11 β -HSD tipo 1 (11 β -HSD1) y la tipo 2 (11 β -HSD2), que en la mayoría de tejidos y condiciones realizan reacciones enzimáticas opuestas. La 11 β -HSD2 actúa exclusivamente como deshidrogenasa, inactivando tanto a la corticosterona como al cortisol mediante su conversión a 11-dehidrocorticosterona o cortisona, respectivamente. Por el contrario, la 11 β -HSD1 puede actuar en los dos sentidos, aunque generalmente actúa como reductasa, regenerando corticosterona o cortisol desde sus formas inactivas 11-ceto. Esta isoforma se localiza en áreas muy relevantes para el control de la actividad del eje HPA como el mPFC, la HF y el PVN, proponiéndosele un papel facilitador de los mecanismos de retroinhibición. En este sentido, ratones carentes de esta isoforma presentan hipertrofia adrenal y niveles de ACTH y corticosterona elevados en condiciones basales, así como un pico exagerado de corticosterona en respuesta estrés. Por otro lado, se ha observado que el estrés también regula la expresión de la 11 β -HSD1, produciéndose un incremento de su expresión frente a estímulos estresantes puntuales o tratamientos cortos con glucocorticoides y un descenso de su expresión en condiciones de estrés crónico. Esto sugiere que la 11 β -HSD1, mediante cambios en su expresión, podría ejercer tanto un papel facilitador de los mecanismos retroinhibición como un papel protector frente a los efectos adversos del exceso de glucocorticoides. Respecto a la 11 β -HSD2, su papel más importante se da en la periferia permitiendo que los receptores MR del riñón se unan a la aldosterona sin la interferencia de los glucocorticoides. A nivel del SNC, la 11 β -HSD2 se expresa en múltiples

áreas durante el desarrollo, seguramente para proteger al feto del efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre la proliferación y diferenciación celular. En el cerebro adulto, la expresión de 11β -HSD2 queda confinada a núcleos de control del balance homeostático y presión sanguínea (v.g. NTS, LH y órganos circunventriculares).

2.4 Eje HPA y otros marcadores de estrés

Además de la importancia obvia de la naturaleza de los estímulos estresantes y de los mecanismos que intervienen en las respuestas de estrés, uno de los aspectos básicos que se debe tener en cuenta respecto al posible impacto negativo del estrés sobre el organismo es el grado de intensidad o la severidad del estímulo. Por este motivo, es necesario encontrar marcadores biológicos fiables que relacionen directamente la magnitud de respuesta de estas variables biológicas con la intensidad del estímulo. Aunque existen un gran número de variables fisiológicas que se modifican en situaciones de estrés, solo unas pocas presentan una respuesta proporcional a la intensidad del estímulo estresante. Estas últimas son las que podemos considerar marcadores de la intensidad del estrés; debiéndose diferenciar de aquellas que son solo marcadores de estrés, es decir que nos indican simplemente que podemos estar frente a una situación de estrés sin relación alguna con la intensidad de la situación (Armario et al, 2012). Entre los marcadores biológicos de intensidad de estrés se encuentran los niveles plasmáticos de catecolaminas (especialmente la adrenalina), la prolactina, las hormonas del eje HPA (ACTH y corticosterona/cortisol) y la glucosa, así como la reducción del peso o la ingesta en los días posteriores al estrés (Martí y Armario, 1998; Márquez et al, 2002).

Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que todos los marcadores biológicos de intensidad de estrés poseen peculiaridades particulares referentes al grado de reactividad, dinámica temporal, saturación, capacidad de mantener la respuesta frente a estímulos sostenidos o dinámica de recuperación post-estrés, que deben tenerse en cuenta, tanto a la hora de escoger el marcador adecuado como a la hora de interpretar los datos. Por ejemplo, la adrenalina, la ACTH y la prolactina, son variables muy reactivas que presentan grandes variaciones en sus niveles plasmáticos frente a perturbaciones mínimas. Por el contrario, se requiere un umbral mínimo de intensidad de estrés para que comiencen a observarse cambios en la glucosa (Armario, 2006b; **Figura 5**). El ejemplo opuesto es la corticosterona, la cual alcanza su máximo de respuesta con intensidades intermedias de estrés, debido a que la esteroidogénesis de la adrenal se satura con niveles medios-bajos de ACTH. Así, en situaciones de intensidad intermedia-alta, la respuesta de corticosterona está saturada y no refleja adecuadamente los niveles de ACTH circulantes (Kant et al, 1983). Este problema podría resolverse parcialmente si se midiesen tanto ACTH como corticosterona; aunque el problema puede persistir si intentamos distinguir entre varios estímulos, todos ellos de alta intensidad.

Una forma de solventar el problema de la saturación de las hormonas del eje HPA frente a estímulos de elevada intensidad es medir no solo la respuesta frente al estímulo, sino también durante el periodo post-estrés. La velocidad de recuperación de la respuesta de ACTH y corticosterona es capaz de discriminar la intensidad del estrés (García et al,

2000), e incluso permite diferenciar entre estímulos de elevada intensidad que causan una saturación de la respuesta de ACTH mientras los animales están expuestos, como es el caso de los choques eléctricos de elevada intensidad y la IMO (Márquez et al, 2002). De igual manera, aunque los niveles de corticosterona durante la exposición a estímulos estresantes de intensidad intermedia-alta pueden no representar una medida adecuada, el seguimiento de esta variable durante la fase de recuperación sí puede ser un buen marcador de intensidad de estrés.

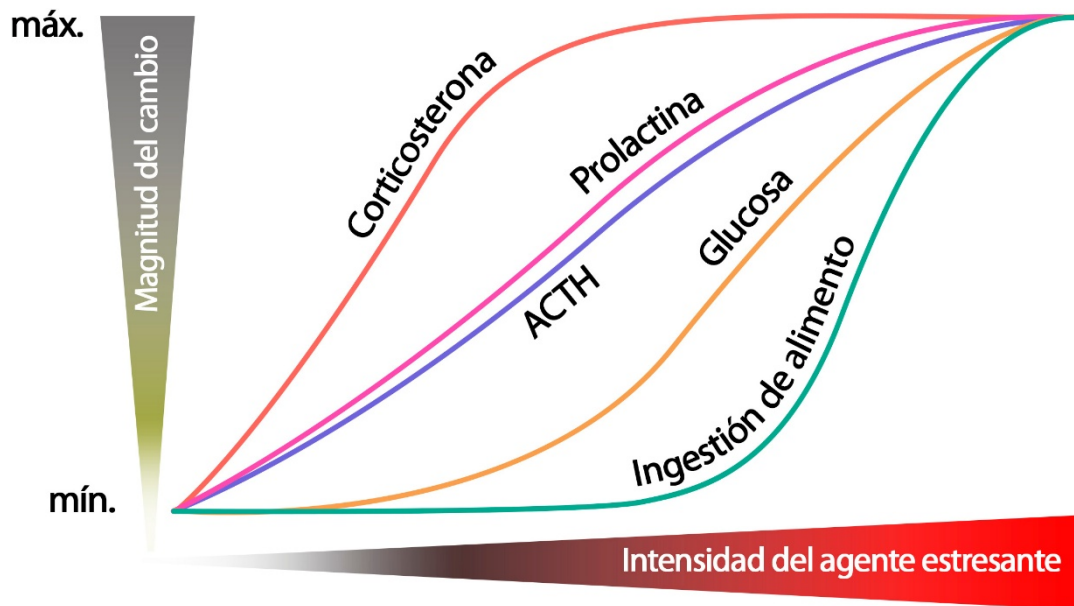


Fig. 5. Representación de la magnitud de cambio de diferentes variables fisiológicas según la intensidad del estímulo estresante.

Los niveles de intensidad incrementan progresivamente de izquierda a derecha. Las curvas que representan cada variable tienen un patrón determinado que indica diferentes niveles de reactividad y de saturación de respuesta dependiendo de la intensidad del estímulo. Particularmente destacable es la saturación de la respuesta de corticosterona con relativamente bajos niveles de intensidad de estrés (Adaptado de Armario, 2012).

Como hemos comentado anteriormente, otro factor importante a tener en cuenta es la capacidad de cada variable de mantener su nivel de respuesta frente a estímulos sostenidos. La ACTH es de liberación rápida, pudiéndose determinar su respuesta frente a un estímulo estresante a partir de los 5 min de inicio del mismo. Si el estímulo no cesa, se observará un pico máximo a los 15 min, que se podría mantener aproximadamente hasta pasados 60 min del inicio. Una vez pasado este tiempo y aunque el estímulo persista, los niveles de ACTH disminuirán hasta alcanzar niveles próximos a los basales (Hauger et al, 1988). Debido a esta dinámica, la ACTH no es una medida apropiada para valorar estímulos de larga duración (superiores a 1 h). Por su parte, la liberación de corticosterona sigue una dinámica más lenta, observándose un máximo de respuesta a los 15-20 min del inicio del estrés cuando éste es muy breve. Si el tiempo de exposición es más prolongado, la respuesta de corticosterona puede alcanzar su máximo entre los 30-60 min del inicio

(Dal-Zotto et al, 2004), manteniéndose en estos niveles elevados hasta que no cesa el estímulo estresante (Belda y Armario, datos no publicados).

En conjunto, podemos afirmar que las hormonas del eje HPA son buenos marcadores de la intensidad, aunque para obtener unos datos fiables debemos tener en cuenta sus dinámicas de liberación, de saturación y de recuperación. Por ejemplo, frente a estímulos estresantes de corta duración (10-15 min), los valores de ACTH justo al acabar el estímulo pueden aportar una información más precisa de su intensidad que no la corticosterona. Esto se debe a que es probable que la corticosterona aún no haya alcanzado su máximo de respuesta, y que éste se produzca durante el periodo de recuperación.

3. Consecuencias del estrés: tolerancia y sensibilización

Las consecuencias fisiológicas y conductuales derivadas de la exposición a situaciones estresantes han sido extensamente estudiadas durante décadas. Gracias a estos estudios, hoy en día está ampliamente aceptado que la exposición previa al estrés puede inducir cambios en el SNC que den lugar a respuestas fisiológicas y conductuales alteradas frente a una nueva exposición a estímulos estresantes (Armario, 2006b; Armario et al, 2008). Muchos de estos cambios pueden ser apreciados tan solo durante los minutos u horas posteriores a la exposición previa al estrés, pero algunos pueden permanecer durante días o meses (efectos a corto y a largo plazo, respectivamente).

Una historia previa de estrés puede inducir tanto una menor respuesta fisiológica y/o conductual a situaciones estresantes posteriores, como un incremento de estas respuestas (Martí y Armario, 1998; Armario et al, 2008; Belda et al; 2008; Grissom y Bhatnagar, 2009). Expresado brevemente, mientras la exposición previa a situaciones de estrés, agudas o crónicas, generalmente da lugar a respuestas normales o acentuadas frente a estímulos estresantes diferentes (heterotípicos), suele producirse una reducción de las respuestas frente al mismo estímulo (homotípico). No obstante, en algunas ocasiones se ha constatado que la re-exposición al estímulo homotípico también da lugar a un incremento de respuesta. Algunos de los parámetros involucrados en estas discrepancias todavía están por determinar, aunque emerge cierta coherencia si tenemos en cuenta tanto la intensidad como la naturaleza de los estímulos estresantes utilizados para inducir los efectos.

Aunque este trabajo se centra en el estudio de la sensibilización a largo plazo de las respuestas de estrés inducida por la exposición aguda a estímulos estresantes predominantemente emocionales, creemos conveniente aportar también información acerca de la sensibilización cruzada inducida por la exposición previa a estrés crónico, así como de las posibles razones de la disminución de las respuestas a situaciones estresantes agudas por la exposición previa (tanto aguda como crónica) al estrés. La comparación de estos procesos nos puede facilitar una visión más completa de los efectos de la exposición previa al estrés.

3.1 Exposición previa al estrés y tolerancia

Efectos sobre marcadores biológicos de estrés

Actualmente existen muchos datos en la bibliografía que demuestran que la exposición repetida durante varios días o semanas a un mismo estímulo estresante puede dar lugar a una disminución progresiva de la respuesta del eje HPA y otras variables fisiológicas (niveles plasmáticos de adrenalina e hiperglucemia), frente al estímulo homotípico (Martí y Armario, 1998; Grissom y Bhatnagar, 2009; Armario, 2006b). A este fenómeno se le denominó inicialmente adaptación, aunque posteriormente fue imponiéndose el término habituación, asumiendo que la adaptación a la exposición diaria al estímulo homotípico seguía las leyes de la habituación (Natelson et al, 1988; De Boer et al, 1990; Ma y Lightman, 1998). No obstante, la hipótesis de que la adaptación al estrés repetido es un fenómeno similar a la habituación nunca había sido especialmente elaborada desde un punto de vista teórico ni se había comprobado experimentalmente de forma sistemática, hasta muy recientemente en nuestro laboratorio (Rabasa et al, 2015). El interés por reanalizar la adaptación al estrés crónico fue en parte debido al hecho de demostrarse consistentemente que una única exposición al estrés también era capaz de reducir la respuesta de diferentes variables fisiológicas cuando los animales eran expuestos días más tarde al mismo estímulo (Armario et al, 2004; 2008). El efecto se observaba con estímulos emocionales e incluso con algunos estímulos sistémicos como la endotoxina bacteriana. Inicialmente denominamos a este proceso desensibilización homotípica a largo plazo para diferenciarlo del proceso de adaptación producido por la exposición crónica al mismo estímulo estresante (Armario et al, 2004).

Aunque no es el objetivo de la presente tesis discutir la base teórica de los diferentes conceptos, sí es importante destacar que los datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que el proceso de adaptación al estrés crónico repetido no sigue las leyes de la habituación, y que en realidad adaptación y desensibilización son el mismo fenómeno, de tal manera que, bajo ciertas circunstancias, una única exposición a estrés es suficiente para inducir máxima adaptación del eje HPA (Rabasa et al, 2015). En base a estas evidencias y otros datos de la literatura, proponemos cambiar la denominación de habituación para referirse al proceso de adaptación al estrés crónico repetido y ofrecemos como alternativa denominarlo **tolerancia**. Este concepto es neutro en cuanto a los mecanismos subyacentes y es aplicable independientemente del número previo de exposiciones y de la naturaleza particular del estímulo estresante (emocional o sistémico).

También es importante comentar, en relación a la tolerancia al estrés, que ésta no se explica por una pérdida generalizada de capacidad de respuesta neuroendocrina ya que la exposición a estímulos heterotípicos acostumbra a generar respuestas normales o incrementadas (Dallman et al, 1992; Martí y Armario, 1998; Grissom y Bhatnagar, 2009; Kvetnansky et al, 2009). Por lo tanto, la tolerancia al estímulo homotípico no es debida a cambios bioquímicos desencadenados por la exposición a la situación estresante (v.g. agotamiento de la capacidad de secreción de las glándulas endocrinas), sino que parece

más adecuado atribuirle a una menor activación emocional, consecuencia de la familiarización con la situación (Martí y Armario, 1998). En consonancia con esta idea, los parámetros que muestran una mayor capacidad de tolerancia son principalmente aquellos que hemos descrito anteriormente como marcadores de intensidad de estrés (ACTH, corticosterona/cortisol, adrenalina, prolactina, glucosa, reducción del peso o ingesta), aunque en el caso de la prolactina, por razones que se desconocen, solo se produce tolerancia con estímulos de baja intensidad.

No siempre se observa tolerancia de la respuesta neuroendocrina a la exposición diaria al estímulo homotípico, y en ello parece tener especial relevancia la naturaleza del estímulo estresante estudiado. Así, mientras que la exposición (aguda o crónica) a estímulos de naturaleza predominantemente emocional suelen originar tolerancia de la respuesta del eje HPA al mismo estímulo, ésta no se produce generalmente en respuesta a estímulos sistémicos repetidos, como hemorragia o hipoglucemia inducida por insulina (Aguilera, 1994; Martí y Armario, 1998; Grissom y Bhatnagar, 2009). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos observado que una única administración de endotoxina (LPS) a altas dosis, da lugar a una menor respuesta del eje HPA tras re-exponer a los animales al mismo estímulo 1 o 4 semanas más tarde, mostrándose el efecto fundamentalmente en fases tardías de la respuesta aguda a la endotoxina (Vallès et al, 2002). Por el contrario, la exposición a un estímulo estresante sistémico que puede poner en mayor peligro real al animal, como una hipoglucemia profunda inducida por insulina, no modifica a largo plazo la respuesta del eje HPA al estímulo homotípico (Armario et al, 2004). Estas discrepancias pueden explicarse por el hecho de que la activación del eje HPA está encaminada a mantener la homeostasis y, por lo tanto, parece razonable asumir que una reducción progresiva de su respuesta solo se producirá si el organismo es capaz de desarrollar procesos adaptativos compensatorios. Si no es así, tal y como sucede con gran número de estímulos sistémicos, la respuesta del eje HPA se mantendrá a pesar de la repetición del estímulo o incluso se incrementará si la homeostasis se ve gravemente comprometida por la re-exposición al estímulo, como parece ser el caso de la hemorragia (Smith et al, 1988; Thrivikraman and Plotsky, 1993).

Centrándonos en los estímulos de naturaleza esencialmente emocional, es muy consistente en la literatura la observación de tolerancia de la respuesta de la ACTH tras la exposición repetida diariamente al mismo estímulo (Martí y Armario, 1998; Martí et al, 2001; Armario et al, 2004; Armario, 2006b; Grissom y Bhatnagar, 2009). En cambio, en muchos casos, los datos referentes a la respuesta de la corticosterona justo al finalizar la situación de estrés no indican tolerancia homotípica (v.g. Natelson et al, 1988; Orr et al, 1990). De hecho, nuestro laboratorio ha observado de forma reiterada que la exposición repetida a un estímulo estresante intenso como la IMO induce al mismo tiempo una disminución marcada de los niveles de ACTH y un incremento de los niveles de corticosterona en plasma cuando estos parámetros son medidos inmediatamente después de acabar el estímulo estresante (v.g. Armario et al, 1988a; Márquez et al, 2004). Esta paradoja puede explicarse fácilmente debido a que la exposición crónica al estrés puede producir un incre-

mento de la capacidad máxima de la glándula adrenal para secretar corticosterona (Armario et al, 1988a; Ulrich-Lai et al, 2006). Además, como ya se ha comentado anteriormente, un factor importante a tener en cuenta es que la síntesis de glucocorticoides se satura con niveles relativamente bajos de ACTH (Keller-Wood et al., 1983), de tal forma que los niveles de corticosterona ya no reflejan los de ACTH. En ambos casos el problema puede solventarse midiendo los niveles de corticosterona en los períodos de recuperación post-estrés. En estas condiciones, se puede apreciar que la exposición crónica a la IMO también induce de forma consistente tolerancia en la respuesta de la corticosterona (v.g. García et al, 2000; Martí et al, 2001; Belda et al, 2004; Márquez et al, 2004; Daviu et al, 2014; Rabasa et al, 2015a). Es importante recalcar la importancia de estas dos observaciones (capacidad máxima de respuesta y saturación) para poder entender gran parte de las discrepancias en la bibliografía acerca de la tolerancia de la respuesta del eje HPA. Estas discrepancias surgen porque en algunos estudios se ha interpretado el efecto sobre el eje HPA valorando únicamente la respuesta de corticosterona y solo al acabar el estímulo. Teniendo en cuenta estos argumentos, podemos concluir que la respuesta periférica global del eje HPA se ve claramente reducida por la re-exposición a un gran rango de estímulos estresantes predominantemente emocionales (Martí y Armario, 1998; Martí et al, 2001; Armario et al, 2004; Belda et al, 2004; Armario, 2006b; Grissom y Bhatnagar, 2009).

Si atendemos a las características de los estímulos estresantes emocionales que permiten una mayor tolerancia de la respuesta del eje HPA tras una sola experiencia previa, se observa, en contraposición a lo que podría pensarse, que ésta es directamente proporcional a la intensidad del estímulo estresante. Así, Martí et al (2001) mostraron que la reducción de la respuesta era más intensa con la IMO (intensidad muy alta) que con el *restraint* (intensidad moderada) y con éste más que con la incisión en la cola (intensidad baja). Comparando dos cepas de rata (Sprague-Dawley y Wistar), la IMO también produjo una mayor tolerancia al estímulo homotípico que el choque eléctrico en las patas de 0,5 mA (menos intenso que la IMO), independientemente de la cepa (Belda et al, 2004). En algunos de estos casos los efectos a largo plazo fueron más evidentes con los niveles plasmáticos de corticosterona que con los de ACTH, lo que sugiere algún tipo de influencia de la exposición previa al estrés sobre la regulación de la respuesta adrenocortical independiente de la ACTH (Armario et al, 2006b). La relación entre intensidad del estímulo y la tolerancia al estrés crónico también se ha demostrado fehacientemente en uno de nuestros trabajos recientes (Rabasa et al, 2015). En él, al comparar la respuesta del eje HPA a la exposición diaria a *restraint* o a IMO, se demostró que la IMO producía una mayor tolerancia máxima de la respuesta de ACTH que el *restraint*. Además, esta tolerancia máxima apareció ya al segundo día en el caso de la IMO, mientras que en el caso del *restraint* no fue evidente hasta la sexta exposición. Resultados similares se observaron al comparar la exposición diaria a la IMO con otro estímulo de menor intensidad, consistente en exponer a los animales a un cilindro conteniendo una pequeña cantidad de agua.

Aparte de la intensidad del estímulo, existen otros factores que afectan al proceso de tolerancia. Si bien la exposición aguda a la IMO en un rango de 20 min a 2 h produce un grado similar de tolerancia a una segunda exposición llevada a cabo una semana después

(Martí et al, 2001; Dal-Zotto et al, 2003; 2004). La reducción es mucho más discreta con una exposición muy breve (1 min) que con una exposición de 20 min (Dal-Zotto et al, 2004). En el mismo sentido, la exposición diaria a 3h de IMO también muestra un mayor grado de tolerancia a la re-exposición al estímulo que la exposición diaria a 1 h de IMO (Rabasa et al; 2015), observándose además que la exposición repetida a 3 h de IMO da lugar a una marcada reducción de la respuesta inicial de la ACTH ya al segundo día de exposición, que apenas se ve afectada por experiencias adicionales con la situación. Estos resultados no solo confirman que una única exposición a la IMO es suficiente para inducir una tolerancia similar a la de la exposición repetida respecto a la respuesta del eje HPA, sino que apoyan la hipótesis de que la adquisición de la tolerancia al estrés dependería de la duración de la sesión de exposición al estímulo estresante.

El intervalo de tiempo transcurrido entre exposiciones también es importante en el proceso de tolerancia. La comparación de la respuesta del eje HPA a la IMO en ratas expuestas 1, 7 o 13 días antes a 1 h de IMO muestra que la reducción de las respuestas de ACTH y corticosterona es mayor en el grupo re-expuesto 13 días después, aunque este efecto es mucho más evidente para la corticosterona y especialmente en los tiempos post-estrés (Martí et al, 2001). En concordancia, la exposición repetida a la IMO con dos intervalos de tiempo diferentes entre cada exposición (1 o 3 días) también muestra que la adquisición de tolerancia de la respuesta de la ACTH es más acentuada a lo largo de las sesiones cuanto mayor es el intervalo de tiempo transcurrido entre éstas (Rabasa et al; 2015). Lo mismo se observa con un estímulo de menor intensidad (exposición a un recipiente cilíndrico con un poco de agua). Estos datos sugieren que tras una primera exposición a la IMO ya se producen cambios que pueden desarrollarse en períodos de tiempo largos (días, semanas) y van a reflejarse en reducción de la respuesta al estímulo homotípico. Una posible explicación para el efecto de la intensidad y duración del estímulo estresante es que el tipo de memoria acerca de la situación que determina la reducción de la respuesta del eje HPA pueda requerir de algunos días para consolidarse completamente después de exposiciones relativamente cortas a los estímulos estresantes, y que esta consolidación se produciría más rápidamente con estímulos estresantes más intensos.

La tolerancia del eje HPA al estrés ha sido caracterizada a nivel del PVN. Así, mediante el estudio de la expresión del gen de expresión temprana *c-fos* (considerado un buen marcador de activación neuronal; Hoffman y Lio, 2002) se ha descrito una reducción de la activación del PVN en animales expuestos crónicamente al ruido (Campeau et al, 2002), al *restraint* o a la IMO (Unemoto et al, 1994a; 1994b; 1997; Bonaz y Rivest, 1998; Girotti et al, 2006; Ons et al, 2010; Rabasa et al, 2015a), al olor al depredador (Weinberg et al, 2009) y a la derrota social (Kollack-Walker et al, 1999). Una sola exposición previa a la IMO también da lugar a una marcada reducción de la expresión de *c-fos* en el PVN en respuesta al mismo estímulo una semana después de la primera exposición, siendo el efecto menor, aunque significativo, tras cuatro semanas (Vallès et al, 2003; 2006). Este efecto sobre la expresión de *c-fos* no concuerda con lo que se observa generalmente en la respuesta periférica del eje HPA, que alcanza una reducción máxima (o casi máxima) con una sola exposición previa, indicando que hay factores que afectan a la liberación de

ACTH independientemente de la activación del PVN valorada mediante la inducción de c-fos. Sin embargo, esta disociación no es sorprendente puesto que las señales electrofisiológicas son cruciales para la liberación de CRH y otros secretagogos al sistema portal hipofisario, en tanto que la inducción de c-fos es dependiente de la activación de vías bioquímicas intracelulares, y la experiencia previa puede impactar de forma diferente sobre estos dos procesos.

La disociación entre activación electrofisiológica de la neurona y la inducción de c-fos también es extensible a la expresión del gen de CRH. Una reducción de la expresión del gen de CRH en respuesta al estímulo homotípico también se ha observado tras exposición crónica a *restraint* (Ma y Lightman, 1998; Ma et al, 1999; Girotti et al, 2006). Con una sola exposición previa al estímulo estresante, hemos observado que el incremento en la expresión del CRH desencadenado por una segunda exposición al estímulo homotípico solo se ve reducido al cabo de cuatro semanas y no de una semana, tanto en el caso de la IMO (Martí et al, 2001; Vallès et al, 2003) como en el del LPS (Vallés et al, 2002). Los cambios que controlan la actividad transcripcional del gen del CRH y aquellos que afectan a la liberación de ACTH y corticosterona parecen no coincidir temporalmente: la máxima reducción de la respuesta periférica del eje del HPA se observa ya durante la primera semana posterior a la exposición al estímulo estresante, mientras que a nivel central (mRNA y hnRNA de CRH en el PVN) es necesario un período de incubación de al menos cuatro semanas para observar una disminución (Martí et al, 2001; Vallès et al, 2002; 2003; 2006). No se conocen los procesos implicados en esta disociación.

Algunas características específicas de los estímulos estresantes utilizados en el laboratorio pueden interferir en el proceso de tolerancia, obteniéndose una respuesta neuroendocrina inalterada o, incluso, aumentada (sensibilizada) tras la repetición del estímulo. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la temperatura del agua es un parámetro crítico para que se produzca tolerancia del eje HPA en respuesta a la natación forzada. Así, una temperatura del agua relativamente baja (24-25° C), que provoca hipotermia, interfiere con la tolerancia de la respuesta del eje HPA típicamente observada cuando la temperatura del agua es más elevada (36° C), en cuyo caso no se produce hipotermia (Dal-Zotto et al, 2000; Rabasa et al, 2013). Estas observaciones apoyan datos previos describiendo que la exposición repetida a la natación forzada a 34° C causaba tolerancia de las respuestas tanto de adrenalina como de noradrenalina, en tanto que la exposición diaria a la natación a 18 o 24° C no inducía tolerancia de la adrenalina y la respuesta de noradrenalina incluso se incrementaba (Konarska et al., 1990). En conjunto, los datos sugieren que la componente sistémica (hipotermia) de la situación estresante puede ser la responsable de la interferencia con los procesos adaptativos que permiten una reducción de la respuesta al estrés. Esta interpretación viene apoyada por un estudio en el que se observa un descenso de la respuesta de catecolaminas en plasma tras la exposición diaria a la IMO, mientras que la respuesta a la exposición diaria a un estímulo estresante que puede conllevar lesiones o procesos inflamatorios (rotación en el tambor de Noble-Collip) está incrementada (Kvetnansky et al, 1984).

Resultados similares se han observado en animales expuestos repetidamente al choque eléctrico, otro estímulo que puede tener una componente sistémica importante (v.g. dolor e inflamación local). Por ejemplo, Orr et al (1990) observaron un incremento de la respuesta de la ACTH y la corticosterona tras la exposición diaria a choques en la cola. Más recientemente, nuestro laboratorio ha comparado la tolerancia de la respuesta de la ACTH a la exposición diaria a la IMO y a dos intensidades diferentes (baja y alta) de choque eléctrico en las patas (Rabasa et al, 2011). A pesar de que la IMO parece ser un estímulo estresante más intenso que el choque eléctrico en las patas de alta intensidad teniendo en cuenta los marcadores biológicos de estrés, se observó tolerancia de la ACTH tanto a la exposición repetida a la IMO como al choque eléctrico de baja intensidad, pero no al choque eléctrico de alta intensidad. Por lo tanto, las discrepancias no parecen estar relacionadas con una mayor intensidad del choque como estímulo estresante respecto a la IMO, sino con la posibilidad de que a partir de ciertas intensidades de choque eléctrico se pueda producir daño tisular o se puedan activar vías nociceptivas que interfieran con la tolerancia.

Aunque se ha descrito una sensibilización de la respuesta de la corticosterona a la exposición diaria de ratas a un gato (potencial depredador de la rata), los resultados son difíciles de interpretar dado que no se aportaron los datos de ACTH (Figueiredo et al., 2003a). Además, en otros estudios la exposición repetida tanto a olor a gato como a olor a hurón (otro potencial depredador de la rata) ha mostrado inducir tolerancia, y no sensibilización, tanto a nivel del eje HPA como a nivel central (File et al, 1993; Campeau et al, 2008; Weinberg et al, 2009). Por consiguiente, parece improbable que un estímulo puramente emocional como la exposición al depredador cause sensibilización.

La tolerancia no está restringida al eje HPA, habiéndose observado también con otras variables fisiológicas tras la re-exposición a estímulos estresantes emocionales. En referencia al eje SMA, aunque se observa tolerancia tras la exposición crónica al estrés homotípico, tanto en la respuesta de adrenalina como en la de noradrenalina (McCarty et al, 1988; Konarska et al, 1989a; De Boer et al, 1990), la reducción de la respuesta es siempre más evidente en el caso de la primera (De Boer et al, 1989), en consonancia con el hecho de que la adrenalina es más sensible a la intensidad del estímulo estresante (Natelson et al, 1987). Puesto que la hiperglucemia inducida por estrés está ligada a la liberación de catecolaminas (Armario, 1998), es congruente que ésta también se vea reducida tras la exposición repetida a estímulos estresantes emocionales (v.g. Armario et al, 1990; Lachuer et al, 1994; Márquez et al, 2004). Al igual que el eje HPA, el eje SMA se adapta de forma específica al estímulo homotípico, ya que tras un periodo de estrés crónico suele observarse una respuesta incrementada ante un estímulo heterotípico (McCarty et al, 1988; Konarska et al, 1989b; Rusnak et al, 2001).

Una historia previa de estrés crónico ha mostrado tener un efecto protector sobre otros parámetros, como la pérdida de peso y de ingesta cuando los animales son re-expuestos al estímulo homotípico (Pastor-Ciurana et al, 2014). El efecto protector no parece requerir de una exposición repetida al estímulo. Una sola sesión de 1 o 20 min de IMO ofrece

un efecto protector sobre el descenso de la ingesta inducido por una segunda exposición a la IMO una semana más tarde (Dal-Zotto et al, 2004). Es interesante hacer notar que, mientras que el grado de desensibilización del eje HPA parece estar relacionado con el tiempo de exposición a la IMO (mayor con 20 min que con 1), la protección frente a la disminución de la ingesta fue igual con ambos tiempos, lo que sugiere una sensibilidad diferente de las distintas variables al grado de experiencia previa con la situación estresante.

Efectos sobre la conducta

A nivel conductual, la re-exposición a estímulos estresantes emocionales también es capaz de inducir tolerancia en determinadas respuestas al estímulo. Así, se ha observado consistentemente que la exposición repetida a la natación forzada, al *restraint* o la IMO da lugar a un progresivo descenso de las conductas activas de escape frente al estímulo homotípico (v.g. Kitada et al, 1981; Dal-Zotto et al, 2000; Grissom et al, 2008, Tynan et al, 2010; Kearns et al, 2013; Rabasa et al, 2013; Pastor-Ciurana et al, 2014). Estos estímulos tienen en común la imposibilidad de escapar de la situación, por lo que el descenso de las conductas de escape estaría relacionado con la adopción de estrategias de afrontamiento pasivo frente a situaciones reconocidas como inescapables.

También se observa tolerancia en los efectos conductuales del estrés evaluados inmediatamente después o al cabo de varias horas de la exposición, siendo la conducta en ambientes nuevos el parámetro más estudiado. Así, la exposición repetida a la misma situación estresante tiene un menor impacto inhibitorio sobre la actividad motora y exploratoria en el campo abierto (v.g. Kennet et al, 1985a; 1986; Pol et al, 1992; Daviu et al, 2014b; Pastor-Ciurana et al, 2014) o sobre la inducción de conductas ansiosas en el EPM o en la prueba de luz-oscuridad (v.g. Cancela et al, 1995; Netto et al, 2002). La inhibición de las conductas activas inducidas por la exposición a estímulos estresantes intensos parece estar relacionada con la imposibilidad de mantener unos niveles apropiados de noradrenalina en ciertas áreas del SNC (Glazer et al, 1975; Weiss et al 1975a; 1975b), por lo que la recuperación de la actividad tras la exposición repetida a un mismo estímulo estresante podría explicarse por el incremento potencial de la capacidad de síntesis de noradrenalina tras una historia previa de estrés crónico, lo que evitaría la reducción de los niveles de noradrenalina tras la exposición aguda a estímulos de elevada intensidad (Weiss et al 1975b; Kvetnansky et al, 2009). Es importante destacar que al menos con algunas variables conductuales, el efecto protector aparece también frente a estímulos heterotípicos. Este hecho es compatible con la posibilidad de que algunos cambios conductuales sean consecuencias del descenso en los niveles de noradrenalina, dado que una historia previa de estrés puede incrementar notablemente la capacidad para sintetizar noradrenalina, impidiendo así su descenso incluso en nuevas situaciones de estrés de elevada intensidad.

El papel relevante de la noradrenalina no descarta que otros sistemas de neurotransmisión puedan ser importantes. Por ejemplo, los opioides endógenos podrían mediar en el efecto protector que tiene la exposición diaria a *restraint* sobre los efectos ansiogénicos producidos tanto por la exposición aguda al mismo estímulo como por la exposición aguda a

choques eléctricos en las patas (Cancela et al, 1995), volviendo de nuevo a ponerse de manifiesto tolerancia cruzada. Es importante puntualizar que la reducción del impacto del estrés sobre la conducta en ambientes nuevos no es tan evidente cuando el protocolo de estrés crónico incluye el uso de choques eléctricos (v.g. Pastor-Ciurana et al, 2014), por las características particulares del choque, que mencionaremos más adelante.

Una historia previa de estrés crónico ha mostrado tener un efecto protector sobre la disminución del consumo de sacarina, usualmente relacionada con un estado de anhedonia (v.g. Pucilowski, 1993), cuando los animales son re-expuestos al estímulo homotípico (Plaznik et al, 1989; Pastor-Ciurana et al, 2014). En este caso, la protección parece específica para el estímulo homotípico.

Áreas del SNC y mecanismos implicados

Puesto que la tolerancia observada en los sistemas fisiológicos periféricos es considerada como una consecuencia de cambios a nivel del SNC, no es de extrañar que, aparte del PVN, también aparezca tolerancia al estrés crónico en áreas implicadas en el procesamiento de los estímulos estresantes emocionales. Así, se ha encontrado una menor inducción de *c-fos* tras estrés crónico en áreas de procesamiento emocional (como la mPFC, amígdala, BNST, LS o LC), en los núcleos talámicos implicados en el procesamiento sensorial de los estímulos estresantes y en las áreas corticales sensoriales primarias específicamente relacionadas con el tipo de estímulo estresante utilizado (v.g. Melia et al, 1994; Campeau et al, 2002; Girotti et al, 2006; Day et al, 2009; Weinberg et al, 2009; Ons et al, 2010; Rabasa et al, 2015a). Esto indicaría que a nivel del SNC, la tolerancia al estrés crónico implicaría una inhibición generalizada que afectaría a todas las áreas telencefálicas y diencefálicas implicadas en el procesamiento de los estímulos estresantes. También se ha estudiado mediante la expresión de *c-fos* el efecto de una única exposición a la IMO sobre el grado de activación de áreas del SNC que podrían participar de la reducción a largo plazo de la respuesta a la IMO (Vallès et al, 2006). Los resultados de este estudio muestran una reducción del mRNA de *c-fos* en el LS en respuesta a la IMO, tanto 7 como 28 días después de la primera exposición. La MeA y el LC también mostraron una menor respuesta, aunque esta reducción solo se observó a los 7 días post-IMO. Por el contrario, en la subdivisión anterior-ventral de BNST (avBNST) se observó un incremento de la inducción de *c-fos* a los 7 días post-estrés. En el resto de áreas estudiadas no se encontraron diferencias en función de la experiencia previa con la IMO, sugiriendo que los cambios en el PVN podrían ser secundarios a las modificaciones en la MeA y el LS. Comparando los efectos de una experiencia previa y de la experiencia repetida con la IMO, parece evidente que el impacto de la exposición repetida a la IMO sobre la expresión de *c-fos* es en general mayor que la producida por una única exposición previa.

En base a lo observado con la expresión de *c-fos*, es muy posible que sean múltiples las estructuras del SNC que participan en el proceso de tolerancia al estrés. Es de suponer que las señales inhibitorias que conducirían a una menor respuesta al estímulo homotípico se originen en estructuras que procesan algún tipo de memoria respecto a las carac-

terísticas específicas del estímulo estresante puesto que, al igual que sucede a nivel periférico, la expresión de c-fos ante un estímulo heterotípico no se encuentra alterada o, incluso en algunos casos, se observa un incremento de la misma (v.g. Melia et al, 1994; Bhatnagar y Dallman, 1998; Weinberg et al, 2009). Recientemente se ha propuesto que la ínsula podría estar involucrada en la elaboración de señales de seguridad que participarían en la tolerancia al estrés repetido (Rabasa et al, 2015a), ya que existen evidencias que relacionan a esta estructura con la influencia beneficiosa de las señales de seguridad para reducir las consecuencias negativas de los choques eléctricos en el paradigma de indefensión aprendida por choques en la cola (Christianson et al, 2008; 2011). En este sentido, también se ha sugerido que aquellas áreas que están involucradas en la formación y consolidación de las memorias relacionadas con las situaciones estresantes podrían tener un papel relevante en la tolerancia al estrés (Grissom y Bhatnagar, 2011). Estos últimos autores han mostrado que la administración diaria de un bloqueante de los receptores β -adrenérgicos (propranolol) directamente en la BLA bloquea la reducción de la respuesta de la ACTH tras la exposición repetida al *restraint*, implicando a este núcleo en la inducción del fenómeno de tolerancia. Este papel de la BLA es compatible con los datos que muestran una disminución de la expresión de c-fos, tanto tras una sola exposición previa a la IMO como tras la exposición repetida a este estímulo (Rabasa et al, 2015a), y con el papel ampliamente aceptado de la BLA en la consolidación de diferentes tipos de aprendizajes asociativos con componente emocional (McGaugh, 2004).

Por el contrario, la zona posterior del núcleo paraventricular del tálamo (pPVTh) se ha implicado específicamente en la tolerancia al estrés crónico, dado que lesiones de este núcleo bloquean la inducción de la tolerancia del eje HPA al *restraint* sin afectar a la respuesta aguda al estrés (Bhatnagar et al, 2002). En el mismo sentido, lesiones de este núcleo dan lugar a un incremento de la liberación de ACTH ante un estímulo estresante heterotípico solo si ha habido una historia previa de estrés crónico (Bhatnagar y Dallman, 1998; Bhatnagar et al, 2000), lo que sugiere que su papel facilitador se desarrollaría durante el periodo de estrés crónico. La participación de este núcleo en los procesos de tolerancia podría estar relacionada, al menos parcialmente, con cambios en la retroinhibición del eje HPA ejercida por los glucocorticoides. Aunque no está claro como ejercería este efecto sobre el eje HPA, el pPVTh envía proyecciones a distintos núcleos de la amígdala (central, basomedial y basolateral), BNST, núcleo accumbens y mPFC (Jaferi y Bhatnagar, 2006), y probablemente, podría también afectar a la actividad del PVN mediante proyecciones indirectas. Aunque se han implicado otras áreas como el mPFC en la tolerancia al estrés crónico (Weinberg et al, 2010b), los resultados son complejos de interpretar.

Existen pocos datos acerca del efecto del estrés sobre los núcleos de proyección catecolaminérgica del tronco encefálico y el papel que pueden tener éstos en los procesos de tolerancia al estrés. En los estudios en los que se ha valorado el efecto sobre la transcripción de las enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas (como la tirosina hidroxilasa; TH), no siempre se han aportado los niveles basales previos a la última exposición, dando lugar a confusiones en la interpretación de los resultados (v.g. Makino et al, 2002). Sin

embargo, cuando se han aportado los niveles basales, se ha podido observar que la exposición diaria a la IMO promueve una reducción de la respuesta aguda de TH al estímulo homotípico, a pesar de causar un incremento en los niveles basales de mRNA (Rusnak et al, 2001). En el mismo sentido, la exposición diaria a ráfagas de aire en la cara (un estímulo estresante relativamente suave) también reduce la expresión de TH en respuesta al estímulo homotípico en dos cepas de ratas (McDougall et al, 2005).

A pesar de la inhibición generalizada de la activación de áreas telencefálicas y diencefálicas, los procesos neurobiológicos subyacentes a la tolerancia a la re-exposición a estímulos emocionales son poco conocidos y se restringen al eje HPA. Algunos autores se han centrado en el estudio del papel de los glucocorticoides en dicha tolerancia debido a su implicación en los procesos de aprendizaje (De Quervain et al, 2009; Bentz et al, 2010) y en la retroinhibición del eje HPA. A este respecto, no parece que la liberación de glucocorticoides sea un requisito imprescindible para la inducción de la tolerancia ya que ésta se observa tanto en animales ADX como ADX+B tras la exposición repetida a IMO o a *restraint* (Dal-Zotto et al, 2002; Jaferi y Bhatnagar, 2006). Aunque después de una sola exposición aguda a la IMO no se ha observado reducción de la respuesta de la ACTH al mismo estímulo en animales ADX+B, a diferencia de lo observado en animales intactos (Dal-Zotto et al, 2002; 2003), otras manipulaciones, como la administración de metirapona (inhibidor de la síntesis de glucocorticoides) o de un antagonista de los GR antes de la primera IMO solo bloquean parcialmente la reducción de la respuesta periférica del eje HPA a una segunda exposición 7 días más tarde (Dal-Zotto et al, 2003). Estos resultados indican que el incremento en los niveles de glucocorticoides en la primera exposición al estrés no son determinantes para inducir el proceso de tolerancia y quizás la ausencia de glucocorticoides en los animales ADX+B estaría en realidad impidiendo la expresión de la tolerancia durante la segunda exposición al estímulo. En este sentido, se ha descrito que la administración periférica de antagonistas de los receptores MR, y no de los receptores GR, bloquea la expresión de la tolerancia al *restraint* (Cole et al, 2000). Además, se ha observado que la inyección conjunta de antagonistas de GR+MR directamente en el pPVTh bloquea parcialmente la tolerancia si se administra crónicamente durante el estrés repetido, incluso evaluando la tolerancia en condiciones libres de fármaco (24 h después de la última administración), apuntando por tanto, a un papel de los glucocorticoides en este núcleo en la inducción más que en la expresión del proceso de tolerancia (Jaferi y Bhatnagar, 2006). Igualmente, lesiones del pPVTh atenúan ligeramente la reducción de la respuesta inducida por la dexametasona sólo en animales estresados crónicamente (Jaferi et al, 2003; Jaferi y Bhatnagar, 2006). Resumiendo, aunque los glucocorticoides parecen tener un papel parcial en el proceso de tolerancia por mediación de MR y GR, otros mecanismos no asociados a la liberación diaria de glucocorticoides parecen ser importantes para que se produzca la tolerancia del eje HPA.

Recientemente se ha sugerido un papel de la vasopresina del SNC en la inducción de la tolerancia del eje HPA (Gray et al, 2012), al mostrar que el bloqueo durante la exposición al estrés de los receptores V1a del SNC da lugar a un empeoramiento de la tolerancia del

eje HPA a la exposición repetida a *restraint*, sin afectar a la respuesta a la primera exposición. No obstante, el lugar preciso donde la vasopresina ejercería esta acción aún está por determinar. Por último, también se ha propuesto que los endocannabinoides podrían tener un papel en la reducción de la respuesta del eje HPA en situaciones de estrés crónico, ya que la administración periférica de un antagonista de los receptores CB1 justo antes de la última exposición al estrés fue capaz de bloquear la tolerancia de la corticosterona tras 8 días de *restraint* (Hill et al, 2010). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos obtenido evidencias negativas a este respecto, tanto en ratas como en ratones (Rabasa et al, 2015b).

En resumen, podemos concluir que existen diferencias mínimas entre los efectos de una sola exposición y los de la exposición repetida a un mismo estímulo estresante en la respuesta al estímulo homotípico, por lo que proponemos que el término tolerancia se ajusta mejor a estas observaciones que los términos utilizados hasta el momento (habitación, o desensibilización). El efecto de la re-exposición al estímulo homotípico sobre las respuestas de estrés dependerá en gran medida de la naturaleza del mismo, dado que la exposición repetida a algunos estímulos estresantes sistémicos puede dar lugar a sensibilización de la respuesta del eje HPA (y de otras variables). La exposición repetida a estímulos estresantes pura o predominantemente emocionales dará lugar a tolerancia, siendo más pronunciada cuanto mayor sea la intensidad del estímulo. Sin embargo, en lo que respecta a los estímulos estresantes mixtos, el efecto de la exposición repetida sobre las respuestas de estrés dependerá, en gran medida, del grado de interferencia que produzca la componente sistémica sobre los procesos adaptativos. Aunque los glucocorticoides parecen tener un papel parcial en el proceso de tolerancia, otros mecanismos estarían implicados. Es muy posible que múltiples áreas del SNC participen en el proceso de tolerancia al estrés crónico y muchas de ellas podrían actuar de forma redundante.

3.2 Exposición previa al estrés y sensibilización

Concepto de sensibilización

En un sentido amplio, el fenómeno por el cual la exposición previa a un estímulo induce un estado caracterizado por una mayor intensidad de respuesta frente al estímulo homotípico y frente a estímulos heterotípicos se conoce como sensibilización. Esta sensibilización puede afectar tanto a variables fisiológicas como a la conducta. A este respecto, la sensibilización conductual se considera como una forma primitiva de aprendizaje no asociativo caracterizado por un incremento progresivo de la respuesta a estímulos adversos o nocivos como consecuencia de la exposición repetida a los mismos (Rahn et al, 2013). En las últimas décadas ha habido un número creciente de estudios encaminados a la descripción de las características de los estímulos que originan los procesos de sensibilización y los mecanismos subyacentes implicados. Este interés es debido a que se postula que los procesos de sensibilización están en gran medida implicados en la aparición de un número considerable de alteraciones fisiológicas y psicopatologías, incluyendo desordenes gastrointestinales, dolor crónico, trastorno por estrés post-traumático (PTSD), psicosis o

adicción, entre otras (Overmier et al, 2006; Robinson y Berridge, 2008; Van Winkel et al, 2008; Rahn et al, 2013; Ursin et al, 2014).

El término sensibilización ha sido ampliamente utilizado en estudios relacionados con las consecuencias a largo plazo de la experiencia repetida con drogas, basándose en la observación de que la administración repetida pero intermitente de una amplia gama de drogas da lugar a un incremento progresivo de las respuestas motoras a las mismas, sobre todo después de un período de abstinencia (Steketee y Kalivas, 2011). Algunos autores consideran que este proceso de sensibilización progresiva constituye uno de los fundamentos de la adicción (Robinson y Berridge, 2008). Uno de los temas más relevantes cuando se estudia cualquier proceso de sensibilización es la especificidad del fenómeno, es decir, si se observa o no sensibilización en respuesta al mismo estímulo/droga o entre diferentes estímulos/drogas. En el campo de la adicción a drogas, hay evidencia de sensibilización cruzada entre diferentes drogas, y también entre drogas y estrés (Kalivas y Stewart, 1991). Esta sensibilización cruzada no es de extrañar, teniendo en cuenta que los mecanismos implicados dependen de circuitos compartidos por ambos tipos de estímulos (v.g. el sistema dopaminérgico en la interacción entre estrés y drogas) (Saal et al., 2003).

En el campo del estrés y del eje HPA, la sensibilización también ha sido un tema relevante desde el trabajo pionero de Dallman y Jones (1973). Mostraron que la respuesta de corticosterona a un estrés de intensidad suave, como la inyección intraperitoneal, no se veía afectada por la exposición varias horas antes al *restraint*, mientras que la administración previa de dosis de ACTH o corticosterona que simulaban la respuesta de corticosterona al *restraint* sí inhibían la respuesta adrenocortical al estrés de la inyección. En base a estos datos, concluyeron que el estrés induciría una facilitación a corto plazo (horas) de la respuesta del eje HPA que compensaría la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides. Una predicción derivada de esta hipótesis es que dado que la retroinhibición de los glucocorticoides contrarrestaría el proceso de facilitación, el bloqueo de la liberación de glucocorticoides durante la primera exposición al estrés debería dar lugar a una mayor respuesta al segundo estrés (sensibilización), al no quedar la facilitación contrarrestada por la retro-inhibición. Esta idea ha sido corroborada en ratas mediante el bloqueo farmacológico de la síntesis de glucocorticoides antes de la exposición a una inmovilización en un bolsa cónica de plástico (Wong et al, 2000). Tras comprobar que la exposición a este tipo de inmovilización (que no es de elevada intensidad) no afectaba, al día siguiente, a la respuesta de ACTH y corticosterona a una inyección intraperitoneal, mostraron que la inhibición de la respuesta de corticosterona a la inmovilización mediante aminoglutetimida (inhibidor de la conversión de colesterol a pregnenolona, primer paso de la síntesis de glucocorticoides) sí daba lugar a una sensibilización de la respuesta de las hormonas del eje HPA al estrés de la inyección.

El concepto de facilitación ha sido utilizado fundamentalmente para explicar los cambios en la respuesta del eje HPA frente a estímulos heterotípicos, pero podría también aplicarse a estímulos homotípicos. Así, en nuestro laboratorio hemos demostrado que, si bien la exposición en un mismo día de ratas intactas a cuatro sesiones breves (1 min) de IMO no

altera la respuesta de la ACTH a dicho estímulo, sí se observa una facilitación de esta respuesta en ratas ADX suplementadas con unos niveles bajos de corticosterona en el agua de bebida (ADX + B), procedimiento que permite simular los niveles basales de corticosterona en plasma pero obviamente impide la respuesta de corticosterona al estrés (Andrés et al, 1999). Por el contrario, tras exposiciones más prolongadas a la IMO (1 hora) no se observa facilitación en los animales ADX+B 2 h más tarde (Martí et al., 1999). El balance entre la facilitación inducida por el estrés y la retroinhibición ejercida por los glucocorticoides podría explicar por qué se han encontrado resultados controvertidos en animales intactos utilizando diferentes combinaciones de estímulos estresantes (Graessler et al., 1989; Le Mevel et al., 1979) y muy en particular, en aquellas condiciones en las que aún existen niveles elevados de corticosterona justo antes del segundo estímulo (Graessler et al., 1989; Martí et al, 1999).

Mientras que el uso del término facilitación se emplea frecuentemente en relación a los efectos del estrés previo sobre la reactividad del eje HPA, el concepto de sensibilización se ha utilizado más ampliamente para hacer referencia a otros sistemas fisiológicos y a la conducta. Dado que es difícil saber si sensibilización y facilitación son o no términos similares, en la presente tesis utilizaremos el término más general de sensibilización. Además, diferenciaremos entre sensibilización y sensibilización cruzada para referirnos al incremento de las respuestas de estrés frente al estímulo homotípico o frente a estímulos heterotípicos, respectivamente.

Estrés crónico y sensibilización

En general, para estudiar la sensibilización heterotípica, la exposición al nuevo estímulo se ha llevado a cabo al día siguiente o muy poco después de la historia de estrés crónico. Los resultados indican que una historia previa de estrés crónico puede inducir sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo estresante, aunque también existen resultados controvertidos (Dallman, 1993; Martí y Armario, 1998). Pese a que las razones de estas discrepancias no están del todo claras, cuando tenemos en cuenta algunas de las consideraciones ya comentadas previamente (v.g. naturaleza de los estímulos estresantes o capacidad máxima de respuesta, intensidad de los estímulos y saturación de las hormonas del eje HPA, entre otras) aparecen algunos patrones generales.

Uno de los factores de especial relevancia es la naturaleza (sistémica vs emocional) del estímulo crónico. Así, cuando se han valorado los niveles plasmáticos de ACTH en lugar de los de corticosterona, se ha observado que la exposición crónica continuada o intermitente al frío suele inducir una sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a diferentes estímulos, como a la inyección de salino, al *restraint* o al éter (Sakellaris y Vernikos-Danellis, 1975; Hauger y Aguilera, 1992; Bhatnagar y Meaney, 1995; Bhatnagar y Dallman, 1998; Pardon et al, 2003; Ma & Morilak, 2005), aunque hay algunas excepciones (Bhatnagar et al, 1995; Akana et al, 1996). Análogamente, la administración crónica de solución salina hipertónica también da lugar a sensibilización cruzada del eje HPA en respuesta a éter (Kiss & Aguilera, 1993). Por lo tanto, la exposición crónica a estímulos sistémicos parece inducir sensibilización cruzada del eje HPA.

En cambio, el efecto de la exposición repetida a estímulos de naturaleza predominantemente emocional (como el ruido, el olor al depredador, el *restraint* o la IMO) sobre la respuesta del eje HPA a un estímulo heterotípico no es tan consistente. De hecho, se ha descrito tanto una sensibilización cruzada (v.g. Hauger et al, 1990; Lachuer et al, 1994; Ma et al, 1999; Bhatnagar y Vining, 2003; Heydendael et al, 2011; Daviu et al, 2014b), como una respuesta normal (v.g. Armario et al, 1986; 1988a; Spiga et al, 2009; Weinberg et al, 2009; Babb et al, 2014; Ferland et al, 2014), e incluso una reducción de la respuesta (v.g. Martí et al, 1994a; Mansi y Drolet, 1997; Chen et al, 2008). Curiosamente, algunos trabajos en los que se han utilizado ratas ADX o ratas ADX con implantes (pellets) de corticosterona que permiten simular los niveles basales de corticosterona en plasma (ADX+B) han descrito que la exposición previa de estos animales a estrés crónico daba lugar a una sensibilización cruzada de la respuesta plasmática de ACTH que no se observaba en ratas intactas (Martí et al, 1994a; Akana et al, 1996). Esto sugiere que, al menos por lo que se refiere a los estímulos estresantes predominantemente emocionales, el efecto del estrés crónico sobre la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo podría depender de dos procesos opuestos: la sensibilización inducida por la historia de estrés previa y la inhibición de la respuesta debida a los mecanismos de retroinhibición de los glucocorticoides.

Otros aspectos que podrían tener especial relevancia a la hora de observar sensibilización cruzada inducida por la exposición crónica a estímulos estresantes emocionales son características como la intensidad o duración de los mismos. Como veremos posteriormente, la sensibilización del eje HPA tras la exposición aguda al estrés se ha observado siempre tras una exposición corta a estímulos estresantes heterotípicos de baja intensidad, como exposición a ambientes nuevos o a bajas dosis de endotoxina. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos observado que la exposición crónica a la IMO da lugar a una sensibilización cruzada del eje HPA en respuesta a 5 min de exposición al laberinto elevado en cruz (EPM; Daviu et al, 2014b), mientras que produce una disminución de la respuesta a 30 min de choques eléctricos en la cola (Martí et al, 1994).

En conclusión, la sensibilización cruzada del eje HPA parece ser más probable tras la exposición crónica a ciertos estímulos estresantes sistémicos y, posiblemente también, a estímulos emocionales de elevada intensidad. Además, parece que la sensibilización inducida por estrés crónico se hace más evidente con la exposición posterior a estímulos heterotípicos de corta duración y baja intensidad. No obstante, no existen hasta la fecha estudios que hayan comprobado sistemáticamente estas ideas. Por otra parte, no se puede excluir que otros factores, como las diferencias individuales o las diferencias entre cepas, puedan explicar el por qué se puede observar o no sensibilización del eje HPA bajo condiciones aparentemente similares.

La sensibilización cruzada inducida por la exposición previa a estrés crónico también afecta al eje SMA. Así, se ha demostrado consistentemente que la exposición crónica a estímulos estresantes predominantemente emocionales como la IMO, el *restraint* o los choques eléctricos en las patas, induce sensibilización cruzada de las respuestas plasmáticas de adrenalina y noradrenalina (Kvetnansky et al, 1984; Konarska et al, 1989b). De

igual manera, también se ha observado que la exposición crónica a estímulos sistémicos como la administración de lipopolisacárido (endotoxina; un estímulo estresante inmune) o la exposición crónica a frío son capaces de incrementar las respuestas de estas hormonas a la exposición aguda a la IMO (Moncek et al, 2003; Kvetnansky, 2004) o al *restraint* (Konarska et al, 1989b). En referencia a otros parámetros, se ha descrito una sensibilización cruzada de la liberación de prolactina utilizando el cambio diario de jaula o la manipulación como estímulos estresantes crónicos, para valorar posteriormente, la respuesta al estímulo opuesto (Dobrakova y Jurcovicova, 1984). Por el contrario, estudios en los que se han utilizado estímulos crónicos más prolongados o más severos (v.g. IMO, choque eléctricos, *restraint* o ruido) han observado una respuesta normal o reducida de la prolactina al estímulo heterotípico (Kant et al, 1985; Armario et al, 1986; 1988b; van Raaij et al, 1997). Puesto que los glucocorticoides ejercen un efecto inhibitor sobre la liberación de prolactina inducida por el estrés (Martí y Armario, 1998), es posible que la liberación diaria de niveles moderados o elevados de glucocorticoides impida la expresión de cualquier tipo de sensibilización inducida por estrés.

Aunque, como hemos visto, la exposición previa a estrés crónico da lugar a una sensibilización cruzada de las respuestas de los ejes HPA y SMA, también se ha observado un papel protector sobre otras respuestas. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos comprobado que la exposición previa a un protocolo de estrés crónico variable (chronic unpredictable stress, CUS; consistente en la exposición diaria a alguno de tres estímulos como el *restraint*, los choques eléctricos en las patas o la natación forzada, con una duración del estímulo y momento de exposición durante el día variables a lo largo del procedimiento) protege totalmente del descenso de peso y parcialmente del descenso en la ingesta producidos por la exposición aguda a un nuevo estímulo estresante, representado por la IMO (Pastor-Ciurana et al, 2014). Es por consiguiente importante considerar que diferentes tipos de variables pueden responder diferente tras una historia de estrés crónico, afectando la protección cruzada o la sensibilización solo a variables particulares.

Áreas del SNC y mecanismos implicados

Como hemos comentado previamente, la exposición crónica al estrés induce cambios a largo plazo en áreas de procesamiento del estrés en el SNC, incluyendo el PVN, aunque los cambios observados pueden mostrar en ocasiones una disociación respecto a los cambios en los niveles ACTH y corticosterona. A pesar de la aparición de tolerancia homotípica, la exposición crónica a estímulos de naturaleza predominantemente emocional induce sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA.

Una de las áreas del SNC propuestas para mediar la sensibilización frente a un estímulo estresante heterotípico es el LC. No obstante, su papel depende de la naturaleza del estímulo estresante crónico al que se ha expuesto al animal previamente. Por ejemplo, mientras que la exposición crónica continuada al frío parece inducir un pequeño incremento o no tener efecto sobre la actividad espontánea de las neuronas del LC el día siguiente de la última exposición (Mana & Grace, 1997; Jedema et al, 2001), se observa un incremento de la respuesta de estas neuronas a un estímulo estresante físico sobreimpuesto (Mana &

Grace, 1997). Estos efectos estarían asociados a una respuesta estimuladora potenciada a el CRH (Jedema et al., 2001) y a una reducción de la sensibilidad a la retroinhibición mediada por los receptores $\alpha 2$ (Jedema et al., 2008). La exposición repetida a derrota social, estímulo emocional, reduce la actividad de las neuronas del LC en condiciones basales, probablemente gracias a una acción moduladora de los opioides endógenos sobre estas neuronas (Chaijale et al, 2013), pero desafortunadamente se desconoce su efecto sobre la respuesta a un nuevo estímulo estresante.

Diferentes neurotransmisores podrían participar en el proceso de sensibilización cruzada. Por ejemplo, se ha observado que la exposición crónica a *restraint* induce una sensibilización cruzada de las respuestas de la serotonina y la noradrenalina a una exposición aguda a la IMO (Adell et al, 1988). Igualmente, la exposición a estrés crónico da lugar a un incremento de la liberación de dopamina en la mPFC y en el núcleo accumbens en respuesta a un nuevo estímulo estresante (Cuadra et al, 2001; Di Chiara et al, 1999). Mediante microdiálisis, Nisenbaum et al (1991) demostraron que la exposición crónica continuada al frío (4° C) incrementaba la síntesis y liberación de noradrenalina en el hipocampo en respuesta a choques en la cola. Utilizando el mismo estímulo crónico, Gresch et al (1994) también observaron un incremento de las respuestas de dopamina y noradrenalina en la mPFC al choque en la cola. Sin embargo, en este estudio la respuesta de dopamina en el núcleo accumbens y en el estriado no se vio afectada, indicando que el fenómeno de sensibilización cruzada de la dopamina es específico de áreas particulares. Otros estudios en los que se ha utilizado la exposición al frío han mostrado resultados contradictorios. Así, el mismo laboratorio, no observó inducción de la liberación de noradrenalina en el mPFC en respuesta al choque en la cola cuando la exposición crónica al frío no fue continuada sino intermitente o cuando el estímulo crónico fue la exposición intermitente al choque eléctrico (Jedema et al, 1999). Asimismo, la exposición crónica al frío intermitente indujo una sensibilización cruzada de la respuesta de noradrenalina a la IMO en el BNST en ratas de la cepa Wistar-Kyoto pero no de la cepa Sprague-Dawley (Pardon et al, 2003), lo que sugiere que hay animales especialmente susceptible a la sensibilización.

Estos últimos datos sugieren una contribución importante de la elevada componente sistémica que tiene la exposición al frío, indicando que la exposición crónica al estrés tiene un impacto diferencial sobre los organismos en función de las características específicas del tratamiento crónico (v.g. número de exposiciones, tiempo de exposición, intervalo de tiempo entre sesiones) y la capacidad de tolerancia a este estímulo por parte de los individuos expuestos.

Estrés agudo y sensibilización

En las últimas décadas, ha habido un creciente interés por los fenómenos de sensibilización a largo plazo de las respuestas fisiológicas y conductuales inducidas por una única exposición a estímulos estresantes. Este interés apareció a raíz de varias publicaciones a finales de los años 80 y principios de los 90 en los que se mostraba que una única exposición breve a estrés podía provocar cambios a muy largo plazo sobre la respuesta a determinadas drogas (Antelman et al, 1988; 1989; 1991), o que la exposición a un paradigma

de derrota social podía inducir a largo plazo conductas interpretables como ansiosas o depresivas (Koolhaas et al, 1990). El hecho de que una sola exposición a un estímulo estresante pudiera dar lugar a un gran número de efectos a largo plazo promovió un incremento considerable de su estudio, con especial interés en la búsqueda de modelos animales de psicopatologías humanas, como el trastorno de estrés postraumático (PTSD) u otros trastornos de ansiedad, con la finalidad última de identificar los procesos biológicos subyacentes (Armario et al, 2008). Por lo que respecta a los modelos animales de PTSD, los procesos de sensibilización parecen constituir un fenómeno esencial para explicar la respuesta exacerbada tanto a los estímulos asociados con el trauma como a otros tipos de estímulos estresantes típicos de estos pacientes.

Es importante comentar que, de igual manera que sucede con los efectos a largo plazo del estrés crónico (Martí y Armario, 1998), existen importantes discrepancias respecto a los efectos a largo plazo de la exposición aguda al estrés sobre las respuestas fisiológicas y conductuales frente a otras situaciones de estrés, como producir a largo plazo un incremento, e incluso un descenso, de las mismas (Armario et al, 2008; Belda et al; 2008; Grisom y Bhatnagar, 2009). Aunque algunas de estas discrepancias se explican por la naturaleza y la intensidad de los estímulos estresantes, las causas de algunos datos contradictorios no se conocen.

Efectos a largo plazo de una sola exposición a un estímulo estresante sobre la respuesta biológica a nuevas situaciones de estrés

Caggiula et al. (1989) y van Dijken et al. (1993) fueron los primeros en demostrar que una sola exposición a un estímulo estresante predominantemente emocional, como los choques eléctricos en las patas, era capaz de inducir a largo plazo (10-14 días) un incremento de las respuestas plasmáticas de ACTH o corticosterona tanto a otra sesión breve de choques eléctricos (estímulo homotípico) como a un estímulo heterotípico (un ambiente nuevo). Paralelamente, aparecieron varios trabajos en los que observaban que una única exposición a diferentes estímulos sistémicos también era capaz de incrementar la respuesta a largo plazo del eje HPA al estrés. Por ejemplo, el laboratorio de Tilders constató que una única administración de citoquinas (IL-1 β) era capaz de inducir sensibilización a largo plazo de la respuesta del eje HPA a un considerable número de estímulos estresantes, que incluían la re-administración de IL-1 β (Schmidt et al, 1995), la administración de anfetaminas (Schmidt et al, 1999; 2001), y la exposición a ambientes nuevos o choques en las patas (Schmidt et al, 1995; 2001; 2003). Cuando se estudió la evolución temporal de esta sensibilización cruzada en respuesta a un ambiente nuevo, se observó que el máximo de respuesta del eje HPA se alcanzaba entre los 11-22 días después de la administración de IL-1 β , desvaneciéndose pasados 42 días (Schmidt et al, 2003).

Posteriormente, el laboratorio de Anisman estudió los efectos a largo plazo (entre 24 h y 28 días) de una única administración de estímulos inmunitarios como endotoxinas o la citoquina TNF- α (factor de necrosis tumoral α). Estudiaron no solo la respuesta del eje HPA sino también la neuroquímica (Anisman et al, 2003; Hayley et al, 2003). Respecto a

la sensibilización del eje HPA, el curso temporal de los efectos parecía mostrar un nivel relativamente alto de complejidad, dependiendo tanto de las características específicas de los estímulos inmunes iniciales como de la naturaleza de los estímulos sistémicos sobrepuestos. No obstante, se encontraron evidencias de sensibilización a largo plazo en respuesta tanto a los estímulos homotípicos como a heterotípicos que, en algunos casos, se incrementaba conforme mayor era el tiempo transcurrido entre exposiciones.

Tomados en conjunto, los datos apuntan a que una única exposición a algunos estímulos estresantes sistémicos puede inducir una sensibilización a largo plazo de la respuesta del eje HPA tanto a estímulos homotípicos como a heterotípicos. En contraposición, y tal como veremos posteriormente, una única exposición a estímulos estresantes emocionales es capaz, bajo ciertas circunstancias, de inducir sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA en respuesta a estímulos heterotípicos, mientras que suele inducir una disminución de la respuesta frente al estímulo homotípico (Armario et al, 2004). A este respecto, se hace necesario comentar los resultados obtenidos por Caggiula et al. (1989) en los que observaron que el choque eléctrico en las patas indujo una sensibilización a largo plazo del eje HPA en respuesta al estímulo homotípico. Estos autores utilizaron choques eléctricos de alta intensidad que, como argumentamos previamente en relación a los procesos de tolerancia, podrían activar vías nociceptivas o generar daño tisular, convirtiéndose en un estímulo estresante con una importante componente sistémica.

Centrándonos en los estímulos predominantemente emocionales, los datos obtenidos hasta el momento indican que éstos son capaces de inducir una sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA en respuesta a estímulos estresantes heterotípicos. Posteriormente a los resultados obtenidos por van Dijken et al (1993), nuestro laboratorio demostró por primera vez en la literatura que una sola exposición a un estímulo predominantemente emocional intenso como la IMO era capaz de inducir a largo plazo un descenso de la respuesta del eje HPA al estímulo homotípico, pero también una mayor respuesta a uno heterotípico (natación forzada) (Martí et al, 2001). Más tarde, el laboratorio de Maier describió, que una única sesión de choques eléctricos inescapables en la cola (típico del paradigma de indefensión aprendida), causaba sensibilización cruzada del eje HPA tanto frente a un estímulo estresante emocional (pedestal elevado) como sistémico (endotoxina, 10 µg/kg) (Johnson et al, 2002a; 2003; O'Connor et al, 2004). Aunque el efecto sobre la exposición al pedestal solo se estudió transcurridas 24 h (Johnson et al, 2002a; O'Connor et al, 2004), la sensibilización cruzada a la endotoxina se observó no solo en el día posterior al choque eléctrico sino al menos 10 días después, no observándose ya efecto pasados 21 días (Johnson et al, 2002a). Tener control sobre la experiencia aversiva (comparando los efectos sobre los animales que podían evitar los choques en la cola con los de aquellos que no) no modifica la sensibilización cruzada a largo plazo de la respuesta de la corticosterona a otro estímulo estresante emocional como el *restraint* (Weinberg et al, 2010a). Además, el grupo de Maier mostró que, la experiencia previa con una única sesión de choques eléctricos en la cola no solo inducía sensibilización cruzada a largo plazo de la respuesta del eje HPA sino también de la respuesta inmune a la administración de endotoxina, y más interesante aún, que ésta sensibilización de la respuesta inmunitaria podría

ser mediada por la liberación de glucocorticoides producida durante la exposición previa al choque eléctrico (Johnson et al, 2002b; 2003; Frank et al, 2010; 2012).

En nuestro laboratorio hemos comprobado que, además de la natación forzada (Martí et al, 2001), una única exposición a la IMO es capaz de inducir consistentemente sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a ambientes nuevos como la tabla de agujeros (Hole board; HB) o el EPM (Gagliano et al, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2008), sensibilización que puede mantenerse durante aproximadamente una semana. La exposición a un estímulo de menor intensidad que la IMO, como la exposición a olor a gato, no induce sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA al EPM transcurrida una semana desde el primer estímulo (Muñoz-Abellán et al, 2008). Este dato sugiere que, de forma similar a lo que sucede con la exposición crónica al estrés, la inducción de la sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA podría depender en gran medida de la intensidad y duración del estímulo estresante. De hecho, los estímulos que han mostrado inducir sensibilización a largo plazo (IMO y choques eléctricos en la cola) se caracterizan por ser de elevada intensidad. Alternativamente, pero no incompatible con lo anterior, algunas cualidades específicas del estímulo estresante, independientes de la intensidad o duración, también podrían ser relevantes a la hora de poder observar sensibilización cruzada. Una observación detallada de la bibliografía sugiere que la duración y la intensidad del estímulo estresante heterotípico también podrían ser variables críticas a la hora de que se produzca esta sensibilización, pero hasta el momento ningún estudio ha comprobado sistemáticamente la veracidad de esta hipótesis.

Aparte de estos interrogantes, tampoco se conocen en la actualidad cuáles son los mecanismos subyacentes a la sensibilización a largo plazo del eje HPA inducida por el estrés agudo. El laboratorio de Maier, utilizando su modelo de choques eléctricos en la cola, observó que la sensibilización del eje HPA estaba asociada a una reducción de la eficacia de los mecanismos de retroinhibición de los glucocorticoides (O'Connor et al, 2003). Posteriormente, utilizando el mismo paradigma de estrés, demostraron (O'Connor et al, 2004) que la sensibilización cruzada de las respuestas plasmáticas de ACTH y corticosterona a un nuevo estímulo estresante (al día siguiente) iba acompañada de una mayor activación de la adenohipófisis (incremento de la expresión de c-fos y del gen de la POMC) y del PVN (incremento de la expresión de c-fos y del mRNA de el CRH). Estos datos claramente sugieren que la sensibilización tiene lugar a nivel del SNC más que a nivel periférico. En este mismo estudio, observaron que la sensibilización cruzada también aparecía en animales ADX, lo que indicaba que los glucocorticoides no eran necesarios para inducir o expresar la sensibilización cruzada del eje HPA.

Desafortunadamente, no existen apenas estudios de posible sensibilización a largo plazo de la respuesta de otros sistemas neuroendocrinos diferentes al eje HPA. Sí que se ha observado consistentemente que la exposición durante dos días consecutivos a un estímulo estresante que compromete la homeostasis del animal, como la hemorragia, origina una sensibilización de la respuesta tanto del eje HPA como de la adrenalina (Lilly et al, 1982; 1983; 1986). Por lo que respecta al efecto a largo plazo de una sola exposición a estímulos

estresantes emocionales, nuestro laboratorio ha analizado el efecto de la exposición previa a la IMO sobre la respuesta plasmática de prolactina a un campo abierto (Open field; OF) sin obtener datos concluyentes (datos no publicados). En estos experimentos, a pesar de que la sensibilización cruzada del eje HPA era evidente, la respuesta de prolactina estaba sensiblemente incrementada en algún caso mientras que en otros no se veía modificada. Podemos afirmar que, a diferencia del eje HPA, una única exposición a estímulos estresantes intensos no induce de manera consistente sensibilización cruzada a largo plazo de la respuesta de prolactina. Esta inconsistencia es similar a la observada en esta hormona tras la exposición crónica a estrés.

Efectos sobre la conducta

Como ya ha sido comentado, numerosos estudios han observado un menor impacto del estímulo estresante homotípico sobre la conducta en animales con una historia previa de estrés crónico durante la etapa adulta. En algunos casos, esta historia previa de estrés crónico parece conferir también una protección frente a algunos de los efectos negativos de nuevas situaciones de estrés (protección o tolerancia cruzada), en tanto otros efectos no quedan protegidos.

En la mayoría de los estudios acerca de los efectos conductuales de una sola exposición al estrés se ha analizado la conducta en condiciones presumiblemente basales. Sin embargo, es éste un aspecto discutible, dado que no es descabellado considerar que la propia prueba conductual, que requiere de la exposición a ambientes nuevos, pueda constituir una nueva situación estresante. El problema es que es prácticamente imposible distinguir si la exposición previa al estrés ha alterado los rasgos conductuales relativamente estables del animal o ha alterado más específicamente su susceptibilidad al estrés. Por esta razón nos centraremos fundamentalmente en aquellos estudios en los que se ha sobreimpuesto una nueva situación de estrés antes de evaluar la conducta. Los más relevantes han estudiado como la exposición previa a una sola sesión de choques eléctricos (en la cola o en las patas) o al modelo del *single prolonged stress* (SPS) modifica el impacto de nuevas situaciones de estrés, fundamentalmente, el establecimiento de miedo condicionado (utilizando el choque en las patas como estímulo aversivo). Antes de comentar los resultados concretos, explicaremos brevemente el condicionamiento del miedo y sus implicaciones.

El miedo condicionado es un tipo de aprendizaje que permite asociar determinados ambientes (contexto) o estímulos específicos presentes en el ambiente (claves explícitas; v.g. un tono, una luz o un olor) con la aparición de un estímulo nocivo para el organismo. Los animales expuestos a choques eléctricos desarrollan rápidamente miedo condicionado a señales específicas (luz, sonido), pero también al contexto donde reciben los choques (v.g. Fendt y Fanselow, 1999; LeDoux, 2003; Maren, 2008). La asociación de otros estímulos aversivos como la natación forzada o el *restraint* a una clave olfativa origina un condicionamiento aversivo a dicho olor cuando éste es presentado en otros contextos (Land et al, 2008; Murua y Molina, 1990). El olor al depredador también induce por sí mismo un condicionamiento al contexto dónde se ha presentado (Dielenberg et al, 2001). Existe siempre una cierta generalización del miedo a señales que guardan cierta similitud con la

señal específica original o a claves contextuales que guardan cierta relación con el contexto original donde se estableció el condicionamiento. El miedo al contexto es dependiente de la función hipocampal y el grado de generalización, que es un concepto opuesto a la capacidad de discriminación contextual (Frankland et al, 1998), se incrementa con la intensidad del estímulo inductor del condicionamiento (Fanselow, 1981; Laxmi et al, 2003; Baldi et al, 2004), el grado de parentesco entre contextos (Gonzalez et al, 2003) y el tiempo transcurrido entre la inducción del condicionamiento y la exposición al nuevo contexto (Houston et al, 1999; Wiltgen y Silva, 2007).

Al principio de los 90, varios estudios demostraron que una consecuencia típica de la exposición previa de ratas a choques eléctricos en las patas era una reducción a largo plazo (de días a semanas) de la actividad/exploración (que denominamos en este trabajo hipo-actividad) en ambientes nuevos (v.g. van Dijken et al, 1992a; 1992b; 1992c; van den Berg et al, 1998; Bruijnzeel et al, 2001a; 2001b). Más recientemente, se ha observado que incluso un único choque es capaz de inducir hipo-actividad muy a largo plazo (28 días) en ratones (Siegmund y Wotjak, 2007). Aunque inicialmente se interpretó la hipo-actividad en ambientes nuevos como un incremento incondicionado de la ansiedad inducido por la exposición previa al choque eléctrico (v.g. van Dijken et al, 1992a; 1992b; Bruijnzeel et al, 2001a; 2001b), las evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis son escasas (Bruijnzeel et al, 2001a; Pijlman y van Ree, 2002; Pijlman et al, 2003). Por ejemplo, ratones previamente expuestos a choques eléctricos en las patas muestran hipo-actividad en el EPM, pero de forma paradójica, el tiempo de permanencia en los brazos se incrementa (Radulovic et al, 1998), aportando pruebas en contra de la interpretación de los efectos a largo plazo de los choques eléctricos en términos de ansiedad incrementada. Por otro lado, también se ha observado que una sola exposición a sesiones cortas de choques eléctricos en las patas es capaz de inducir un incremento de las conductas activas de escape en la prueba de natación forzada (Dijken et al, 1992a), favoreciendo aparentemente las estrategias de afrontamiento activas. Por otra parte, los animales expuestos a choque eléctrico en las patas o en la cola también muestran un incremento de las conductas pasivas (*freezing*) frente a estímulos estresantes sobreimpuestos, como la interrupción repentina de un ruido de fondo o la aparición repentina de un ruido (Van Dijken et al, 1992a; 1992b; 1992c; 1993; Siegmund y Wotjak, 2007) y un incremento de la respuesta de sobresalto acústico (Servatius et al, 1995).

La hipo-actividad en ambientes nuevos inducida por la exposición previa a choques eléctricos en las patas parece ser un tipo muy especial de generalización que se observa aunque no exista ningún parecido entre el ambiente nuevo y la cámara de los choques y es dependiente del establecimiento de un aprendizaje del miedo al contexto y no de la mera exposición a los choques eléctricos (Radulovic et al, 1998; Daviu et al, 2010; Sauerhöfer, 2012), descartando por lo tanto una sensibilización no específica inducida por el choque eléctrico. Por esta razón hemos denominado a este fenómeno generalización cognitiva (Daviu et al, 2014a), para indicar que el animal probablemente aprende que cualquier ambiente nuevo desconocido es potencialmente peligrosos. Para distinguir si los cambios conductuales observados en las pruebas que implican exposición de los animales a ambientes

nuevos son debidos a un proceso de sensibilización al estrés representado por el ambiente nuevo (sensibilización) o bien el resultado de la generalización cognitiva, necesitamos manipulaciones experimentales (incluyendo las farmacológicas) que bloqueen el aprendizaje del condicionamiento.

La exposición directa a un gato o a su olor también han mostrado desencadenar una respuesta tanto de miedo al contexto como, en determinadas ocasiones, un incremento aparente de la ansiedad en el EPM (v.g. Adamec y Shallow, 1993; Adamec et al, 1997; 1998; Muñoz-Abellán et al, 2008), aunque estos efectos no suelen ir acompañados de una hipoactividad en otros ambientes nuevos (v.g. Adamec y Shallow, 1993; Adamec et al, 1997; 1998). En cambio, una única exposición a derrota social da lugar a largo plazo a hipoactividad tanto en ambientes nuevos como en la prueba de natación forzada (Koolhaas et al, 1990). Como último ejemplo, mencionar que animales expuestos a inmersión forzada bajo el agua durante 30-60 segundos también han mostrado tener un incremento de la ansiedad valorada en el EPM (Richter-Levin, 1998) y un aumento de la respuesta de sobresalto acústico (Cohen et al, 2004). Respecto a la IMO, nuestro laboratorio no ha encontrado efectos significativos sobre la conducta en el EPM cuando ésta se valoraba 2 semanas después de la IMO (Belda et al, 2004), o en otros ambientes nuevos, al cabo de 5 o 14 días (Belda et al, 2004; Gagliano et al, 2008). Estos datos resultan sorprendentes teniendo en cuenta que, en base a los diferentes marcadores biológicos de intensidad de estrés, la IMO es probablemente uno de los estímulos predominantemente emocionales más intensos (Márquez et al, 2002).

De la discusión precedente surge la cuestión de la posible relación entre los cambios conductuales observados a largo plazo tras una sola exposición a situaciones de estrés y la posibilidad de que se establezca algún tipo de condicionamiento al contexto. Es éste un tema que requiere una mayor elaboración teórica y sobre todo más resultados experimentales.

Cuando se ha estudiado de forma explícita si una exposición previa a choques eléctricos es capaz de sensibilizar la respuesta conductual a situaciones posteriores de estrés, los resultados son más consistentes, dado que la exposición a choques eléctricos inescapables (tanto en las patas como en la cola) incrementa a largo plazo el miedo condicionado inducido por el choque eléctrico en las patas, manteniéndose este efecto potenciador del condicionamiento durante bastantes días (Rau et al, 2005; Baratta et al, 2007). También la exposición al SPS, modelo desarrollado por Liberzon et al (1997) y consistente en la aplicación el mismo día de tres estímulos estresante de forma consecutiva (*restraint*, natación forzada y anestesia, usualmente por éter), parece inducir un estado de sensibilización a largo plazo, que se refleja no solo en incremento de la ansiedad (EPM, sobresalto acústico) sino también en una potenciación del condicionamiento del miedo al choque, aunque a veces el efecto se observa directamente sobre el condicionamiento y otras veces en un déficit de extinción (Imanaka et al, 2006; Takahashi et al, 2006; Kohda et al, 2007; Yamamoto et al, 2008; Harada et al, 2008; Takei et al, 2011; Knox et al, 2012a; 2012b). En algunos de los estudios parece observarse un proceso de incubación de la sensibilización,

no observándose efecto alguno sobre el condicionamiento del miedo cuando éste tiene lugar al día siguiente al choque en la cola o al SPS, pero sí cuando el condicionamiento se lleva a cabo una semana después del SPS (Servatius et al, 1995; Takahashi et al, 2006; Knox et al, 2012a). El fenómeno de la incubación es de gran interés, pero no siempre es observable.

Mecanismos implicados

Existen varias razones para considerar que el neuropéptido CRH podría tener un papel relevante en la inducción de la sensibilización cruzada a largo plazo, especialmente a través de los receptores CRHR1. En primer lugar, existen evidencias de que el CRH está involucrado en la inducción y/o la expresión de la sensibilización motora a la amfetamina inducida por estrés, y que este papel es ejercido a nivel central (Cole et al, 1990; Cador et al, 1993). En segundo lugar, se ha observado una potenciación de la reducción de la interacción social inducida por la abstinencia al etanol por la exposición previa a dos sesiones de *restraint* (separadas entre ellas por una semana de diferencia), un efecto que fue prevenido por la administración previa al *restraint* de un antagonista de los receptores CRHR1 (Breese et al, 2004). En tercer lugar, los receptores CRHR1 están involucrados en el desarrollo de hiperalgesia visceral relacionada con el estrés (Larauche et al, 2012). Finalmente, la administración repetida de urocortina en la BLA causa un incremento a largo plazo de las conductas ansiosas, probablemente a través de los receptores CRHR1 ya que no se han detectado receptores CRHR2 en esta área (Rainnie et al, 2004). A pesar de estas evidencias, hasta la fecha no tenemos constancia de que ningún trabajo haya abordado su papel en la sensibilización fisiológica y conductual a largo plazo inducida por una única exposición a estímulos estresantes emocionales.

Observaciones más recientes también implican a los sistemas noradrenérgicos y al LC en los efectos inducidos por una sola exposición a estrés. La exposición de ratones a un único choque eléctrico seguido de recordatorios de la situación mediante re-exposiciones cortas al contexto a lo largo de varios días (6 exposiciones de 1 min al cabo de 25 días) induce cambios a largo plazo sobre determinadas conductas ansiosas y sociales en un porcentaje de los animales (susceptibles) pero no en otros (resistentes) (Olson et al, 2011). Estos cambios conductuales se asociaron a un incremento de la actividad del LC valorado en términos de expresión de c-Fos y fueron prevenidos mediante el bloqueo farmacológico del sistema noradrenérgico justo antes de las pruebas de respuesta de sobresalto acústico e interacción social. En el mismo sentido, George et al (2013) observaron que la exposición al SPS induce una reducción a largo plazo de la actividad electrofisiológica espontánea del LC, pero en cambio incrementa la respuesta a estímulos nocivos. Pese a estos datos, aún se necesitan estudios adicionales con otros modelos animales para comprender mejor el impacto de una única exposición a estrés sobre el LC y sus consecuencias funcionales.

Gracias a los estudios realizados en el laboratorio de Maier sobre los procesos involucrados en los efectos a largo plazo del paradigma de indefensión aprendida, se ha podido relacionar al núcleo dorsal del rafe (DRN) y a la mPFC con el efecto diferencial de la exposición a choques eléctricos escapables e inescapables en la cola. Concretamente, se ha

observado que la exposición a choques eléctricos inescapables produce una mayor activación de las neuronas serotoninérgicas del DRN que la exposición a choques eléctricos escapables (Maswood et al, 1998). La inactivación farmacológica del DRN en el momento del estrés bloquea los efectos negativos sobre la conducta derivados de la exposición a los choques inescapables (Maier et al, 1994). El papel de la mPFC en estos efectos vendría dado por la capacidad de influir sobre el DRN (a través de vías directas o indirectas) cuando la situación estresante permite el control, consecuencia de la posibilidad de escapar de los choques (Amat et al, 2005; 2006). El control sobre el estrés permitiría que la mPFC (en concreto la parte ventral; IL) inhibiera la actividad del DRN, mediante su acción sobre interneuronas GABAérgicas, eliminando así el impacto negativo de los choques sobre la tarea de escape posterior en la *shuttle-box*. Esto se comprobado mediante la inactivación con muscimol de la IL antes de la ejecución de la tares de escape, observando que se revertía el efecto protector de la exposición previa a los choques escapables. Del mismo modo, la inactivación de la IL antes de la exposición al condicionamiento del miedo, también impedía el efecto protector de la exposición a choques escapables, obteniendo niveles similares de *freezing* en los animales expuestos a choques escapables con la IL inactivada que en los animales sometidos a choques inescapables.

Finalmente, algunos estudios con el SPS han puesto de manifiesto que los glucocorticoides podrían jugar un papel en la potenciación del condicionamiento del miedo, siendo esta potenciación bloqueada por la administración, previa al SPS, de un antagonista GR (Kohda et al, 2007). Por otro lado, el empeoramiento de la extinción causado por la exposición al SPS se amortigua por la administración durante varios días de d-cicloserina, un agonista parcial de la glicina en el lugar de unión de la misma al receptor de glutamato NMDA (Yamamoto et al, 2008), implicando al receptor NMDA en el déficit de extinción causado por el SPS.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- 1.** La exposición aguda a estímulos estresantes de elevada intensidad dará lugar a una alteración en la actividad basal del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y a una sensibilización de su respuesta a nuevas situaciones de estrés (sensibilización cruzada).
- 2.** Esta sensibilización endocrina iría acompañada de alteraciones en los niveles basales de ansiedad y en la ansiedad generada por nuevas situaciones de estrés. Sin embargo, la sensibilización endocrina y la conductual podrían seguir cursos temporales diferentes.
- 3.** Tanto los glucocorticoides (restringiendo) como el CRH (promoviendo) podrían estar implicados en los procesos de sensibilización causados por la exposición previa al estrés.
- 4.** La magnitud y duración de la sensibilización cruzada del eje HPA causada por un estrés agudo estaría positivamente relacionada con la intensidad del estímulo estresante inductor y la duración de la exposición al mismo.
- 5.** La sensibilización cruzada del eje HPA sería mucho más evidente cuando los animales sean expuestos de forma breve a los nuevos estímulos estresantes y cuando la intensidad de los mismos sea menor.

Objetivos

- 1.** Demostrar que una sola exposición a un estímulo estresante de elevada intensidad como la inmovilización en plancha (IMO) es capaz de incrementar la respuesta del eje HPA a nuevos estímulos estresantes (heterotípicos), días después de la exposición a la IMO.
- 2.** Demostrar que una exposición aguda a la IMO es capaz de inducir cambios en la conducta (actividad/exploración y ansiedad) que persisten días después de la exposición y que la sensibilización conductual a nuevas situaciones de estrés superpuestas persistiría más allá de la aparente normalización en condiciones menos estresantes.
- 3.** Demostrar que una activación farmacológica intensa del eje HPA no es capaz de inducir sensibilización cruzada del mismo, dado que ésta sensibilización estaría fundamentalmente asociada a la componente emocional de la situación estresante inductora.
- 4.** Establecer el papel de los glucocorticoides liberados durante la exposición a la IMO o la presumible activación de las neuronas CRHérgicas del SNC en la sensibilización cruzada del eje HPA y los cambios conductuales observados tras la IMO.
- 5.** Demostrar que la intensidad del estímulo estresante inductor y la duración de la exposición al mismo está positivamente relacionada con la magnitud de la sensibilización cruzada del eje HPA y la persistencia de tal sensibilización. Para ello se compararán los efectos de tres situaciones de estrés que difieren en intensidad (natación forzada, choques eléctricos en las patas e IMO) y los efectos de diferentes tiempos de exposición a la IMO.
- 6.** Demostrar que la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por la IMO es menos evidente cuanto más prolongada es la exposición al estímulo estresante heterotípico y cuanto mayor es su intensidad.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación y procedimientos generales

Se utilizaron ratas machos adultas (2-3 meses de edad en el momento de inicio de los experimentos) de la cepa Sprague-Dawley procedentes del Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Desde su llegada y hasta el final del procedimiento experimental, los animales se estabularon de a dos en cajas opacas de polipropileno de 1000 cm² de base (46,5 x 21,5 x 14,5 cm, Panlab SLU, España) con viruta absorbente (artículos 1 y 2, Lignocel 3/4, Harland Interfauna Ibérica, Barcelona, España; artículo 3, Ultrasorb, Panlab SLU, España). Se mantuvieron en condiciones estándares de luz (fotoperíodo de 12 h), temperatura (21+/-1 °C) y humedad (40-60%). Durante todas las fases experimentales los animales dispusieron de comida (SAFE-diet A04, Panlab SLU, España) y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos experimentales 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 (artículos 1 y 2, 86/609/EEC; artículo 3, 2010/63/EU) y de España (RD53/2013).

Todos los procedimientos experimentales se realizaron por la mañana excepto cuando específicamente se indica lo contrario. Tras su llegada y habituación a las instalaciones, todos los animales fueron habituados a la manipulación al menos en 2-3 sesiones de aproximadamente 2 min de duración en días diferentes antes de iniciar los experimentos. Los animales fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales; sin embargo, se tuvieron en cuenta el peso, la madre y el día de nacimiento. Todos los animales de cada experimento fueron tratados en el mismo día y los animales de la misma caja tenían el mismo tratamiento experimental. Cuando se tenía que administrar fármacos, los animales fueron pesados un día antes de cada experimento para determinar los volúmenes de inyección.

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) y en otros (v.g. Vahl et al, 2005) ya que 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. Consiste en envolver suavemente con un trapo a los animales y hacer 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 recolecta por capilaridad un volumen máximo de 300 µl en un tiempo no superior de 2 min. Se utilizaron capilares con EDTA (Sarsdet Microvette CB300, Granollers). Se extrajo sangre a los dos animales de cada caja al mismo tiempo con la ayuda de un tercer experimentador en una habitación diferente a la de estabulación. 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.

Administración de fármacos

Metirapona

(2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone; SIGMA-ALDRICH, ref. 856525). Inhibidor de la 11 β -hidroxilasa, enzima crítica para la síntesis de glucocorticoides. Las dosis utilizadas fueron de 40, 75 y 150 mg/kg. El volumen de inyección utilizado fue de 0.4 ml/kg y la vía de administración fue sc. Como vehículo se utilizó 1,2-propilenglicol al 40% en solución salina (NaCl, 0,9%).

Mifepristona

(RU486; RU38486; SIGMA-ALDRICH, ref. M8046). Antagonista de los receptores de glucocorticoides GR. La dosis utilizada fue de 50 mg/kg. El volumen de inyección utilizado fue de 0.4 ml/kg y la vía de administración fue sc. Como vehículo se utilizó 1,2-propilenglicol al 40% en solución salina (NaCl, 0,9%).

R121919

(NBI 30775; Janssen Pharmaceuticals, ref 2000001605). Antagonista de los receptores de CRH CRHR1. La dosis utilizada fue de 30 mg/kg. El volumen de inyección utilizado fue de 1,0 ml/kg y la vía de administración fue sc. Como vehículo se utilizó ácido tartárico 0,1 M en solución salina (NaCl, 0,9%).

Corticosterona

(FLUKA, ref 27840). La dosis utilizada fue de 5 mg/kg. El volumen de inyección utilizado fue de 0,4 ml/kg y la vía de administración fue sc. Como vehículo se utilizó aceite de sésamo absoluto.

Procedimientos de estrés

Inmovilización en tabla (IMO)

Se utilizaron dos procedimientos diferentes de IMO. Hasta el segundo experimento del segundo artículo la IMO consistió inmovilizar a las ratas en posición prona mediante la sujeción de sus cuatro extremidades a soportes metálicos fijados en una tabla. Los movimientos de la cabeza se restringieron mediante dos argollas metálicas alrededor de la nuca (Kvetnansky y Mikulaj, 1970; García y Armario, 2001). A partir del tercer experimento del segundo artículo el procedimiento de IMO fue sustituido reemplazando las argollas metálicas por dos piezas de plástico (7 x 6 cm) colocados en cada lado de la cabeza. Adicionalmente, el cuerpo se sujetó a la tabla mediante una pieza de tela plástica (10 cm de ancho) unido con Velcro que rodeaba todo el tronco del animal (Muñoz-Abellán et al, 2011; Rabasa et al, 2011b). Estas modificaciones se llevaron a cabo porque, con el segundo procedimiento, disminuye la posibilidad de que los animales sufran algún tipo de daño

sin cambiar sustancialmente la respuesta endocrina (Belda y Armario, datos no publicados).

Choques eléctricos en las patas

En los experimentos 4 y 5 del primer artículo se utilizaron unas cámaras de choque eléctrico hechas de plexiglás transparente (19,7 x 11,8 x 20 cm) y que contenían una base desmontable formada por 15 varillas de acero inoxidable de 0,4 cm de diámetro y espaciadas por 0,9 cm de distancia de centro a centro de varilla (Cibertec, Madrid). En el experimento 1 del tercer artículo se utilizaron cámaras de choques eléctricos de plexiglás transparentes (57 x 41 x 70 cm) con un suelo de rejilla de metal extraíble formado por 44 varillas de acero inoxidable de 0,4 cm de diámetro y espaciadas por 1,5 cm de distancia de centro a centro de varilla (Panlab SLU, Barcelona). El protocolo de descarga en las patas se detalla en los artículos correspondientes.

Natación forzada

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.

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

Adaptado de Pellow et al (1986) consiste en 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 0,7 cm de ancho x 0,3 cm de alto (brazos abiertos). Cada brazo está subdividido en tres secciones iguales. El EPM se colocó a 50 cm del suelo, con luz blanca artificial de 40 W de potencia colocada a 1,2 m de altura. Los dos animales de la misma caja se testaron simultáneamente y se limpió entre ensayo con etanol al 5%. La conducta se gravó con cámaras digitales (SCC-M383 CE, BW, Sony, España) en posición cenital. Aparte de sus cualidades como estímulo estresante de baja intensidad, el EPM es una de las pruebas conductuales más utilizadas para el estudio de la ansiedad incondicionada en roedores y una de las mejor caracterizadas. Las variables analizadas a ciegas fueron tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados, latencia en entrar por primera vez a un brazo abierto y número de entradas y ambulaciones en cada tipo de brazo (es decir, número de secciones cruzadas con las cuatro patas dentro de cada brazo).

Prueba de campo abierto rectangular (OF: "open field")

Consiste en una caja de plástico duro de color gris con unas dimensiones de 56 x 36,5 x 31 cm abierta por la parte superior e iluminadas con luz artificial mediante una bombilla de color blanco de 25 W de potencia colocada a 1,5 m de distancia. Los dos animales de

la misma caja se testaron simultáneamente y se limpió entre ensayo con etanol al 5%. Cuando se estudió la conducta, la prueba se gravó con cámaras digitales (SCC-M383 CE, BW, Sony, España) en posición cenital. Aparte de sus cualidades como estímulo estresante de baja intensidad, el OF nos permite valorar la actividad locomotora y exploratoria de los roedores. Mediante el uso de una plantilla, la base de la caja se dividió en 12 áreas iguales (correspondientes a 14 x 9 cm), 10 periféricas en contacto con las paredes y 2 centrales, para la evaluación a ciegas del número de ambulaciones periféricas y centrales, respectivamente. Se considera que el animal ha realizado una ambulación cuando ha atravesado un área con las cuatro patas.

Análisis bioquímicos (Radioinmunoanálisis, RIA)

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 Minnesota, 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. Como estándar se utilizó ACTH1-39 de rata (Sigma). Como marcador se utilizó 3-[125I] iodotirosil23-ACTH1-39 de Amersham (primer artículo) o de PerkinElmer (**segundo y tercer artículo**). Como anticuerpo contra ACTH de rata (rb7) se utilizó en el primer artículo el donado por el Dr. G.B. Makara y en el segundo y tercer artículo el 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 del 4-6 %. Todas las muestras que tenían que ser comparadas estadísticamente se procesaron en el mismo análisis para evitar la variación inter-ensayo. La sensibilidad del método fue de 30 pg/ml con el método utilizado en el primer artículo y de 12,5 pg/ml con el método de los **artículos 2 y 3**.

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 éster 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 5-8 %. Todas las

muestras que tenían que ser comparadas estadísticamente se procesaron en el mismo análisis para evitar la variación inter-ensayo. La sensibilidad del método fue de 1-2 ng/ml.

Análisis estadístico

Se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Science) versión 15, 18 y 19 para Windows. En los primeros experimentos (1 a 3 del primer artículo) se utilizó la prueba de la t de Student o un análisis paramétrico de la varianza (ANOVA), dependiendo del número de grupos a comparar. En caso de encontrar efecto significativo en la ANOVA, se realizó un análisis posterior de contraste simple respecto al grupo control. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney (dos colas) o la de Kruskal-Wallis, dependiendo del número de grupos a comparar. En el caso de encontrar efecto significativo en la prueba de Kruskal-Wallis, se utilizó la prueba de Mann-Whitney (dos colas) para comparar con el grupo control. El criterio de significación en todos los casos se estableció en $p < 0.05$.

En el resto de experimentos se utilizó el modelo lineal generalizado (GzLM, McCulloch y Searle, 2001) para analizar una única variable dependiente. 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. 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*.

Resultados

Artículo 1.

A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors

Xavier Belda, Silvia Fuentes, Roser Nadal and Antonio Armario

Hormones and Behavior 54 (2008) 654–661

Abstract

We have previously reported that a single exposure to immobilization (IMO) in rats causes a long-term desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) response to the same (homotypic) stressor. Since there are reports showing that a single exposure to other stressors causes sensitization of the HPA response to heterotypic stressors and increases anxiety-like behavior, we studied in the present work the long-term effects of IMO on behavioral and HPA response to mild superimposed stressors. In Experiments 1 and 2, adult male Sprague–Dawley rats were subjected to 2 h of IMO and then exposed for 5 min to the elevated plus-maze (EPM) at 1, 3 or 7 days after IMO. Blood samples were taken at 15 min after initial exposure to the EPM. Increases in anxiety-like behavior and HPA responsiveness to the EPM were found at all times post-IMO. Changes in the resting levels of HPA hormones did not explain the enhanced HPA responsiveness to the EPM (Experiment 3). In Experiments 4 and 5, we studied the effects of a single exposure to a shorter session of IMO (1 h) on behavioral and HPA responses to a brief and mild session of foot-shocks done 10 days after IMO. Neither previous IMO nor exposure to shocks in control rats modified behavior in the EPM. However, a brief session of shocks in previously IMO-exposed rats dramatically increased anxiety in the EPM. HPA and freezing responses to shocks were similar in control and previous IMO groups. Therefore, a single exposure to IMO appears to induce long-lasting HPA and behavioral sensitization to mild superimposed stressors, although the two responses are likely to be at least partially independent. Long-term effects of IMO on the susceptibility to stress-induced endocrine and emotional disturbances may be relevant to the characterization of animal models of post-traumatic stress.

Introduction

Long-term effects of a single exposure to stress were first described some decades ago in studies on the consequences of exposure to unpredictable and uncontrollable electric shock (the so called learned helplessness phenomenon, see Maier, 1984) and the interaction between drugs and stress (i.e. Antelman et al., 1988; Caggiula et al., 1989). However, the long-term physiological and behavioral consequences of a single exposure to stress have attracted attention in the last decade, particularly since Tilders' lab reported that a single session of shock was able to induce long-lasting sensitization of the ACTH responsiveness to a novel environment (Van Dijken et al., 1993), as well as altered behavior in those situations (Van Dijken et al., 1992a, b,c, 1993). These results led to focus considerable attention in long-lasting effects of single rather than chronic exposure to stress.

Regarding the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, it has been found that exposure to systemic stressors such as amphetamine and cytokines (i.e. interleukin-1 β , tumor necrosis factor α) induces long-lasting sensitization of the HPA response both to the same (homotypic) and to novel (heterotypic) stressors (see Armario et al., 2004 for review).

Exposure to mixed (emotional and systemic) stressors such as electric shock also enhanced HPA response to different novel environments (Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003, 2004; Van Dijken et al., 1993). Therefore, it was assumed that a single exposure to stress would result in sensitization of the HPA response to additional superimposed stressful situations, either homotypic or heterotypic. However, we have repeatedly found that a single exposure to immobilization (IMO) causes a long-term desensitization of the HPA response to the same (homotypic) stressor, which affected both peripheral and central (paraventricular nucleus of the hypothalamus, PVN) components of the HPA axis (Dal-Zotto et al., 2002, 2003; Martí et al., 2001; Vallès et al., 2003). Interestingly, this homotypic desensitization progressively developed over time, affecting first the release of HPA hormones and later transcriptional activity of PVN neurons (Martí et al., 2001; Vallès et al., 2003). In addition, this homotypic desensitization has also been observed after a single exposure to restraint or foot-shock (Armario et al., 2004), the magnitude of desensitization being stronger with the more severe stressors. Therefore, it appears that long-term sensitization induced by stressors having both emotional and systemic components may be restricted to heterotypic stressors, in contrast to the effects of some immune or pharmacological stressors.

In addition to the changes in the HPA axis, a single exposure to some stressors has been described to induce long-term behavioral consequences. Unfortunately, the pattern of results obtained is not always clear. Thus, a single, relatively brief, session of foot-shocks has been reported to induce long-lasting inhibition of activity in some novel environments (Stam et al., 2002; Van den Berg et al., 1998; Van Dijken et al., 1992a, 1992b, 1992c, 1993), accompanied by more active behavior in a forced swimming task (Van Dijken et al., 1992a). In contrast, a single exposure to social defeat caused long-lasting immobility both in novel environments and in the forced swimming test (Koolhaas et al., 1990). More recently, exposure of rats to cat, cat odor or underwater trauma stress-induced long-lasting anxiety-like behavior in the elevated plus-maze (EPM) (Adamec and Shallow, 1993; Adamec et al., 1997, 1999; Cohen et al., 1999, 2003, 2004; Richter-Levin, 1998), but no change in another novel environment such as the hole-board (e.g. Adamec and Shallow, 1993; Adamec et al., 1997; 1999).

Interest for the long-lasting consequences of a single exposure to stress is in great part related to the search for putative animal models of post-traumatic stress disorder (PTSD). The best animal models of PTSD are likely to be those involving emotional stressors that the animals can interpret as life-threatening. In this regard, exposure to IMO may be of interest because this stressor is probably one of the most severe as evaluated by all physiological marker of stress (e.g. Márquez et al., 2002). However, a single exposure to IMO did not result in altered behavior of the rats in novel environments, including the EPM, when assessed 14 days after IMO (Belda et al., 2004). For this reason, we hypothesize that long-term effects of a single exposure to severe stressors could result in relatively transient (few days) behavioral and physiological alterations when the animals are tested under resting conditions, but could render them, in the long-term, more vulnerable to additional superimposed stressors, a characteristic of some PTSD patients (see Stam, 2007 for

a review). To test such hypothesis, rats were exposed in different experiments to a single session of IMO. Some days later, we studied behavioral and HPA responses to the EPM or to a brief session of shocks applied immediately before the exposure to the EPM.

Materials and Methods

Animals

We used male Sprague–Dawley rats, which were obtained from the breeding center of the Universitat Autònoma de Barcelona and were 52–64 days old upon their arrival at the laboratory. They were housed in pairs for 1 week before starting the experiment, in standard conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12-h light/12-h dark schedule (lights on at 08:00h). Food and water were available ad libitum. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona, followed the “Principles of laboratory animal care” and was carried out in accordance the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

General procedure

The experimental procedures were always done in the morning, between 9:00 and 12:00h. Starting 1 day after their arrival, all animals were handled at least twice in different days for approximately 2 min a day. Seven days after their arrival, IMO rats were stressed (for 1 or 2 h depending on the experiment) by taping their four limbs to metal mounts attached to a wooden board (García and Armario, 2001; García et al., 2000). Control rats were maintained undisturbed in the vivarium. The two cage-mates always received the same treatment. After each IMO exposure, rats were carefully inspected to assure that they were in good health. Two rats were excluded from statistical analysis due to limb damage.

Between 1 and 10 days after IMO, animals were tested in the EPM. The EPM (Pellow and File, 1986) consisted of 4 white wooden arms (Formica) at right angles to each other, connected to a central square. The apparatus was elevated 50 cm above the floor. Two of the opposite arms had high walls (enclosed arms, 43 cm high), whereas the other two were the open arms that had a 0.7 cm ridge to provide an additional grip. Each arm was divided into 3 equal sections. The rat was placed facing a closed arm and the subject was considered to be in a given arm when all paws were inside. A black curtain surrounded the EPM to minimize external influences and a 40 w white bulb was placed 1.20m above the centre of the apparatus. The procedure lasted 5 min. For behavioral analysis, a video camera was suspended from the ceiling and the session was videotaped for subsequent analysis by an experimenter blind to the treatment (S. F.). We measured time spent in open and closed arms, latency to the first open arm entry, number of entries and ambulations in each type of arm (number of sections entered within a given arm). The two cage-mates were tested simultaneously in separate adjacent rooms, different from those used to immobilize the

animals. The EPM was cleaned carefully between animals with a water solution containing ethanol (5% v/v).

In Experiments 1 and 2, 10 min after the end of the EPM, blood samples were taken by tail nick. During these 10 min, the animals were returned to the vivarium. The tail nick consisted of gently wrapping the animals with a cloth, making a 2mm incision at the end of one of the tail arteries and then massaging the tail while collecting, within 2 min, 300µl of blood into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). This method is extensively used in our lab because in our conditions elevations in HPA hormones due to the procedure are of low magnitude (Belda et al., 2004; García et al., 2000; Márquez et al., 2002, 2005, 2006). The cage-mates were sampled simultaneously (two experimenters were sampling at the same time and a third was gently holding the two rats). Basal levels prior to exposure to the EPM were not obtained because this can affect animal behavior.

Data were analyzed by means of the 'statistical package for social science' (SPSS) (version 15 for Windows). The statistical analysis performed in each experiment is described below.

Biochemical analysis

Plasma ACTH and corticosterone levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA), as previously described (Márquez et al., 2006). In brief, ACTH RIA used ¹²⁵I-ACTH (Amersham, Spain) as the tracer, rat synthetic ACTH 1–39 (Sigma, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH kindly provided by Dr. G. B. Makara (Inst. Exp. Med., Budapest, Hungary). Corticosterone RIA used ¹²⁵I-carboximethyloxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Spain), synthetic corticosterone (Sigma, Spain) as the standard, and an antibody raised in rabbits against corticosterone-carboximethyloxime-BSA kindly provided by Dr. G. B. Makara. Plasma corticosteroid-binding globulin was inactivated by low pH. All samples to be compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 6.0% for ACTH and 5.8% for corticosterone. The sensitivity of the assay was 30pg/ml for ACTH and 0.2mg/dl for corticosterone.

Experiments 1–3

In Experiment 1, 20 rats were immobilized for 2 h and then tested in the EPM 1 or 3 days later (n=10 in each group). Control rats (n=22) were only exposed to the EPM. Blood samples were collected in the two groups to evaluate the HPA response to the EPM. To analyze non-normal data (EPM behavior and plasma ACTH), we used Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney tests (two-tailed), if needed. Corticosterone response to the EPM was normal and it was analyzed by means of a parametric analysis of variance followed by further "contrast simple" analysis versus control group.

In Experiment 1, we found that exposure to IMO was able to increase anxiety-like behavior in the EPM and to sensitize HPA response to this mild stressor. To study a longer time interval, in Experiment 2 rats were immobilized for 2 h (n=10) and tested, 7 days later, in

the EPM. Blood samples were taken afterwards. Control rats (n=12) were only exposed to the EPM and then sampled. Mann–Whitney test (two-tailed) was used to analyze non-normal behavioral and ACTH data. The Student's t-test was used for corticosterone because it followed a normal distribution.

In Experiments 1 and 2, resting levels of HPA hormones after IMO were not obtained to avoid interference with behavior in the EPM. Thus, in Experiment 3, rats were exposed to 2 h of IMO (n=8 for each of the three times post-IMO) or left undisturbed (n=24). One, 4 or 7 days later, they were sampled under non-stressful conditions. Later, ACTH and corticosterone levels were analyzed. ACTH data was log-transformed to achieve homogeneity of variances. As log-ACTH followed a normal distribution, a parametric analysis of variance was performed followed by “contrast simple” comparisons versus control group. Corticosterone did not follow a normal distribution and a non-parametric Kruskal-Wallis analysis of variance was performed, followed by Mann–Whitney U tests (two-tailed). The between-subject factor was “IMO” in all cases (four levels: control, IMO-1 day, IMO-4 days and IMO-7 days).

Experiments 4–5

Data from our laboratory suggest that the increase in anxiety-like behavior induced by IMO is a transient feature (Belda et al., 2004). However, it is possible that after the effects of IMO on basal anxiety have vanished, a future stressor could reinstate anxiety-like behavior. To test this hypothesis, in Experiment 4 rats were immobilized for 1 h (n=20) or remained undisturbed into the vivarium (n=20). Only 1 h instead of 2 h of IMO was chosen assuming that the effects of 1 h of IMO should be less intense and lasting than those of 2 h. Ten days later, half of the subjects in each group were directly exposed to the EPM or firstly foot-shocked (see below) and immediately afterwards tested in the EPM. The shock chambers were made of clear Plexiglas (19.7 cm × 11.8 cm × 20.0 cm) and contained a removable floor of 15 stainless-steel rods, 0.4 cm diameter and spaced 0.9 cm center to center (Cibertec, Spain). One hundred and eighty seconds after entering the chamber, shocked-rats were exposed to only 3 scrambled shocks (0.5mA, 3s of duration each one, AC current, one shock every 60s) and removed from the chamber immediately after the last shock (5 min inside the shock chamber in total). Cage-mates were simultaneously processed in separate chambers and were unable to see each other. The shock chambers were placed in a room different from the ones used to immobilize the animals and to perform the EPM. The chambers were cleaned carefully between animals with a water solution containing ethanol (5% v/v).

To analyze data in Experiment 4, behavioral measures were log-transformed to improve homogeneity of variances and a generalized linear model was used (McCulloch and Searle, 2001). “IMO” and “shock” were the two between-subjects factors. As a method of estimation, the maximum likelihood (ML) was used in all cases. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic. Pairwise comparisons were done for the decomposition of the interaction “shock × IMO” when it was statistically

significant. The generalized linear model is a more flexible statistical tool than the standard general linear model (GLM) because several types of distribution of the data could be chosen. Goodness of fit values (Akaike's information criterion, AIC) were used to compare different types of distribution. Normality distribution and identity as a link function was chosen for the present results to be the one that better fit the data.

In Experiment 4, blood samples were not taken before exposure to the EPM to avoid interference of the sampling procedure with the subsequent EPM behavior. In Experiment 5, control (n=12) and IMO 1 h (n=12) rats were initially treated following the same protocol described in Experiment 4, but on day 8 post-IMO both groups were sampled by tail nick under basal conditions, returned to the vivarium and sampled again 12 min later. On day 10 post-IMO, both groups were exposed to the shock chamber and shocked as described for the Experiment 4 (5 min inside the shock chamber in total), but now all the rats were left in the shock chambers for 3 min after the last shock (8 min in total). Immediately after that, they were sampled, returned to the vivarium and sampled again 12 min later. This particular protocol was introduced for three main reasons. First, it can allow us to obtain a more appropriate time for the evaluation of the corticosterone response to the shock on day 10 post-IMO (8 and 20 min after initial exposure to the chambers). Second, we can measure freezing behavior during the 3 min preceding shocks and during the 3 min after the shocks, thus allowing us to characterize sensitivity to shock. Freezing behavior (time spent completely immobile) was recorded by a video camera placed in a frontal position and measured by a stop-watch by an experimenter blind to the treatment (S. F.). Third, we can study the response to nail-nick by itself, sampling the animals 12 min after an initial sampling under basal conditions (day 8 post-IMO).

To analyze freezing in Experiment 5, a generalized linear model repeated measures analysis (generalized estimating equations model or GEE, Hardin and Hilbe, 2003) was used, with time as the within-subject factor (two levels: pre and post-shock) and IMO as the between-subject factor (two levels: control and IMO). To analyze corticosterone, a GEE was also used with day (two levels: day 8 and day 10 post-IMO) and sampling time (two levels: time 8 and 12 min after initial exposure to the shock chamber and the corresponding times for the non-stress condition) as the within-subject factors, and IMO as the between-subject factor (two levels: control and IMO). As a method of estimation, the maximum likelihood (ML) was used in all cases. Normality distribution and identity as a link function was chosen to be the one that better fit the data. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic.

Results

Experiment 1

One rat from the “IMO-3 days group” was excluded due to limb damage. As **Fig. 1A** shows, Kruskal–Wallis test showed that groups differed in time spent in open arms ($\chi^2(2)=8.12$, $P < 0.05$), open arm entries ($\chi^2(2)=7.70$, $P < 0.05$) and ambulations in open arms ($\chi^2(2)=9.03$, $P < 0.05$). Groups did not show differences in closed arm entries, as a measure of general activity (**Fig. 1A**, $\chi^2(2)=5.20$, NS). Additional Mann-Whitney comparisons showed that animals exposed to IMO, both 1 and 3 days before the EPM, presented an anxiogenic profile in the test in comparison to control animals, as measured by time spent in open arms (1day: $U=49.0$, $P < 0.05$; 3 days: $U=52.0$, $P < 0.05$), open arm entries (1day: $U=52.5$, $P < 0.05$; 3days: $U=51.5$, $P < 0.05$) and ambulations in open arms (1day: $U=50.0$, $P < 0.05$; 3days: $U=45.0$, $P < 0.05$). The percent of time spent in open arms with regard to time spent in open + closed arms (**Fig. 1A**) only approached significance (Kruskal–Wallis, $\chi^2(2)=5.53$, $P=0.063$). Rats exposed 1day after IMO to the EPM also presented a decrease in the percent of time spent in open arms ($U=57.0$, $P < 0.05$). Kruskal-Wallis of the percent of entries into open arms with regard to total entries (**Fig. 1A**) was also statistically not significant and 1day after IMO the percent of entries into open arms was only marginally decreased in comparison to control group ($U=62.5$, $P=0.053$).

With regard to pituitary-adrenal activation (**Fig. 2A**), IMO was able to induce an increase in ACTH response to the EPM, both 1 and 3days after the stressor (Kruskal–Wallis: $\chi^2(2)=26.78$, $P < 0.001$; 1day vs control, Mann–Whitney $U=0$, $P < 0.001$; 3days vs control, Mann–Whitney $U=15.0$, $P < 0.001$). The same pattern of response was observed for corticosterone (**Fig. 2A**, $F(2, 38)=13.53$, $P < 0.001$, “contrast simple” 1day vs control: $P < 0.01$, 3days vs control: $P < 0.001$). Although basal levels were not obtained in Experiment 1 to avoid any effect of sampling on behavior, the changes are unlikely to be totally explained by changes in basal levels on the basis of the results obtained in Experiment 3 (see below).

Experiment 2

One rat from the control group fell from the EPM and one IMO rat was excluded due to limb damage. As **Fig. 1B** shows, 7 days after the exposure to IMO, still an anxiogenic profile was detected in the EPM, as measured by time spent in the open arms ($U=20.0$, $P < 0.05$), open arm entries ($U=19.5$, $P < 0.05$) and ambulations in open arms ($U=23.0$, $P < 0.05$). The percent of time spent in open arms was also statistically significant ($U=21.0$, $P < 0.05$), but not the percent of entries into open arms or the number of closed arm entries.

With regard to pituitary-adrenal axis activation (**Fig. 2B**), IMO exposure 7 days before did not result in increased ACTH response to the EPM, although sensitization was detected with corticosterone ($t(18)=3.77$, $P < 0.001$).

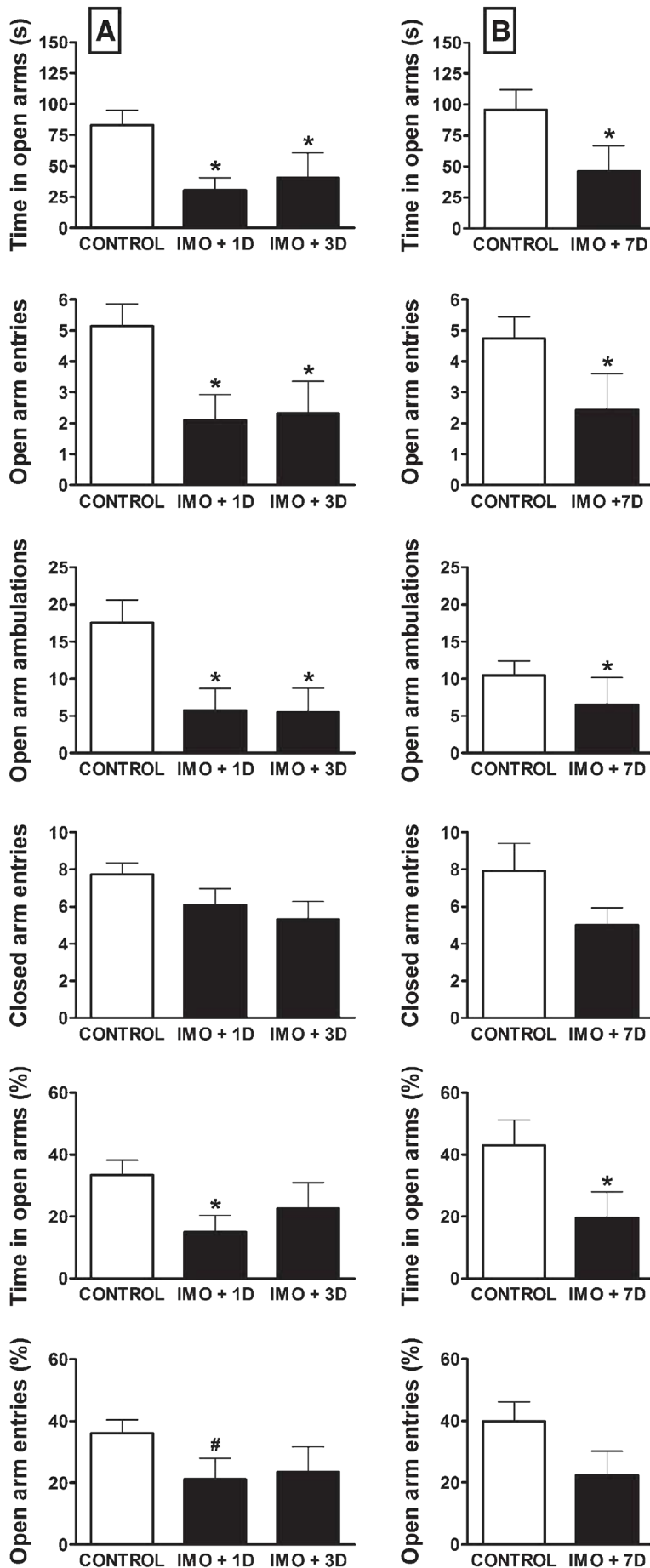


Fig. 1. Effects of a single previous exposure to IMO (2 h) on behavior in the elevated plus-maze, 1 day, 3 days (panel A; IMO+ 1D, and IMO + 3D, respectively) or 7 days (panel B; IMO + 7D) after the stressor.

*Means and S.E.M. are represented. The number of animals per group was as follows: n=22 for controls, n=9-10 for IMO groups in panel A; n=11 for controls and n=9 for IMO in panel B. #P=0.053 *P<0.05 vs respective control group.*

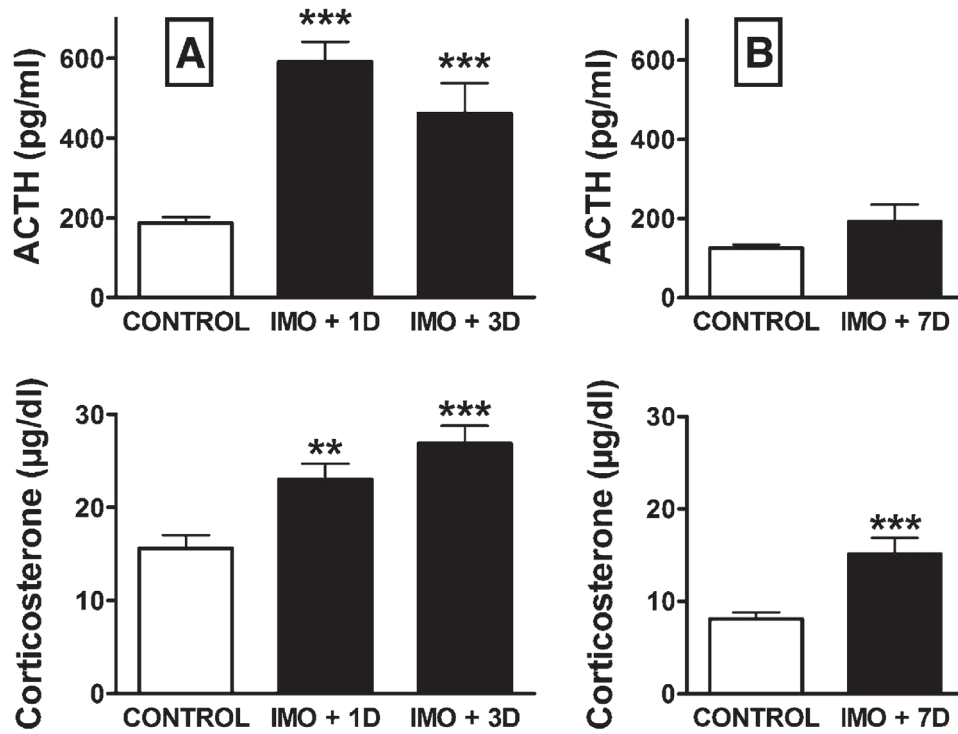


Fig. 2. Effect of a single previous exposure to IMO (2 h) on ACTH and corticosterone responses to the elevated plus-maze, 1 day, 3 days (panel A; IMO + 1D, and IMO + 3D, respectively) or 7 days (panel B; IMO + 7D) after the stressor.

Means and S.E.M. are represented. The number of animals per group was as follows: $n=22$ for controls, $n=9-10$ for IMO groups in panel A; $n=11$ for controls and $n=9$ for IMO in panel B. Samples were taken 10 min after the termination of the 5 min exposure to the test. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs respective control group.

Experiment 3

Exposure to IMO changed ACTH basal levels as can be seen in **Table 1** ($F(3, 44)=8.47$, $Pb0.001$). Contrast analysis showed that in comparison to control group, IMO increased plasma ACTH on the day after IMO ($Pb0.001$), still 4 days later ($Pb0.05$), but not 7 days later. Basal plasma corticosterone levels (**Table 1**) were also changed by IMO (Kruskal–Wallis: $\chi^2(3)=19.28$, $pb0.001$). Mann–Whitney U tests showed that IMO increased basal levels of corticosterone, 1 ($U=11.0$, $Pb0.001$), 4 ($U=39.0$, $Pb0.05$), and 7 ($U=46.0$, $Pb0.05$) days after IMO.

	Control (n=24)	IMO+1D (n=8)	IMO+4D (n=8)	IMO+7D (n=8)
ACTH (pg/ml)	49±3	87±8***	64±7*	58±5
Corticosterone (µg/dl)	0.7±0.2	4.2±1.1***	2.2±0.8*	1.2±0.3*

Table 1. Plasma ACTH and corticosterone levels in resting conditions 1 day, 4 days or 7 days after a single exposure to IMO (IMO + 1D, IMO +4D or IMO+ 7D, respectively).

Samples were taken between 9 and 12 A.M. Mean and S.E.M. are represented.

** $P<0.05$ and *** $P<0.001$ vs. control.*

Experiment 4

Two animals were excluded from the experiment because they fell off from the EPM. With regard to time spent in open arms (**Fig. 3A**), the statistical analysis showed that the “shock” factor was statistically significant (Wald $\chi^2(1)=4.62$, $P < 0.05$), but not the “IMO” factor, being “shock×IMO” also statistically significant (Wald $\chi^2(1)=5.78$, $P < 0.05$). Additional analysis of the interaction “shock×IMO” showed that in previously IMO-exposed rats, the shocks were able to decrease time spent in open arms in comparison to non-shocked animals ($P < 0.001$), whereas shock had no effect in non-IMO-exposed animals. Also, within the rats that received shocks before the EPM, those previously exposed to IMO showed decreased time spent in open arms in comparison to non-IMO-exposed rats ($P < 0.01$). No differences between IMO and non-IMO rats were found in the non-shocked groups. Thus, shock or IMO exposures by themselves were ineffective to produce an anxiogenic-like behavior, but when combined were able to induce an anxiogenic effect.

Similar results were obtained with open arm entries and ambulations in open arms. With regard to open arm entries (**Fig. 3B**), neither “shock” nor “IMO” by themselves were statistically significant, but the interaction “shock×IMO” was statistically significant (Wald $\chi^2(1)=3.92$, $P < 0.05$). Additional analysis of the interaction “shock × IMO” showed that only in previously IMO-exposed subjects, the shocks were able to decrease open arm entries ($P < 0.01$). Also, within the rats that received shocks before the EPM, previous IMO rats showed lower open arm entries than non-IMO rats ($P < 0.05$). Again, shock or IMO by themselves did not modify open arm entries.

With regard to ambulations in open arms (**Fig. 3C**), although “shock” and “IMO” factors were statistically non-significant, “shock × IMO” was statistically significant (Wald $\chi^2(1)=3.94$, $P < 0.05$). Additional analysis of the interaction “shock × IMO” showed again that only in previously IMO-exposed rats, the shocks were able to decrease ambulations in open arms ($P < 0.01$). Again, within the rats that received shocks before the EPM, IMO rats showed reduced ambulations in open arms as compared to non-IMO rats ($P < 0.01$). The decrease in open arm ambulation was then not observed when IMO or shock treatments were given alone.

Groups did not differ in closed arm entries (**Fig. 3D**, all NS) or in closed arms ambulations (not shown, all NS). Finally, as it can be seen in **Figs. 3E and F**, the percent of time spent in open arms (“shock”: Wald $\chi^2(1)=4.09$, $P < 0.05$, “IMO”: NS, “shock×IMO”: Wald $\chi^2(1)=5.39$, $P < 0.05$) and the percent of open arm entries with regard to total entries (“shock”: NS, “IMO”: NS, “shock×IMO”: Wald $\chi^2(1)=4.26$, $P < 0.05$) followed the same general pattern of results as the absolute values. With regard to the percent of time spent in open arms, additional comparisons to analyze the interaction “shock×IMO” showed that in IMO-exposed rats, shock administration increased the percent of time spent in open arms ($P < 0.01$), and that in shocked-rats, IMO stress increased also this measure ($P < 0.05$). Regarding the percent of entries in open arms, also in IMO-exposed rats, shock administration increased the percent of entries in open arms ($P < 0.05$), but in shocked-rats, IMO stress only marginally increased this measure ($P = 0.052$).

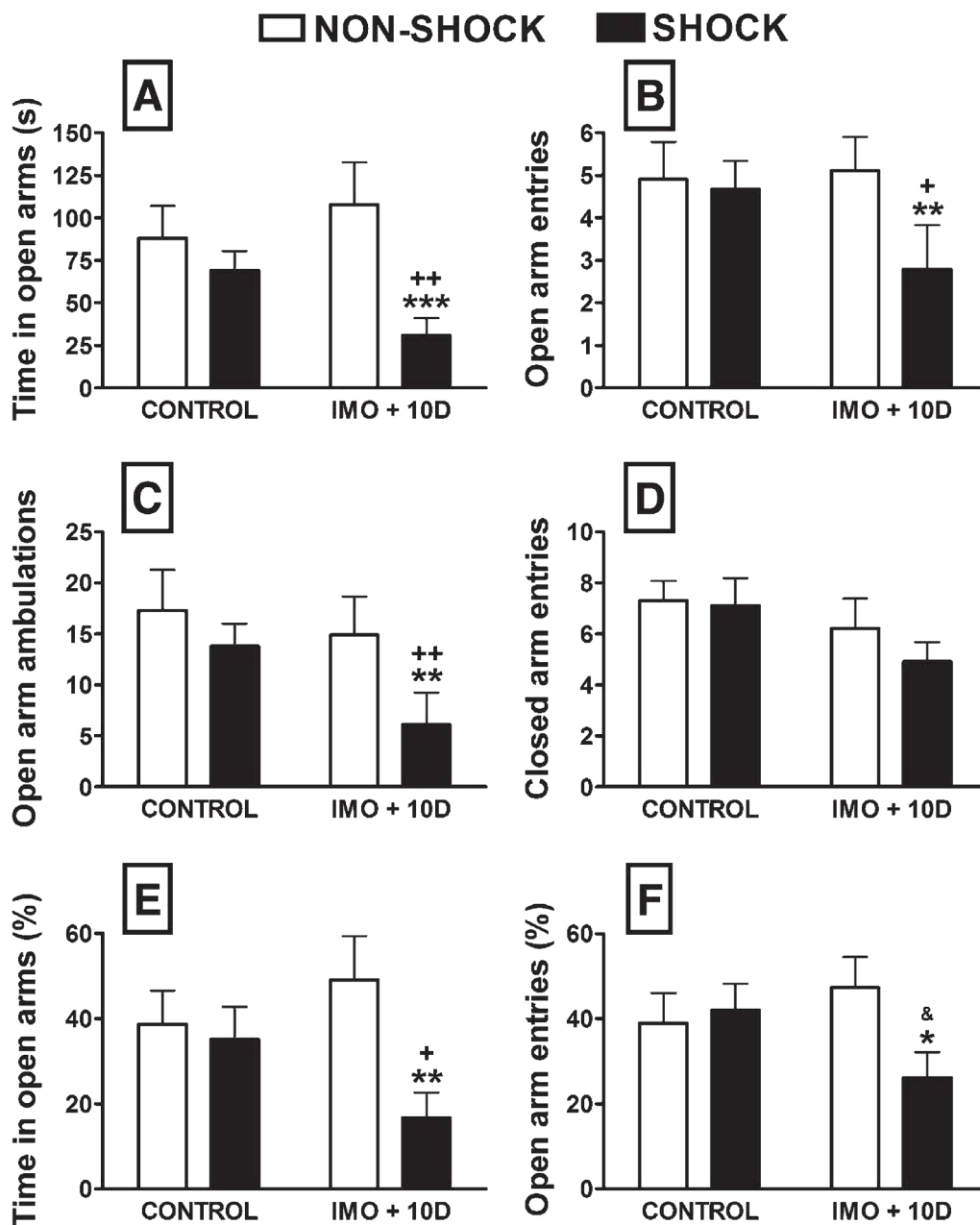


Fig. 3. Effects of a single previous exposure to IMO (1 h), 10 days after the stressor, on the impact of a brief session of shock given immediately before the elevated plus-maze. Means and S.E.M. (n=9-10) are represented. The different behaviors evaluated were time in open arms (panel A), open arm entries (panel B), open arm ambulations (panel C), closed arm entries (panel D), percent of time in open arms (panel E) and percent of entries in the open arms (panel F). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs IMO rats without shock; and $P = 0.052$ + $P < 0.05$ and ++ $P < 0.01$ vs shocked-rats without IMO.

Experiment 5

Corticosterone levels (Fig. 4A), measured on day 8 post-IMO (under basal conditions and after tail nick) and on day 10 post-IMO after the shocks, were not affected by previous IMO exposure (“IMO”: NS, “day×IMO”: NS, “sampling time ×IMO”: NS, “sampling time×day×IMO”: NS). The within-subjects factors were all significant (“day”: Wald χ^2 (1) = 81.45, $P < 0.001$, “sampling time”: Wald χ^2 (1) = 103.62, $P < 0.001$, “sampling time × day”: Wald χ^2 (1) = 6.26, $P < 0.05$). Globally, these results indicated that: (i) corticosterone levels were higher on day 10 (when animals were exposed to the shock chamber, and later shocked) than on day 8 (when animals were only sampled); and (ii) corticosterone levels were higher after the second than the first sampling. However, the existence of the interaction indicated that the increase in corticosterone levels induced by the shock was higher than the one induced by the tail-nick itself. More importantly, previous IMO exposure did not modify corticosterone response.

Freezing behavior (Fig. 4B) was not affected by previous IMO exposure (“IMO”: NS, “time ×IMO”: NS) and, as expected, freezing post-shock was higher than freezing pre-shock, regardless of IMO exposure (“time”: Wald χ^2 (1) = 440.56, $P < 0.001$).

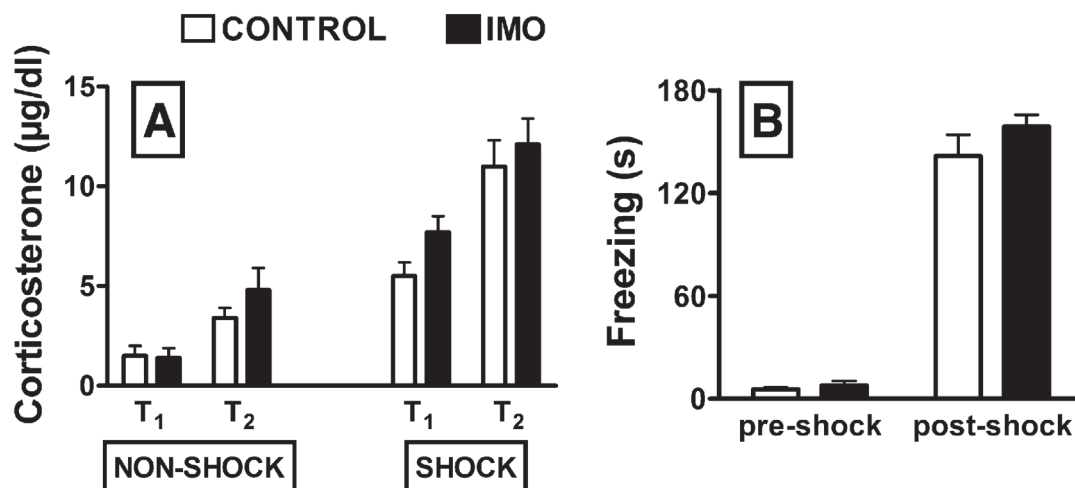


Fig. 4. Effects of a single previous exposure to IMO (1 h) on the corticosterone response to blood sampling and exposure to a brief session of shocks (panel A), and the freezing response elicited by shocks (panel B).

Means and S.E.M. (n = 12 for each group) are represented. On day 8 after IMO exposure, control and IMO rats were sampled under resting conditions (T1) and again 12 min later (T2). On day 10 after IMO, the same animals were exposed to shocks and sampled 8 min after the initial exposure to the chamber (T1) and 12 min after the first sampling (T2). Between T1 and T2 animals remained in their home cages in the animal room. Time spent freezing was measured in the shock chamber for 3 min before and 3 min after the 3 shocks. No differences between control and IMO groups were observed.

Discussion

The present results demonstrate that a single exposure of adult rats to 2 h of IMO was able to induce a sensitization of the HPA response to a novel environment (EPM) that was accompanied by signs of anxiety-like behavior. This altered response was still present 7 days after IMO. A single exposure to 1 h of IMO, 10 days before, did not result in altered EPM behavior, but a brief superimposed stressor (mild shocks) elicited anxiety-like behavior in previously immobilized, while not affecting control rats. In contrast, HPA and freezing responses to shocks were similar in control and IMO rats at that time. Thus, behavioral sensitization to further superimposed stressors outlasts both normalization of anxiety-like behavior under basal conditions and HPA sensitization.

In two experiments, rats were subjected to 2 h of IMO and 1, 3 or 7 days later, behavioral and physiological responsiveness to a novel environment (EPM) was evaluated. Exposure to IMO resulted in lower number of entries and less time spent in the open arms of the EPM when the animals were tested 1 or 3 days after IMO. Similar effects were still observed 7 days after IMO. The decrease in time spent in open arms was accompanied by a slight non-significant trend to reduce closed arm entries, which suggests that in addition to enhanced anxiety-like behavior, IMO may cause a small and transient reduction of activity in novel environments. This is a phenomenon currently observed with severe stressors that is likely to disappear after 3 days (e.g. Woodmansee et al., 1993). For instance, exposure to 2 h of IMO did not modify neither activity nor exploration in the hole-board when assessed 5 days after the stressor (Gagliano et al., 2008), suggesting that, at this time, IMO-induced inhibition of activity has gone. Thus, the EPM appears to be more sensitive than the hole-board to specifically evaluate anxiety-like behavior. In our experimental conditions, the percent of time spent in open arms appears to be a more sensitive index of the anxiogenic effects of IMO than percent of entries into open arms. Percent of time spent in open arms was decreased in previously IMO-exposed rats, 1 and 7 days post-stress, although in rats exposed to IMO 3 days before this measure was not statistically significant. In Experiment 4, in IMO-exposed rats, the administration of mild shocks before the EPM was able again to decrease percent of time spent in open arms. However, the fact that the results are more clear with the absolute time spent in open arms than with the percent of time spent in those arms (excluding the time spent in the center) suggests that IMO can induce changes in both activity and anxiety that are likely to have different mechanisms and time-course, thus complicating the interpretation of the results.

Sensitization of the ACTH and corticosterone responses to the EPM followed approximately the same time-course as changes in anxiety-like behavior. Sensitization of both ACTH and corticosterone responses were observed during the first 3 days after IMO, but it was still significant only for corticosterone on day 7 post-IMO. This apparent dissociation between ACTH and corticosterone may be explained by the fact that samples were taken 10 min after the termination of exposure of the rats to the EPM in order to obtain an optimum time point for plasma corticosterone, which reaches the optimum not before

15 min after initial exposure to the situation (Le Mevel et al., 1979). It is quite possible that an enhanced ACTH response could have been observed if samples were taken immediately after the EPM. IMO transiently increased basal levels of ACTH and corticosterone, an effect repeatedly observed, after exposure to severe stressors, particularly with corticosterone (e.g. Fleshner et al., 1995; Martí et al., 1996; Ottenweller et al., 1994). However, the magnitude of the changes observed in the present work cannot explain the higher levels of ACTH and corticosterone of IMO as compared to control rats after the exposure to the EPM.

Long-lasting IMO-induced sensitization of the HPA response to a novel environment is in accordance with previous reports using a relatively brief session of electric foot-shock (Van Dijken et al., 1993), IMO (Gagliano et al., 2008) or a long session of electric tail-shock typical of the learned-helplessness paradigm (Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003; 2004). In the latter case, sensitization was mainly reflected in a faster response to the acute superimposed stressors and persisted for at least 10 days (Johnson et al., 2002). Sensitization of the HPA response after a single exposure to IMO is restricted to novel (heterotypic) stressors, as we have repeatedly found that a single exposure to IMO caused a long-term desensitization of the HPA response to the same (homotypic) stressor, which affected both peripheral and central (PVN) components of the HPA axis (see Armario et al., 2004 for a review).

IMO-induced corticosterone release may be involved in the induction and/or expression of long-lasting changes in anxiety-like behavior as the stressor caused a marked and prolonged release of corticosterone and resting levels of corticosterone were elevated for some days. The role of acute glucocorticoid (including corticosterone) administration on anxiety-like behavior is controversial in the literature, with direct experimental evidence for both anxiolytic (Andreatini and Leite, 1994; File et al., 1979) and anxiogenic (Calfa et al., 2006; Calvo et al., 1998) effects. However, most experimental data favor the view that the induction of stress-induced changes in anxiety are mediated by the release of glucocorticoids (e.g. Calfa et al., 2006; Calvo et al., 1998). Therefore, the induction of corticosterone release during exposure to IMO rather than the elevated levels during testing may play an important role in anxiety-like behavior in the EPM.

Other labs have reported longer lasting increases in basal anxiety-like behavior in rats after a single exposure to some stressors such as short sessions of electric shock (Pijlman and Van Ree, 2002; Pijlman et al., 2003; Stam et al., 2002; Van Dijken et al., 1992a, 1992b, 1992c, 1993), social defeat (Koolhaas et al., 1990; Meerlo et al., 1996), cat (predator) or cat odor (e.g. Adamec and Shallow, 1993; Adamec et al., 1997; Cohen et al., 1999, 2000) and forced underwater exposure (Richter-Levin, 1998). However, results are not always easily to reconcile. For instance, exposure to a cat elicited consistent increases in anxiety-like behavior in the EPM, but activity/exploration in the hole-board was rarely affected (e.g. Adamec and Shallow, 1993; Adamec et al., 1997; 1999). It may be argued that the EPM is more appropriate than the hole-board to evaluate anxiety-like behavior. However, long-lasting reduction of activity in different types of open-field tests has been described after

electric foot-shock or social defeat (e.g. Meerlo et al., 1996; Stam et al., 2002; Van Dijken et al., 1992a, 1992b, 1992c, 1993). In addition, Maier's lab has not been able to find consistent effects of longer-lasting and more severe sessions of inescapable/uncontrollable electric tail-shock typical of the learned-helplessness paradigm on anxiety-like behavior in the EPM even within the first 24 h post-shock (Grahn et al., 1995). These inconsistent behavioral data occur despite very consistent results regarding HPA sensitization (Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003, 2004). The authors argued that perhaps EPM behavior is measuring a type of anxiety poorly sensitive to shock and its controllability (Grahn et al., 1995), in contrast to another test such as social interaction, which appears specifically sensitive to shock controllability (Short and Maier, 1993).

At present, there is no clear explanation for controversial results regarding long-lasting effects of different stressors on anxiety-like behavior, but there are at least three possibilities (see Armario et al., 2008 for further discussion). First, individual differences in susceptibility to stress may be important (e.g. Cohen et al., 2003; Milde et al., 2003), some strains of rats being more resistant than others. Second, the influence of exposure to stress on behavior in novel environments may depend on qualitative aspects of stressors. For instance, long-lasting stress-induced increases in fear/anxiety elicited by novel environments may appear with stressors for which the animals have a strong biological predisposition to establish associations with the exposure to novel environments. This may be the case of cat (or cat odor) presence and foot-shock (that can be interpreted as a painful arena). In contrast, with IMO, the main danger signal, likely to be associated with IMO, is the IMO procedure itself. Finally, behavior of animals in novel environments is quite sensitive to procedures associated to such exposure. It is therefore difficult to rule out an interaction between previous treatment of animals (e.g. stress several days before) and their response to procedures preceding exposure to the EPM such as transport of animals, handling and so on.

To demonstrate that previous exposure to IMO could have induced sensitization of animals to further mild stressors and that long-term behavioral effects of a single exposure to IMO in the EPM could be better observed after superimposing a mild stressor, control and previously immobilized rats were tested in the EPM 10 days after exposure to 1 h of IMO, either under basal conditions or after being exposed to 3 mild shocks (0.5 mA). We chose 1 h of IMO assuming that the length of exposure to the stressor would be related to the duration of its long-lasting effects. Previous exposure to 1 h of IMO did not modify the behavior of the rats in the EPM when evaluated 10 days later. In addition, a brief exposure to shock did not alter EPM behavior in control animals. In contrast, in previous IMO rats, such brief shock exposure drastically altered behavior in the EPM, resulting in clearly enhanced signs of anxiety. Therefore, a single exposure to IMO is able to induce long-lasting changes in behavior that are not observed under non-stressful conditions, but are unmasked by pre-exposure to a brief stressor. The present results support the idea that acute-stress-induced changes in the EPM are more appropriate to reveal anxiety than the evaluation under non-stressful conditions (Korte and De Boer, 2003). In addition, they are consistent with: (i) the long-lasting sensitization of some physiological responses

to superimposed stressors after previous exposure to relatively brief sessions of shocks (Bruijnzeel et al., 2001; Stam et al., 1996); and (ii) the enhanced fear-conditioning caused by previous single exposure to certain stressors (Baratta et al., 2007; Cordero et al., 2003; Iwamoto et al., 2007; Kohda et al., 2007; Rau et al., 2005). Our results are also consistent with the well-accepted fact that PTSD patients are characterized by a higher responsiveness to stressors not directly related to the traumatic situation (see Stam, 2007 for a review).

Taken the two last experiments together we found that corticosterone response to a brief session of shocks was similar in control and IMO rats despite an enhancement of anxiety-like behavior elicited by shocks only in IMO rats. These data suggest that sensitization of the HPA axis and the anxiety-like behavior elicited by IMO is likely to be the result of two, at least partially, independent processes. To our knowledge, only two previous reports have simultaneously studied behavioral and HPA response to novel environments after a previous single exposure to stress (Gagliano et al., 2008, Van Dijken et al., 1993). Van Dijken et al. (1993) reported reduced locomotion, increased immobility and a higher ACTH response after exposure to a novel environment in rats previously exposed to a brief session of foot-shocks 14 days before. However, corticosterone response did not differ between control and shocked-rats. In our lab, previous exposure to IMO resulted in a sensitization of the ACTH response to a hole-board 5–7 days after the stressor, which was not reflected in changes in activity/exploration in the apparatus (Gagliano et al., 2008). In addition, in our hands, a single exposure to fur cat odor resulted in long-lasting changes in anxiety-like behavior in the EPM with no evidence of HPA sensitization (Muñoz-Abelán et al., 2008). This independence is also corroborated by the lack of statistically significant correlations between hormonal and behavioral data in the present study (data not shown).

At present, there is no direct experimental evidence about the role of specific brain areas in the long-lasting effects of IMO on both homotypic desensitization and heterotypic sensitization. However, the changes are unlikely to be located in the PVN or the anterior pituitary and they may be the result of the processing of the stressors in higher level brain areas such as the medial prefrontal cortex, the amygdala or the septum. In fact, we have found that a single exposure to IMO lead to a reduced neuronal activation, as evaluated by *c-fos* expression, in the medial amygdala and the lateral ventral septum (Vallès et al., 2006), suggesting that these areas may play an important role in long-lasting homotypic desensitization. On the basis of long-lasting changes in anxiety caused by exposure to cat and the results of Adamec's lab, we have suggested that ventral hippocampus and its connections with the right basolateral amygdala may play an important role in stress-induced sensitization (Armario et al., 2008).

In conclusion, the present results indicate that a single exposure to IMO-induced transient enhancement of HPA responsiveness to a novel environment (EPM) and anxiety-like behavior in the same situation. However, a normalization of such responses are not indicative of a dissipation of the effects of IMO, since a brief exposure to an additional

stressor, which did not alter behavior of non-previously stressed rats, greatly enhanced anxiety-like behavior in those rats previously exposed to IMO 10 days before. Since IMO is a severe stressor, the present results support the possibility that a single exposure to IMO may be a putative animal model of PTSD.

Acknowledgments

This work was supported by SAF2005-00358 (Ministerio de Educación y Ciencia) and RD06/0001/0015 (Instituto de Salud Carlos III, Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud).

References

- Adamec, R.E., Burton, P., Shallow, T., Budgell, J., 1999. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure—implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav* 65, 723–737.
- Adamec, R.E., Shallow, T., 1993. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* 54, 101–109.
- Adamec, R.E., Shallow, T., Budgell, J., 1997. Blockade of CCK(B) but not CCK(A) receptors before and after the stress of predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Behav Neurosci* 111, 435–449.
- Andreatini, R., Leite, J.R., 1994. The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and to pentylenetetrazol-induced convulsions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 18, 1333–1347.
- Antelman, S.M., Knopf, S., Kocan, D., Edwards, D.J., Ritchie, J.C., Nemeroff, C.B., 1988. One stressful event blocks multiple actions of diazepam for up to at least a month. *Brain Res* 445, 380–385.
- Armario, A., Escorihuela, R.M., Nadal, R., 2008. Long-term neuroendocrine and behavioral effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1121–1135.
- Armario, A., Vallès, A., Dal-Zotto, S., Márquez, C., Belda, X., 2004. A single exposure to severe stressors causes long-term desensitization of the physiological response to the homotypic stressor. *Stress* 7, 157–172.
- Baratta, M.V., Christianson, J.P., Gomez, D.M., Zarza, C.M., Amat, J., Masini, C.V., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2007. Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. *Neuroscience* 146, 1495–1503.
- Belda, X., Márquez, 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.
- Bruijnzeel, A.W., Stam, R., Croiset, G., Wiegant, V.M., 2001. Long-term sensitization of cardiovascular stress responses after a single stressful experience. *Physiol Behav* 73, 81–86.
- Caggiula, A.R., Antelman, S.M., Aul, E., Knopf, S., Edwards, D.J., 1989. Prior stress attenuates the analgesic response but sensitizes the corticosterone and cortical dopaminergic responses to stress 10 days later. *Psychopharmacology (Berl)* 99, 233–237.

- Calfa, G., Volosin, M., Molina, V.A., 2006. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behav Brain Res* 172, 324–332.
- Calvo, N., Martijena, I.D., Molina, V.A., Volosin, M., 1998. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. *Brain Res* 800, 227–235.
- Cohen, H., Benjamin, J., Kaplan, Z., Kotler, M., 2000. Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model. *Eur Neuropsychopharmacol* 10, 429–435.
- Cohen, H., Kaplan, Z., Kotler, M., 1999. CCK-antagonists in a rat exposed to acute stress: implication for anxiety associated with post-traumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 10, 8–17.
- Cohen, H., Zohar, J., Matar, M., 2003. The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 53, 463–473.
- Cohen, H., Zohar, J., Matar, M.A., Zeev, K., Loewenthal, U., Richter-Levin, G., 2004. Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 29, 1962–1970.
- Cordero, M.I., Venero, C., Kruyt, N.D., Sandi, C., 2003. Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats. Evidence for a role of corticosterone. *Horm Behav* 44, 338–345.
- Dal-Zotto, S., Martí, O., Armario, A., 2002. Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav Brain Res* 129, 187–195.
- Dal-Zotto, S., Martí, 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.
- File, S.E., Vellucci, S.V., Wendlandt, S., 1979. Corticosterone — an anxiogenic or an anxiolytic agent? *J Pharm Pharmacol* 31, 300–305.
- Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* 136, 5336–5342.
- Gagliano, H., Fuentes, S., Nadal, R., Armario, A., 2008. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. *Behav Brain Res* 187, 239–245.
- García, A., Armario, A., 2001. Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 363–374.
- García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., Armario, A., 2000. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 72, 114–125.
- Grahn, R.E., Kalman, B.A., Brennan, F.X., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. The elevated plus-maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 565–570.
- Hardin, J.W., Hilbe, J.M., 2003. *Generalized estimating equations*. Chapman and Hall/ CRC, Boca Raton.
- Iwamoto, Y., Morinobu, S., Takahashi, T., Yamawaki, S., 2007. Single prolonged stress increases contextual freezing and the expression of glycine transporter 1 and vesicle-associated membrane protein 2 mRNA in the hippocampus of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31, 642–651.

- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2002. Prior stressor exposure primes the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 27, 353–365.
- Kohda, K., Harada, K., Kato, K., Hoshino, A., Motohashi, J., Yamaji, T., Morinobu, S., Matsuoka, N., Kato, N., 2007. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience* 148, 22–33.
- Koolhaas, J.M., Hermann, P.M., Kemperman, C., Bohus, B., van den Hoofdakker, R.H., Beersma, D.G.M., 1990. Single social defeat in male rats induces a gradual but long lasting behavioural change: a model of depression? *Neuroscience Research Communications* 7, 35–41.
- Korte, S.M., De Boer, S.F., 2003. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behavior in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463, 163–175.
- Le Mevel, J.C., Abitbol, S., Beraud, G., Maniey, J., 1979. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinology* 105, 812–817.
- Maier, S.F., 1984. Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8, 435–446.
- Márquez, C., Belda, X., Armario, A., 2002. Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res* 926, 181–185.
- Márquez, C., Nadal, R., Armario, A., 2005. Responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to different novel environments is a consistent individual trait in adult male outbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 30, 179–187.
- Márquez, C., Nadal, R., Armario, A., 2006. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 168, 13–22.
- Martí, O., García, A., Vallès, A., Harbuz, M.S., Armario, A., 2001. Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *Eur J Neurosci* 13, 129–136.
- Martí, O., Gavaldà, A., Jolín, T., Armario, A., 1996. Acute stress attenuates but does not abolish circadian rhythmicity of serum thyrotrophin and growth hormone in the rat. *Eur J Endocrinol* 135, 703–708.
- McCulloch, C., Searle, S., 2001. *Generalized, linear and mixed models*. Wiley - Interscience, New York.
- Meerlo, P., Overkamp, G.J., Benning, M.A., Koolhaas, J.M., Van den Hoofdakker, R.H., 1996. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. *Physiol Behav* 60, 115–119.
- Milde, A.M., Sundberg, H., Roseth, A.G., Murison, R., 2003. Proactive sensitizing effects of acute stress on acoustic startle responses and experimentally induced colitis in rats: relationship to corticosterone. *Stress* 6, 49–57.
- Muñoz-Abellán, C., Andero, R., Nadal, R., Armario, A., 2008. Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1139–1150.
- O'Connor, K.A., Ginsberg, A.B., Maksimova, E., Wieseler Frank, J.L., Johnson, J.D., Spencer, R.L., Campeau, S., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2004. Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology* 80, 252–263.
- O'Connor, K.A., Johnson, J.D., Hammack, S.E., Brooks, L.M., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2003. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 28, 481–500.

- Ottenweller, J.E., Servatius, R.J., Natelson, B.H., 1994. Repeated stress persistently elevates morning, but not evening, plasma corticosterone levels in male rats. *Physiol Behav* 55, 337–340.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24, 525–529.
- Pijlman, F.T., van Ree, J.M., 2002. Physical but not emotional stress induces a delay in behavioral coping responses in rats. *Behav Brain Res* 136, 365–373.
- Pijlman, F.T., Wolterink, G., Van Ree, J.M., 2003. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. *Behav Brain Res* 139, 131–138.
- Rau, V., DeCola, J.P., Fanselow, M.S., 2005. Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 1207–1223.
- Richter-Levin, G., 1998. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma—potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res* 79, 73–83.
- Short, K.R., Maier, S.F., 1993. Stressor controllability, social interaction, and benzodiazepine systems. *Pharmacol Biochem Behav* 45, 827–835.
- Stam, R., 2007. PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 1: human studies. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 530–557.
- Stam, R., Croiset, G., Akkermans, L.M., Wiegant, V.M., 1996. Sensitization of the colonic response to novel stress after previous stressful experience. *Am J Physiol* 271, R1270–R1273.
- Stam, R., van Laar, T.J., Akkermans, L.M., Wiegant, V.M., 2002. Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation. *Behav Brain Res* 132, 69–76.
- Vallès, A., Martí, O., Armario, A., 2003. Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *Eur J Neurosci* 18, 1353–1361.
- Vallès, A., Martí, O., Armario, A., 2006. Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol* 66, 591–602.
- Van den Berg, C.L., Lamberts, R.R., Wolterink, G., Wiegant, V.M., Van Ree, J.M., 1998. Emotional and footshock stimuli induce differential long-lasting behavioural effects in rats; involvement of opioids. *Brain Res* 799, 6–15.
- Van Dijken, H.H., de Goeij, D.C., Sutanto, W., Mos, J., de Kloet, E.R., Tilders, F.J., 1993. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58, 57–64.
- Van Dijken, H.H., Mos, J., van der Heyden, J.A., Tilders, F.J., 1992a. Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52, 945–951.
- Van Dijken, H.H., Tilders, F.J., Olivier, B., Mos, J., 1992b. Effects of anxiolytic and antidepressant drugs on long-lasting behavioural deficits resulting from one short stress experience in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 109, 395–402.
- Van Dijken, H.H., Van der Heyden, J.A., Mos, J., Tilders, F.J., 1992c. Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav* 51, 787–794.
- Woodmansee, W.W., Silbert, L.H., Maier, S.F., 1993. Factors that modulate inescapable shock-induced reductions in daily activity in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45, 553–559.

Artículo 2.

Acute stress-induced sensitization of the pituitary–adrenal response to heterotypic stressors: Independence of glucocorticoid release and activation of CRH1 receptors

Xavier Belda, Núria Daviu, Roser Nadal and Antonio Armario

Hormones and Behavior 62 (2012) 515-524

Abstract

A single exposure to some severe stressors causes sensitization of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) response to novel stressors. However, the putative factors involved in stress-induced sensitization are not known. In the present work we studied in adult male rats the possible role of glucocorticoids and CRH type1 receptor (CRH-R1), using an inhibitor of glucocorticoid synthesis (metyrapone, MET), the glucocorticoid receptor (GR) antagonist RU38486 (mifepristone) and the non-peptide CRH-R1 antagonist R121919. In a first experiment we demonstrated with different doses of MET (40–150 mg/kg) that the highest dose acted as a pharmacological stressor greatly increasing ACTH release and altering the normal circadian pattern of HPA hormones, but no dose affected ACTH responsiveness to a novel environment as assessed 3 days after drug administration. In a second experiment, we found that MET, at a dose (75 mg/kg) that blocked the corticosterone response to immobilization (IMO), did not alter IMO-induced ACTH sensitization. Finally, neither the GR nor the CRH-R1 antagonists blocked IMO-induced ACTH sensitization on the day after IMO. Thus, a high dose of MET, in contrast to IMO, was unable to sensitize the HPA response to a novel environment despite the huge activation of the HPA axis caused by the drug. Neither a moderate dose of MET that markedly reduced corticosterone response to IMO, nor the blockade of GR or CRH-R1 receptors was able to alter stress-induced HPA sensitization. Therefore, stress-induced sensitization is not the mere consequence of a marked HPA activation and does not involve activation of glucocorticoid or CRH-R1 receptors.

Introduction

Exposure to stress causes a transient activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis that results in the release of ACTH and glucocorticoid (corticosterone in rats) to the bloodstream. It is well established that stress-induced glucocorticoid release plays an important role in several physiological and behavioral consequences of stress, including the constraint of the activation of the HPA axis through negative feedback mechanisms (De Kloet et al., 1998; Keller-Wood and Dallman, 1984).

Several decades ago, Dallman and Jones (1973) observed in rats that whereas administration of corticosterone several hours before exposure to stressors blocked, as expected, corticosterone response to the stressors, endogenous release of corticosterone induced by a stressor was unable to block the response to a subsequent stressor. They proposed that stress can induce some kind of facilitation of the HPA axis that may compensate negative glucocorticoid feedback so that the response to a novel stressor is maintained essentially intact. Evidence that prior stress can maintain intact or even enhance ACTH response to a subsequent stressor has been further reported by numerous studies (i.e. De Souza and Van Loon, 1982; Le Mevel et al., 1979; Lilly et al., 1989), although inhibition of the HPA axis by a previous stress has also been sometimes reported

(Graessler et al., 1989; Keller-Wood et al., 1983; Martí et al., 1999). It appears that the type of stressor and the length of exposure are important in determining the final outcome. If, under certain conditions, negative glucocorticoid feedback on the HPA axis is counteracted by stress-induced facilitation, blockade of glucocorticoid synthesis would unmask stress-induced facilitation. This has been demonstrated to be the case after chronic exposure to several stressors (Akana et al., 1996; Martí et al., 1994) and directly demonstrated using brief and repeated exposures to immobilization on boards (IMO) in adrenalectomized rats maintained with low corticosterone levels in the drinking water (ADX+B) to normalize resting HPA activity (Andrés et al., 1999).

Acute exposure to severe stressors such as foot-shock, tail-shock and immobilization on boards (IMO) has been consistently found to enhance for several days or even weeks the HPA response to different (heterotypic) mild stressors (Belda et al., 2008; Gagliano et al., 2008; Johnson et al., 2002; Martí et al., 2001; Muñoz-Abellán et al., 2008; Van Dijken et al., 1993; Weinberg et al., 2010). The mechanisms involved have been scarcely studied. Pioneer work by Maier's lab suggests that long-lasting tail-shock induced HPA sensitization is paralleled by reduced efficacy of negative glucocorticoid feedback (O'Connor et al., 2003) and observed at the level of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) (O'Connor et al., 2004), thus suggesting a major central rather than peripheral component. However, the factors involved in the induction of long-lasting stress-induced HPA sensitization are not known. Vasopressin (AVP) may be involved in the expression of acute stress-induced sensitization as blockade of AVP type 1b receptors blunted the slight sensitization of the ACTH response to noise observed on the day after a single exposure to restraint (Spiga et al., 2009).

Stress-induced release of glucocorticoids may be an important modulator of HPA sensitization, although the direction of the predicted effects of glucocorticoids on the induction of heterotypic sensitization may be opposite depending on which aspects of the literature we focus. On one hand, glucocorticoids appear to be important for the induction of some sensitizing effects of stress. For instance, glucocorticoids, acting through both glucocorticoid and mineralocorticoid receptors (GR and MR, respectively) appear to be critical for restraint to increase anxiety-like behavior in the elevated plus maze (i.e. Calvo and Volosin, 2001). Moreover, chronic cold-induced facilitation of the ACTH response to acute restraint has been observed to be positively related to the level of plasma corticosterone in ADX+B rats (Akana and Dallman, 1997). However, other lines of research indicate that stress-induced glucocorticoid release can block stress-induced facilitation of the HPA response (Andrés et al., 1999; Wong et al., 2000).

The induction of acute stress-induced sensitization of the HPA response appears to be related to the intensity and/or duration of exposure to the stressors and constrained by glucocorticoids released during stress (Andrés et al., 1999; Cassano and D'Mello, 2001; Wong et al., 2000). However, it is unknown whether glucocorticoids are also able to constrain HPA sensitization caused by severe stressors and whether strong activation of the HPA axis by non-classical stressors can also induce sensitization. We then decided to

tests both hypotheses using IMO as a typical severe stressor and metyrapone (MET) as a non-classical stressor. MET combines two critical properties for the purposes of the present work: first, it is an inhibitor of 11- β hydroxylase (Jenkins et al., 1958), an enzyme critical for the synthesis of glucocorticoids, and consequently would reduce stress-induced corticosterone release; second, at high doses, MET can act as a pharmacological stressor causing activation of several peripheral markers of stress, including ACTH, and also widespread induction of c-fos all over the brain (Rotllant et al., 2002). As a second approach, we studied the effect of blockade of GR with the antagonist mifepristone.

Another potential candidate for the induction of sensitization is CRH. CRH neurons present in the parvocellular subdivision of PVN are critically involved in the control of stress-induced ACTH release in the anterior pituitary. Nevertheless, the role of CRH in stress is far beyond this hypophysiotropic action. Other populations of CRH neurons are present in particular brain regions (e.g. central amygdala, bed nucleus of stria terminalis, cerebral cortex and hippocampal formation) that are important for a number of physiological and behavioral responses to stress and drugs of abuse (Dunn and Berridge, 1990; Sarnyai et al., 2001). More particularly, brain CRH, through its interaction with the CRH type 1 receptors (CRH-R1), appears to be important for locomotor sensitization to drugs of abuse (Sarnyai et al., 2001). Furthermore, prolonged acute i.c.v. administration of CRH or repeated administration of urocortin in the basolateral amygdala, acting through CRH-R1, can induce long-lasting sensitization of some responses to stress (Rainnie et al., 2004; Servatius et al., 2005). Hence, it is plausible that activation of CRH-R1 may be involved in the induction of long-lasting stress-induced sensitization of the HPA axis.

Thus, in the present work we studied the role of stress-induced glucocorticoid release and stress-induced activation of brain GR and CRH-R1 on IMO-induced sensitization of the HPA response to a heterotypic stressor (exposure to a novel environment) in adult male rats.

Materials and Methods

Animals

Male Sprague–Dawley rats obtained from the breeding center of the Universitat Autònoma de Barcelona were used. They were 2–3 months old at the beginning of the experiments. The animals were housed in pairs in polypropylene opaque wire-topped cages with solid-bottom (21.5×46.5×14.5 cm; Type “1000 cm²”, Panlab S.L.U., Barcelona, Spain) containing wood shavings bedding (Lignocel 3/4, Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) under standard conditions of temperature (21±1 °C) and in a 12:12 h light/dark schedule (lights on at 08:00 h). Food (SAFE-diet A04, Panlab S.L.U., Barcelona, Spain) and water were available ad libitum. The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona, following the

“Principles of laboratory animal care” and was carried out in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

General procedure

The experimental treatments were always carried out in the morning except when otherwise stated. Starting at least two days after their arrival, all animals were handled at least three times on different days for approximately 2 min a day. In addition, one blood sample was taken under basal conditions to habituate animals to the procedure. Blood samples were taken by tail-nick, consisting in gently wrapping the animals with a cloth, making a 2 mm incision at the end of one of the tail veins and then massaging the tail while collecting (within 2min) 300 µl of blood into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). This procedure is extensively used in our lab and by others because very low resting levels of hormones are obtained under appropriate conditions (Belda et al., 2004; Vahl et al., 2005). Cage-mates were sampled simultaneously (two experimenters were sampling at the same time and a third was gently holding the two rats). Blood was centrifuged at 4930 ×g (15 min, 4 °C), and plasma was frozen (−20 °C) until assay. Animals were assigned at random to the different experimental groups in function of their date of birth and body weight.

In experiment 1, the time-course of the acute effects of various doses of MET (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) on the activity of the HPA axis and its response to a novel environment, was studied 3 days later. On day 1, animals were assigned to four groups, receiving vehicle (40%propyleneglycol in saline) or 40, 75 or 150 mg/kg MET (Vehicle, MET 40, MET 75 and MET 150 groups, respectively; 7–8 rats per group). Injections were administered subcutaneously (s.c.) at 0.4 ml/kg. Doses of MET were chosen on basis of our previous data (Rotllant et al., 2002; Belda and Armario, unpublished data). Blood samples were collected 1, 3, 5 and 12 h after injection (at 09:30, 11:30, 13:30 and 20:30 h of the day, respectively). One additional blood sample was taken under resting conditions on day 2 (between 09:30 and 10:30 h in the morning). On day 4, all the animals were individually introduced into an open field (OF) for 15 min and one blood sample was obtained immediately after the test.

In experiment 2, the effect of MET on IMO-induced activation of the HPA axis and its response to a novel environment, was studied 3 days later. On day 1, animals were divided into three groups (7 rats per group): Vehicle-Control (rats given vehicle), Vehicle-IMO (rats given vehicle and 1 h later exposed to 2 h of IMO) and MET 75-IMO (rats given 75 mg/kg of MET and 1 h later exposed to 2 h of IMO). The group MET 75-Control was not included on the basis of results from experiment 1 showing no effect per se of the drug. IMO rats were immobilized on boards as previously described (García and Armario, 2001; Kvetnansky and Mikulaj, 1970). Briefly, rats were restrained in a prone position by attaching their four limbs to metal mounts with adhesive tape. Head movements were restricted by means of two metal loops around the neck. Control rats were maintained undisturbed in the vivarium. Blood samples were taken in all groups following the same

schedule: 1 h after injection (just before IMO), immediately after IMO, and 2 and 9 h after the termination of exposure to IMO (at 09:30, 11:30, 13:30 and 20:30 h of the day, respectively). One additional blood sample was taken under resting conditions on day 2 (between 09:30 and 10:30 h in the morning). On day 4, all the animals were individually introduced into an OF for 15 min and one blood sample was obtained immediately after the test.

To rule out a role of GR, we studied in experiment 3 the effect of the GR receptor antagonist RU38486 (mifepristone; Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) on IMO-induced activation of the HPA axis and its effect on HPA response to a novel environment on the day after instead of 3 days later. This modification was introduced because we wanted to study whether or not GR blockade affected inhibition of activity in novel environments typically observed on the day after exposure to severe stressors. This inhibition vanishes after 3 days (Gagliano et al., 2008). Moreover, we have observed that the degree of HPA sensitization is similar 1 and 3 days after this stressor (unpublished). On day 1, animals were divided into four groups (10–12 rats per group): Vehicle-Control (rats given 40% propyleneglycol in saline 0.4 ml/kg, s.c.), Mifepristone-Control (rats given 50 mg/kg of mifepristone), Vehicle-IMO (rats given vehicle and 1 h later exposed to 2 h of IMO) and mifepristone-IMO (rats given 50 mg/kg of mifepristone and 1 h later exposed to 2 h of IMO). The dose of mifepristone was chosen based on previous studies (Moldow et al., 2005; Saal et al., 2003). In this experiment we modified the IMO procedure used in experiment 2 by replacing the metal loops by two plastic pieces (7×6 cm) placed on each side of the head. In addition, the body was subjected to the board by means of a piece of plastic cloth (10 cm wide) attached with a velcro® that surrounded the entire trunk (Muñoz-Abellán et al., 2011; Rabasa et al., 2011). These modifications were carried out because, with the latter procedure, the possibility that animals suffer some type of injury is minor without substantially changing the endocrine response (Belda and Armario, unpublished data). Control rats were maintained undisturbed in the vivarium except for blood sampling. Blood samples were taken in all groups following the same schedule: 1 h after injection (just before IMO), immediately after IMO, and 45 min after the termination of exposure to IMO. On day 2, all the animals were individually introduced into an OF for 5 min and one blood sample was obtained immediately after the test.

In experiment 4 we studied the effect of R121919 (a CRH-R1 receptor antagonist; Janssen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium) on IMO-induced activation of the HPA axis and its effect on HPA response to a novel environment, on the day after. On day 1, animals were divided into four groups (8–11 rats per group): Vehicle-Control (rats given tartaric acid 0,1 M in saline 1.0 ml/kg, s.c.), R121919-Control (rats given 30 mg/kg of R121919), Vehicle-IMO (rats given vehicle and 1 h later exposed to 2 h of IMO) and R121919-IMO (rats given 30 mg/kg of R121919 and 1 h later exposed to 2 h of IMO). A higher dose of R121219 than in previous studies (Heinrichs et al., 2002; Keck et al., 2001) was used to assure that CRH-R1 was completely blocked. IMO procedure was the same as that used in experiment 3. Blood samples were taken in all groups at 30 min of IMO, immediately after IMO and 45 min after the termination of exposure to IMO. On day 2, all animals

were individually introduced into an OF for 5 min and one blood sample was obtained immediately after the test.

Open field

The OF consisted in a plastic gray rectangular box (56×36.5×31 cm) opened at the top and illuminated by a white 25 W bulb placed 150 cm above the center of the surface of the box. Each animal was placed initially in the periphery of the apparatus facing to the wall. The cage-mates were tested simultaneously in the same room in two similar boxes. The room used to carry out the OF was different from that used for IMO. The apparatus was cleaned carefully between animals with a tap water solution containing ethanol (5% v/v). In experiments 3 and 4, behavior was videotaped from the top by a video camera (Sony SSC-M388 CE, BW) situated 150 cm above the center of the cage. A blind experimenter to the treatment manually estimated the number of areas crossed (i.e. ambulation) as a measure of activity. The box was divided into 12 areas (10 of them in contact with the walls and 2 in the center of the box; for peripheral and central ambulation, respectively) and ambulation was considered when the animal crossed an area with the 4 paws.

Biochemical analysis

Plasma ACTH and corticosterone levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA). In brief, ACTH RIA used 125I-ACTH (PerkinElmer Life Science, Boston, USA) as the tracer, rat synthetic ACTH 1–39 (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb7) kindly provided by Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). The characteristics of the antibody have been described previously (Engeland et al., 1989) and we followed a non-equilibrium procedure. First antibody was added on day 1 and 125I-ACTH on day 2. After one additional 18 h incubation period, the second antibody was added. Corticosterone RIA used 125I-corticosterone–carboximethyloxime–tyrosine–methylester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain), and synthetic corticosterone (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard and an antibody raised in rabbits against corticosterone–carboximethyloxime-BSA kindly provided by Dr. G. Makara (Inst. Exp. Med., Budapest, Hungary). The characteristics of the antibody and the basic RIA procedure have been described previously (Zelena et al., 2003). All samples to be statistically compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 3.8% for ACTH and 7.8% for corticosterone. The sensitivity of the assays was 12.5 pg/ml for ACTH and 0.1 µg/dl for corticosterone.

Statistical analysis

The statistical package for social science (SPSS) program was used (version 19 for Windows). To analyze data, hormone measures were log-transformed. For the hormone dynamics on day 1, generalized linear models with repeated measures analysis (generalized estimating equations model, GEE; Hardin and Hilbe, 2003) were used.

Sampling time was the within-subjects factor (four levels for experiments 1 and 2 and three levels for experiments 3 and 4). Regarding the between-subjects factors, in function of the experiment, they were as follows: experiment 1 MET dose (four levels), experiment 2 treatment (three levels), experiment 3 mifepristone and stress (each factor with two levels), and in experiment 4 R121919 and stress (each factor with two levels). Endocrine data in resting conditions, as well as endocrine and behavioral data in the OF were analyzed with a generalized linear model (GENLIN; McCulloch and Searle, 2001), with the same between-subjects factors than previously described. The generalized linear model is a more flexible statistical tool than the standard general lineal model (GLM) because several types of distribution and different covariance structures of the repeated measures data could be chosen. In addition, the generalized linear model does not require homogeneity of variances and admit missing values without removing all data subject. The maximum likelihood (ML) as a method of estimation and normality distribution and identity as a link function were always used. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic followed by pairwise comparisons. Additional sequential Bonferroni adjustments were made when the number of comparisons exceeded the degrees of freedom (experiment 2). The criterion for significance was set at $p < 0.05$.

Results

Experiment 1

Fig. 1 shows the dose–response effects of MET on plasma ACTH and corticosterone levels at 1, 3, 5 and 12 h post-injection (INJ-1h, INJ-3h, INJ-5h and INJ-12h, respectively). The GEE analysis of ACTH revealed significant effects of sampling time (Wald χ^2 (3)= 55.3; $p < 0.001$), dose (Wald χ^2 (3)= 108.9; $p < 0.001$) and the interaction sampling time by dose (Wald χ^2 (9)= 106.7; $p < 0.001$). The decomposition of the interaction showed that the highest dose of MET increased plasma ACTH levels at all times studied (at least $p < 0.01$); in contrast, the effect of the other two doses was less pronounced, showing increases at 1, 3 and 12 h post-injection (at least $p < 0.05$ in all cases). Regarding corticosterone, the GEE analysis revealed significant effects of sampling time (Wald χ^2 (3)= 135.3; $p < 0.001$), dose (Wald χ^2 (3)= 64.8; $p < 0.001$) and the interaction sampling time by dose (Wald χ^2 (9)= 87.2; $p < 0.001$). The decomposition of the interaction showed that the dose of 150 mg/kg increased plasma corticosterone levels at 1, 3 and 5 h post-injection ($p < 0.001$ at all times) while decreasing them at 12 h post-injection (in the dark phase; $p < 0.01$). The dose of 75 mg/kg only increased corticosterone levels at 1 and 5 h post-injection (at least $p < 0.05$). The dose of 40 mg/kg of MET had no effect at any of the times studied.

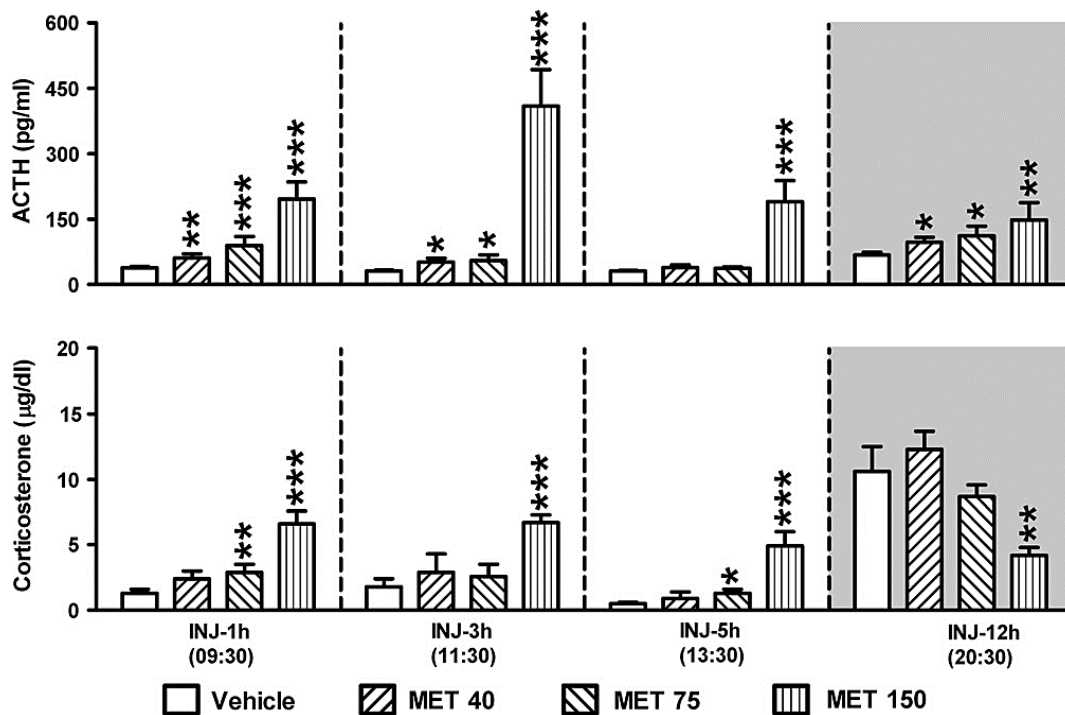


Fig. 1. Time course of the effects of various doses of MET on resting levels of plasma ACTH and corticosterone. Means \pm SEM (n=7–8 per group) are represented.

Rats were given either vehicle or 40, 75 or 150 mg/kg of MET (MET 40, MET 75 or MET 150, respectively). Then, they were sampled at 1, 3, 5 and 12 h after injection (INJ-1h, INJ-3h, INJ-5h and INJ-12h, respectively; specific times of day are shown in parentheses). Shadings represent a nocturnal blood sample; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs vehicle within the same sampling period.

Statistical analysis of plasma ACTH on the day after the injection (**Fig. 2A**) showed no effect of any dose of MET. However, a significant dose effect was found on plasma corticosterone (Wald χ^2 (3)= 13.4; $p < 0.01$). Further comparisons revealed that only the dose of 150 mg/kg of MET raised basal corticosterone levels the day after the injection ($p \leq 0.001$).

The analysis of the HPA response to the OF three days after injection (**Fig. 2B**) showed no effect of MET on plasma ACTH levels. Although a statistically significant dose effect was observed on corticosterone levels (Wald χ^2 (3)=9.2; $p < 0.05$), further analysis revealed that none of the doses of MET resulted in a response to the OF different from vehicle control group.

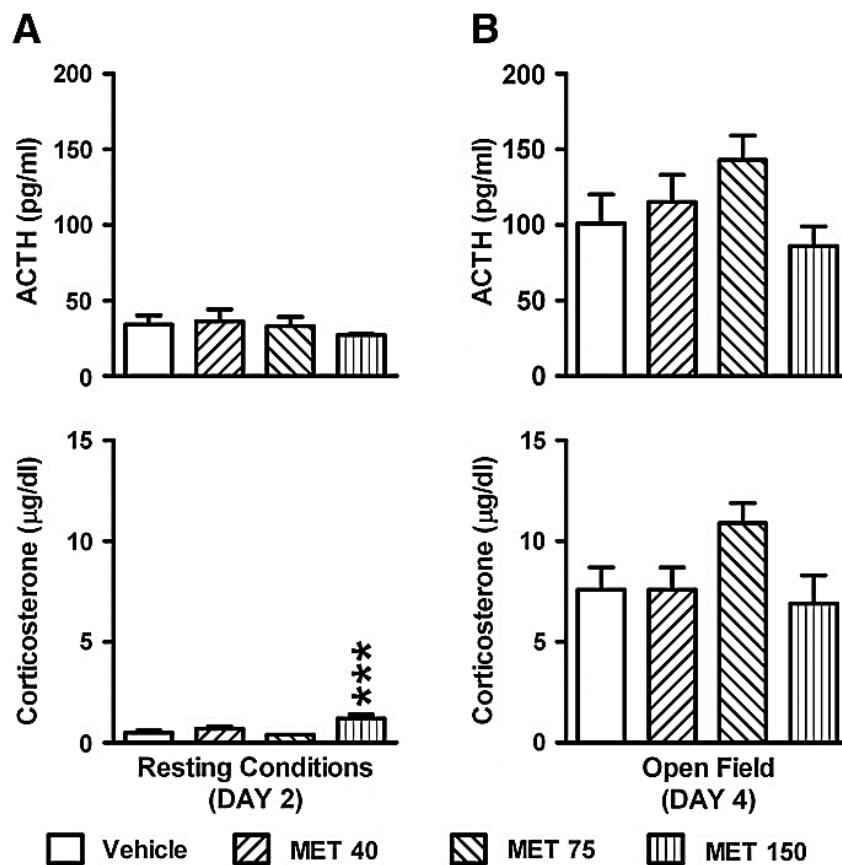


Fig. 2. Effects of various doses of MET on plasma ACTH and corticosterone levels.

Samples were taken under resting conditions (day 2; panel A) and after a 15 min open-field exposure on day 4 (panel B). Means \pm SEM ($n=7-8$ per group) are represented. Rats were given either vehicle or 40, 75 or 150 mg/kg of MET (MET 40, MET 75 or MET 150, respectively) on day 1; *** $p < 0.001$ vs vehicle.

Experiment 2

Fig. 3 shows the effect of a single dose of 75 mg/kg of MET on ACTH and corticosterone responses to IMO. The GEE analysis of plasma ACTH revealed significant effects of sampling time (Wald χ^2 (3)=674.2; pb 0.001), treatment (Wald χ^2 (2)=407.1; pb 0.001) and the interaction sampling time by treatment (Wald χ^2 (6)=593.1; pb 0.001). The decomposition of the interaction showed that: (i) the dose of 75 mg/kg of MET increased ACTH levels with respect to vehicle groups 1 h after injection (INJ-1h; prior to IMO); (ii) Vehicle-IMO rats showed increased ACTH levels both immediately after stress exposure (IMO-2h) and at 2 h post-IMO (R-2h) when compared to Vehicle-Controls; (iii) ACTH levels in the group with MET+IMO were higher than in the other two groups at all times studied. The GEE analysis of plasma corticosterone revealed significant effects of sampling time (Wald χ^2 (3)=298.6; pb 0.001), treatment (Wald χ^2 (2)=51.2; pb 0.001) and the interaction sampling time by treatment (Wald χ^2 (6)=345.7; pb 0.001). The decomposition of the interaction showed that: (i) MET increased corticosterone levels with respect to vehicle groups 1 h after injection (INJ-1h; prior to IMO); (ii) Vehicle-IMO rats showed increased corticosterone levels both immediately after stress exposure (IMO-2h) and at 2 h post-IMO (R-2h) when compared to Vehicle-Controls; (iii) MET reduced the corticosterone response to IMO both after the stressor (IMO-2h) and at 2 h post-IMO (R-2h).

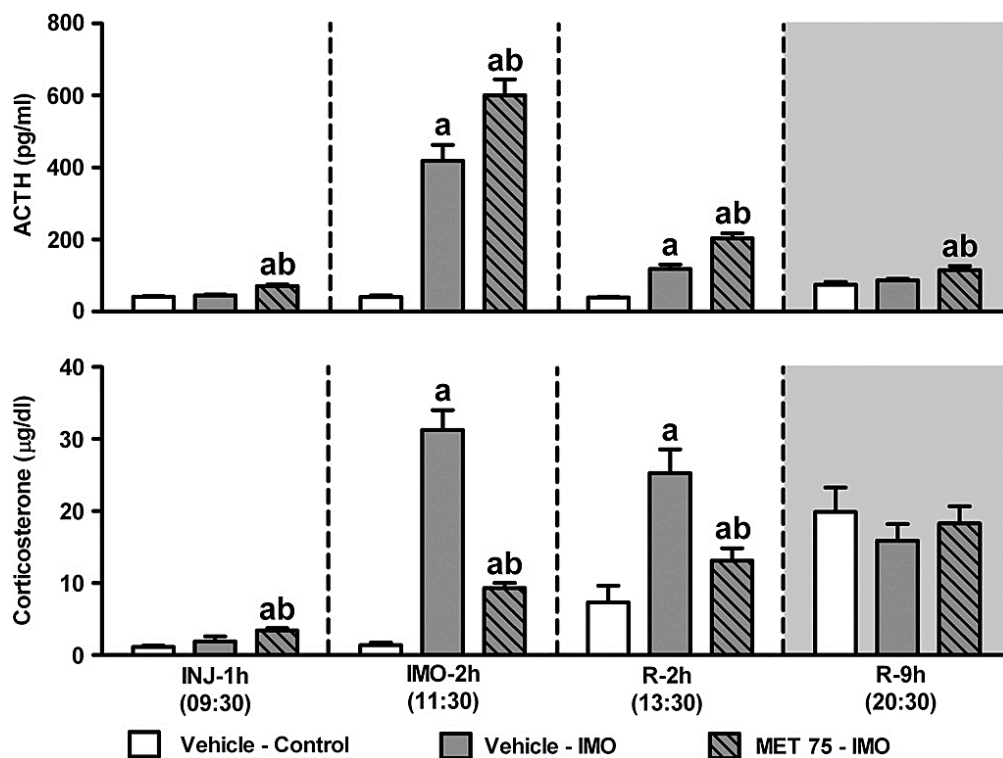


Fig. 3. Effects of MET administration on plasma ACTH and corticosterone levels in response to IMO.

Means \pm SEM ($n=7$ per group) are represented. Rats were treated either with vehicle and non-stressed (Vehicle-Control), with vehicle and immobilized (Vehicle-IMO), or with 75 mg/kg of MET and immobilized (MET 75-IMO). Samples were taken 1 h after injection (INJ-1h; just before IMO), immediately after IMO (IMO-2h) and 2 and 9 h after IMO (R-2h and R-9h; specific times of day are shown in parentheses). Control rats were sampled following the same time schedule as IMO rats. Shadows represent a nocturnal blood sample; a indicates p at least <0.05 vs Vehicle-Control and b indicates p at least <0.05 vs Vehicle-IMO within the same sampling period.

Statistical analysis of resting levels on day 2 (**Fig. 4A**) showed an effect of previous treatment on plasma ACTH (Wald χ^2 (2)= 37.2; *p* b 0.001) and corticosterone (Wald χ^2 (2)=56.5; *p* b 0.001). Post-hoc comparisons revealed that the two groups with previous IMO had higher resting levels of ACTH and corticosterone than the control group. There was no additional effect of MET in IMO rats.

The analysis of the HPA response to the OF three days after treatment (**Fig. 4B**) showed significant effects of previous treatment on plasma ACTH (Wald χ^2 (2)= 24.6; *p* b 0.001) and corticosterone (Wald χ^2 (2)= 39.4; *p* b 0.001). Further analysis revealed that the two groups previously exposed to IMO had higher levels of ACTH and corticosterone than the control group in response to the OF with no effect of MET.

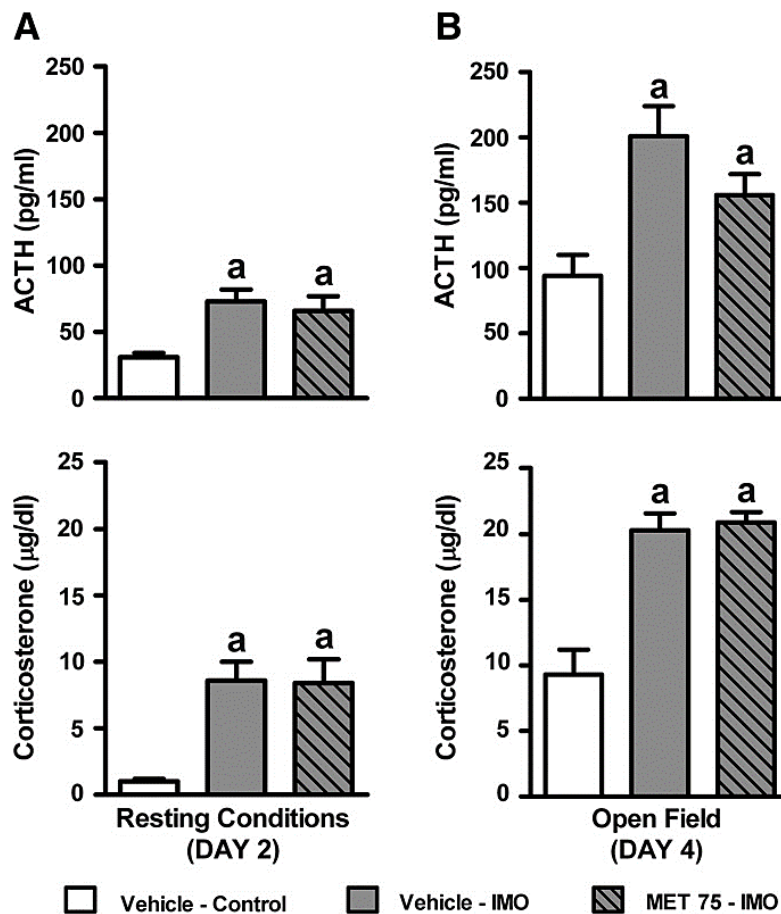


Fig. 4. Effects of prior MET administration and IMO exposure on plasma ACTH and corticosterone levels.

Samples were under resting conditions (day 2; panel A) and after a 15 min open-field exposure on day 4 (panel B). Means±SEM (n=7 per group) are represented. Rats were treated either with vehicle and non-stressed (Vehicle-Control), with vehicle and immobilized (Vehicle-IMO), or with 75 mg/kg of MET and immobilized (MET 75-IMO) on day 1; a indicates *p* at least <0.05 vs Vehicle-Control.

Experiment 3

The GEE analysis of plasma levels of ACTH in response to IMO (Fig. 5) revealed significant effects for sampling time (Wald χ^2 (2)= 458.6; pb 0.001), stress (Wald χ^2 (1)=516.2; pb 0.001) and the inter-action sampling time by stress (Wald χ^2 (2)=576.3; pb 0.001). Similarly, the GEE analysis of plasma levels of corticosterone (Fig. 5) revealed significant effects for sampling time (Wald χ^2 (2)=311.2; pb 0.001), stress (Wald χ^2 (1)=330.4; pb 0.001) and the interaction sampling time by stress (Wald χ^2 (2)=350.3; pb 0.001). There was no effect for mifepristone either on the ACTH or corticosterone response to IMO.

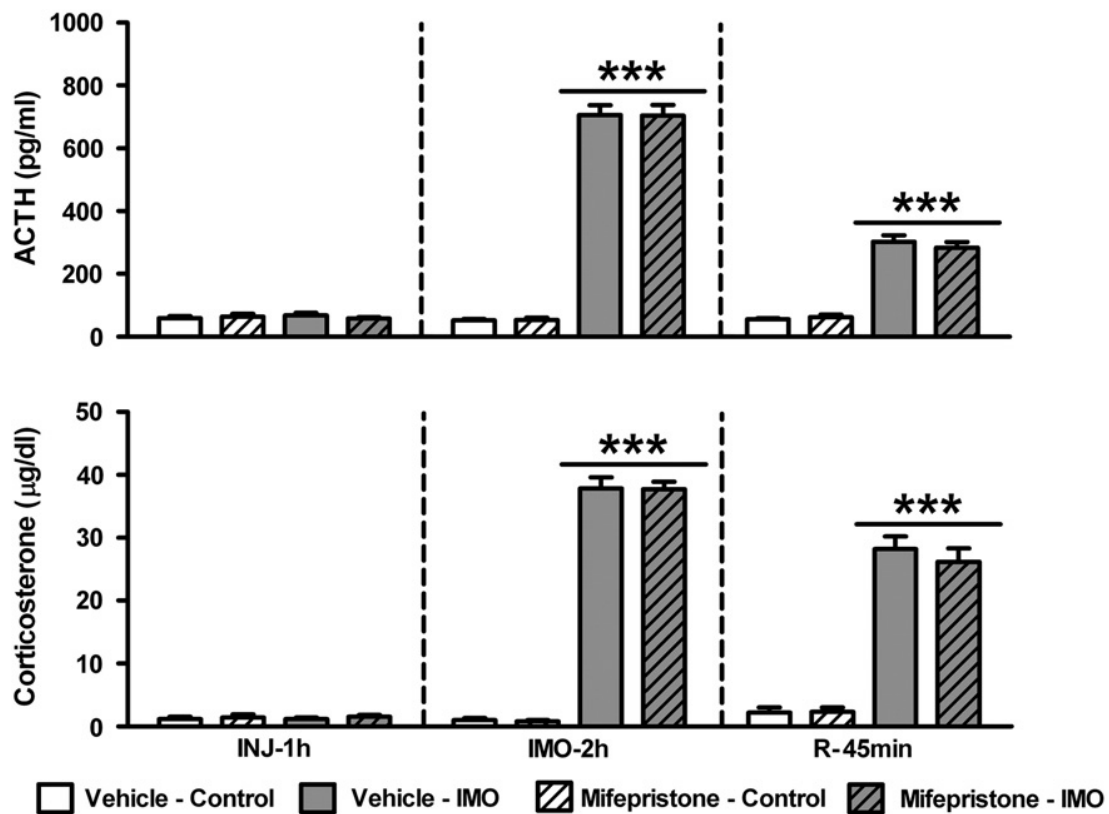


Fig. 5. Effects of mifepristone administration on plasma ACTH and corticosterone levels in response to IMO.

Means \pm SEM (n=10–12 per group) are represented. Samples were taken 1 h after injection (INJ-1h; just before IMO), immediately after IMO (IMO-2h) and 45 min after IMO (R-45min). Control rats were sampled following the same time schedule as IMO rats; ***p<0.001 vs Control groups, regardless of drug treatment.

Statistical analysis of ACTH and behavioral responses to 5 min of exposure to the OF on day 2 showed significant effects for stress on plasma ACTH levels (Fig. 6A; Wald χ^2 (1)=100.2; pb 0.001) and both central (Fig. 6B; Wald χ^2 (1)=6.6; p=0.01) and peripheral (Fig. 6C; Wald χ^2 (1)= 20.0; pb 0.001) ambulation. No effect for mifepristone was found in any case. Thus, prior exposure to IMO increased the ACTH response and reduced the activity in a novel environment, regardless of drug administration. Corticosterone was

not analyzed because a 5 min stress exposure is clearly insufficient for corticosterone to reflect corresponding ACTH release (Gagliano et al., 2008).

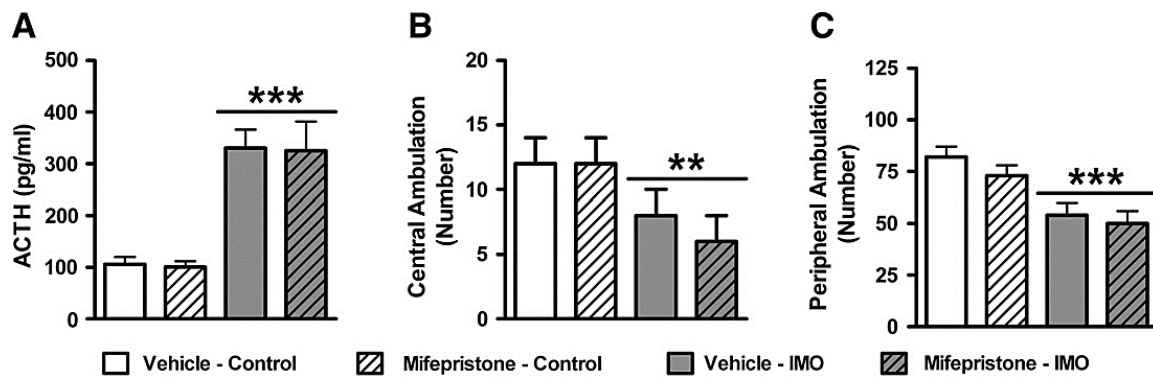


Fig. 6. Effects of prior mifepristone administration and IMO exposure on plasma ACTH levels (A) and central (B) and peripheral (C) ambulation after 5 min open-field exposure.

Control and prior IMO rats were exposed to the open-field the day after IMO. The number of areas crossed was the measure of ambulation. Blood samples were taken immediately after the test. Means \pm SEM ($n=10-12$ per group) are represented; ** $p=0.01$ and *** $p<0.001$ vs Control groups, regardless of drug treatment.

Experiment 4

The GEE analysis of plasma levels of ACTH in response to IMO (Fig. 7) revealed significant effects for sampling time (Wald χ^2 (2)= 247.1; pb 0.001), R121919 (Wald χ^2 (1)=41.6; pb 0.001), stress (Wald χ^2 (1)=502.2; pb 0.001) and the interactions sampling time by R121919 (Wald χ^2 (2)=10.0; pb 0.01), sampling time by stress (Wald χ^2 (2)=162.8; pb 0.001), R121919 by stress (Wald χ^2 (1)=14.6; pb 0.001) and sampling time by R121919 by stress (Wald χ^2 (2)= 8.2; pb 0.05). The decomposition of the triple interaction showed that:(i) IMO induced an increase in ACTH levels respect to control groups at all times studied (pb 0.001 in all cases); (ii) R121919 partially blocked the ACTH response to stress after 30 min and 2 h of IMO (IMO-30min and MO-2h; pb 0,001 in both cases); (iii) R121919 reduced ACTH levels in control animals 3 h after injection (corresponding to sample time IMO-2h; pb 0.001). Regarding corticosterone (Fig. 7), the GEE analysis revealed significant effects for sampling time (Wald χ^2 (2)=63.6; pb 0.001), R121919 (Wald χ^2 (1) = 68.6; p b 0.001), stress (Wald χ^2 (1) =1920.0; p b 0.001) and the interaction R121919 by stress (Wald χ^2 (1) = 57.9; p b 0.01). The decomposition of the interaction indicated that, in contrast to ACTH, IMO-induced increases in plasma corticosterone were not modified by the CRH-R1 antagonist. Nevertheless, R121919 administration significantly reduced plasma corticosterone levels in control rats at all times studied (pb 0.001).

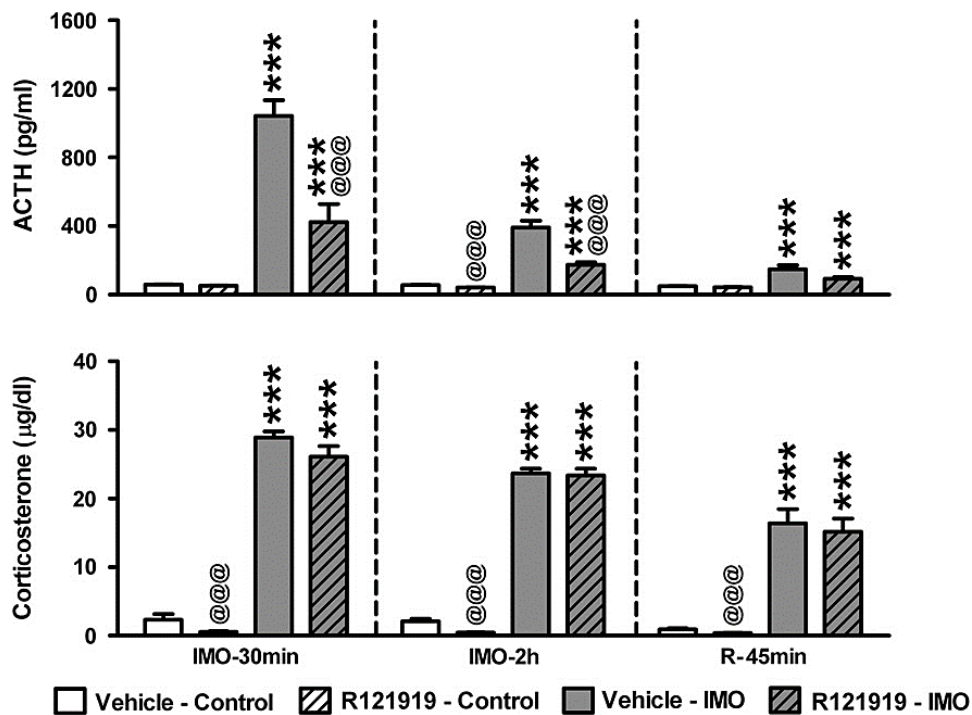


Fig. 7. Effects of R121919 administration on plasma ACTH and corticosterone levels in response to IMO.

Means \pm SEM (n=8–11 per group) are represented. IMO started 1 h after injection. Samples were taken at 30 min of IMO (IMO-30min), immediately after IMO (IMO-2h) and 45 min after IMO (R-45min). Control rats were sampled following the same time schedule as IMO rats; ***p<0.001 vs respective Control group and @@@p<0.001 vs respective Vehicle group within the same sampling period

These results are easily explained taking into account that ACTH levels in R121919-treated IMO rats were considerable reduced but still maintained above those saturating adrenal secretion. In contrast, in control rats the ACTH levels were far above saturation and any reduction in ACTH after R121919 was noted in corticosterone.

Statistical analysis of ACTH and behavioral responses to 5 min of exposure to the OF on day 2 showed significant effects for stress on plasma ACTH levels (**Fig. 8A**; Wald χ^2 (1)=25.5; $p < 0.001$) and both central (**Fig. 8B**; Wald χ^2 (1) = 5.1; $p < 0.05$) and peripheral (**Fig. 8C**; Wald χ^2 (1) = 16.9; $p < 0.001$) ambulation. No effect of R121919 was found in any case. Thus, prior exposure to IMO increased the ACTH response and reduced the activity in a novel environment, regardless of drug administration.

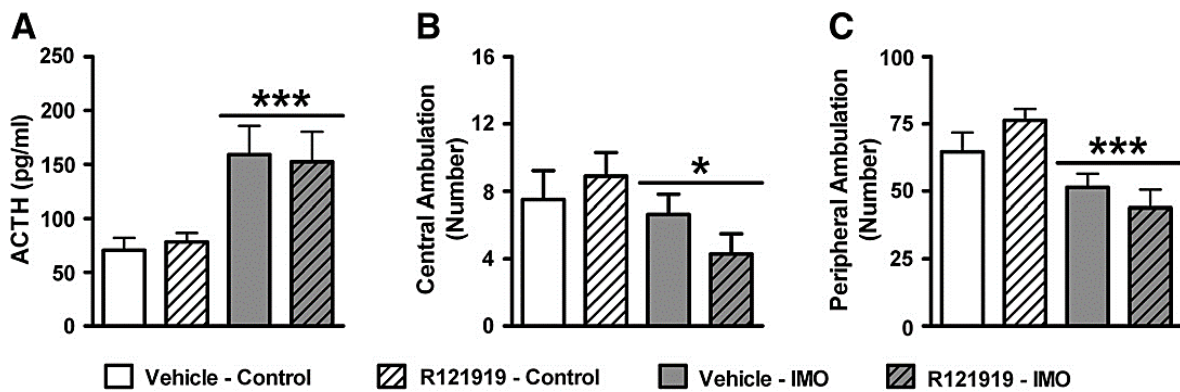


Fig. 8. Effects of prior R121919 administration and IMO exposure on plasma ACTH levels (A) and central (B) and peripheral (C) ambulation after 5 min open-field exposure.

*Control and prior IMO rats were exposed to the open-field the day after IMO. The number of areas crossed was the measure of ambulation. Blood samples were taken immediately after the test. Means \pm SEM (n=8–11 per group) are represented; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs Control groups, regardless of drug treatment.*

Discussion

We have demonstrated in four experiments that neither high levels of stress-induced glucocorticoid release nor GR and CRH-R1 activation is involved in IMO-induced sensitization of the peripheral HPA response to a heterotypic stressor (exposure to a novel environment). In addition, pharmacological activation of the HPA axis with a high dose of MET, which caused marked dysregulation of the HPA axis, had no effect on HPA responsiveness to the heterotypic stressor. Therefore the biological mechanisms involved in the induction of long-lasting sensitization of the HPA axis caused by a single exposure to a severe stressor remain to be characterized.

Exposure of rats to severe stressors such as tail-shock and IMO has been repeatedly reported to induce long-lasting (days to a few weeks) sensitization of the HPA response to other (heterotypic) stressors (see Introduction). Long-lasting HPA sensitization after acute exposure appears to be a characteristic of severe stressors. For instance, restraint, which is clearly less severe than IMO (Campmany et al., 1996; Martí et al., 2001; Rabasa et al., 2011), did not cause sensitization of the HPA response to an additional stressor on the day after in non-treated rats (Wong et al., 2000) or the effects are small (Spiga et al., 2009). However, Wong et al. (2000) demonstrated that blockade of restraint-induced corticosterone release with aminoglutethimide, an inhibitor of glucocorticoid synthesis, did result in sensitization of the HPA response to a further stressor. Therefore, it appears that release of glucocorticoid during stress may act to constrain stress-induced sensitization of the HPA axis.

The idea of stress-induced sensitization is very close to that of facilitation proposed by Dallman and Jones (1973). Long-lasting sensitization may represent in fact a very strong degree of facilitation associated to exposure to severe stressors. The factors other than the intensity of stressors that are involved in stress-induced sensitization are poorly known. Sensitization may be consequence of a strong activation of the HPA axis regardless of the particular factor triggering such activation or may be linked to particular characteristics of the stressors. In addition, on the basis of the apparently constraining role of glucocorticoids, we hypothesized that pharmacological blockade of corticosterone release during exposure to IMO may lead to a greater sensitization of the HPA axis than that observed in non-treated rats. To work with these two hypotheses we used MET.

In a first experiment we tested three different doses of MET. The results confirmed previous data demonstrating that the two lowest doses caused small effects on plasma levels of ACTH and corticosterone over the 24 h after the injection, whereas the highest dose caused a marked dysregulation of the HPA axis (Rotllant and Armario, 2005). Thus, plasma corticosterone levels were maintained higher than in vehicle-treated rats during the light period, but lower during the dark period (11.5 h after injection), in agreement with previous data (Rotllant and Armario, 2005). Despite higher levels of corticosterone in rats treated with 150 mg/kg of MET, plasma ACTH levels greatly increased for 5 h and were still maintained elevated during the dark period. Therefore, the lower corticosterone

levels during the dark period cannot be attributed to lower ACTH levels and are likely to reflect a persistent inhibition of glucocorticoid synthesis at this time. Despite huge activation of the HPA axis caused by the highest dose of MET, resting activity of the HPA axis was normal on the day after, and the response to a novel stressor (exposure to a novel environment) was not altered three days after by any dose of MET. The lack of effect of the highest dose regarding HPA sensitization suggests that a huge activation of the HPA axis is not necessarily followed by long-lasting sensitization to mild stressors. Therefore, the stressful properties of MET are likely to differ from those of IMO and tail-shock that consistently induce HPA sensitization to mild stressors.

In a second experiment, we exposed animals to 2 h of IMO after previous administration of vehicle or a dose of MET that only slightly affect per se the HPA axis on the basis of the preceding experiment. MET administration greatly reduced corticosterone response and enhanced ACTH response to IMO, also delaying the return of ACTH to pre-stress levels. These results were expected on the basis of previous reports (i.e. Akana et al., 1992; Andrés et al., 1999; Dal-Zotto et al., 2003). However, this dysregulation of the HPA response to IMO in MET-treated rats did not result in the increase in resting levels of corticosterone typically observed in the morning of the day after exposure to IMO and other severe stressors (i.e. Fleshner et al., 1995; Martí et al., 1996; Servatius et al., 1995). The mechanisms involved in these increased levels of HPA hormones for some few days after exposure to severe stressors are enigmatic. First, increased plasma levels of corticosterone are often not associated to increased ACTH levels (Martí et al., 1996; Servatius et al., 2001), suggesting either an ACTH-independent regulation or an enhanced sensitivity to circulating ACTH. Second, these changes are unlikely to be a residual effect of prior stress as both plasma ACTH and corticosterone levels were normal in the dark period of the day of stress in the present experiment and others previous experiments (Martí et al., 1996). Third, these stress effects on resting levels of HPA hormones on the day after were not observed after a high dose of MET despite a stronger alteration of the HPA axis than that caused by IMO. The latter results are in accordance with a previous report showing no effect of MET administration prior tail-shocks on resting levels of corticosterone on the day after (Moldow et al., 2001).

When rats previously subjected to IMO were exposed to an OF 3 days after, they showed increased HPA response to the novel environment as compared to stress-naive rats, supporting previous reports on IMO-induced HPA sensitization to heterotypic stressors (i.e. Belda et al., 2008; Gagliano et al., 2008). However, blockade of IMO-induced corticosterone release with MET did not alter the degree of sensitization, suggesting that glucocorticoids released during stress are not critically involved in constraining heterotypic sensitization of the HPA axis. Although the lack of effect of MET suggest that stress-induced activation of GR was unlikely to be involved in IMO-induced sensitization, it should be taken into account that MET reduced IMO-induced corticosterone release, but remaining plasma levels of corticosterone were still enough to bind to MR and probably in part to GR. Therefore, the previous results do not preclude that glucocorticoid could play a permissive role on IMO-induced HPA sensitization as low levels of

corticosterone have been found to be important in adrenalectomized rats for proper responsiveness of the HPA axis to stressors (Tanimura and Watts, 1998). To rule out a role of GR we did another experiment using a high dose of the typical GR antagonist mifepristone prior to IMO. Blockade of GR were unable to affect either the peripheral HPA response to IMO or IMO-induced HPA sensitization as evaluated on the day after the stressor. Thus the results regarding stress-induced HPA sensitization support those observed after MET. Moreover, exposure to IMO resulted in hypoactivity in the OF, in accordance with previous reports using severe stressors (i.e. Kennett et al., 1985). As reduced activity was observed in both peripheral and central areas of the OF, there was no evidence for a specific anxiogenic effect of IMO. Importantly, the effects of IMO were not altered by blockade of GR receptors prior to the stressor, suggesting that IMO-induced hypoactivity does not involve GR.

There is some evidence that prior exposure to acute and chronic stress can induce heterotypic sensitization of the HPA axis in intact animals, but results are not always consistent (see Dallman et al., 1992; Martí and Armario, 1998). Inconsistencies can be in great part explained by the possible constraining effect of glucocorticoids released during stress. Thus, heterotypic sensitization has been observed in adrenalectomized but not intact rats after chronic exposure to IMO (Martí et al., 1994). Also, acute exposure to several short periods of IMO within a day has been found to induce sensitization of the response to the same stressor in adrenalectomized rats maintained with low corticosterone in water (ADX+B) to simulate resting levels, but not in intact rats (Andrés et al., 1999). More important for the present results, exposure to restraint, a stressor of lower intensity than IMO, has been found to induce sensitization to an additional mild stressor on the day after in rats whose glucocorticoid synthesis was inhibited by aminoglutethimide prior to exposure to restraint, but not in rats treated with vehicle (Wong et al., 2000). Taken together, the most plausible interpretation of available data is that stressor-induced sensitization of the HPA axis is related to the intensity and length of exposure to the stressor. Stress-induced glucocorticoid release may be enough to prevent sensitization caused by intermediate intensity stressors, but not that induced by severe stressors such as IMO. Nothing is known about the putative anatomical substrate of acute stress-induced heterotypic sensitization in brain areas other than the PVN where prior tail-shock caused sensitization of *c-fos* response to a superimposed mild stressor (O'Connor et al., 2004). Nevertheless, chronic stress studies strongly suggest an important role for the posterior paraventricular nucleus of the thalamus (Bhatnagar and Dallman, 1998). In this region, it appears that orexin receptors in this region are important for the induction, but not expression, of stress-induced sensitization (Heydendael et al., 2011), whereas cholecystokinin release may play a role to dampen the expression of stress-induced sensitization (Bhatnagar et al., 2000).

Given the negative evidence for a role of stress-induced glucocorticoid release in the long-lasting sensitization of the HPA axis, we then focused on CRH-R1. Activation of central CRH system appears to play an important role in most of the behavioral and physiological consequences of exposure to stress and addictive drugs. However, the role of CRH-R1 in

stress-induced sensitization has not been explored. In the present work, administration of the non-peptide CRH-R1 antagonist R121919 prior to IMO reduced the ACTH response to the stressor, in accordance with previous reports using this drug (Heinrichs et al., 2002; Keck et al., 2001). In contrast to the efficacy of R121919 to reduce the HPA response to IMO, the drug did not modify IMO-induced sensitization of the ACTH response to a novel environment observed on the day after IMO. In addition, R121919 administration did not alter the inhibition of activity in the OF caused by the stressor. Thus, CRH, through the activation of CRH-R1 is unlikely to play an important role in stress-induced sensitization of the HPA axis and hypoactivity in novel environments.

In conclusion, the present data confirm previous results in that prior exposure to IMO is able to induce sensitization of the HPA response to further mild stressors on the days after. In addition, our results indicate that a strong activation of the HPA as that caused by a high dose of MET was unable to induce sensitization, suggesting that the nature of the stimuli is an important factor. IMO-induced endocrine sensitization and hypoactivity were not modified by blunting the corticosterone response to the stressor with a moderate dose of MET or by the blockade of CRH-R1. Therefore, factors other than components of the HPA axis may be involved.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2008-01175 and SAF2011-28313), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0001/0015, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo), Plan Nacional sobre Drogas and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16).

References

- Akana, S.F., Dallman, M.F., 1997. Chronic cold in adrenalectomized, corticosterone (B)-treated rats: facilitated corticotropin responses to acute restraint emerge as B increases. *Endocrinology* 138, 3249–3258.
- Akana, S.F., Dallman, M.F., Bradbury, M.J., Scribner, K.A., Strack, A.M., Walker, C.D., 1992. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology* 131, 57–68.
- Akana, S.F., Hanson, E.S., Horsley, C.J., Strack, A.M., Bhatnagar, S., Bradbury, M.J., Milligan, E.D., Dallman, M.F., 1996. Clamped corticosterone (B) reveals the effect of endogenous B on both facilitated responsiveness to acute restraint and metabolic responses to chronic stress. *Stress* 1, 33–49.
- Andrés, R., Martí, O., Armario, A., 1999. Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. *Am. J. Physiol.* 277, R863–R868.
- Belda, X., Márquez, 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., Fuentes, S., Nadal, R., Armario, A., 2008. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary–adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Horm. Behav.* 54, 654–661.
- Bhatnagar, S., Dallman, M., 1998. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic–pituitary–adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84, 1025–1039.
- Bhatnagar, S., Viau, V., Chu, A., Soriano, L., Meijer, O.C., Dallman, M.F., 2000. A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic–pituitary–adrenal function. *J. Neurosci.* 20, 5564–5573.
- Calvo, N., Volosin, M., 2001. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. *Neuroendocrinology* 73, 261–271.
- Campmany, L., Pol, O., Armario, A., 1996. The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 517–523.
- Cassano, W.J., D'Mello, A.P., 2001. Acute stress-induced facilitation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: evidence for the roles of stressor duration and serotonin. *Neuroendocrinology* 74, 167–177.
- Dallman, M.F., Jones, M.T., 1973. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92, 1367–1375.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Schribner, K.A., Bradbury, M.J., Walker, C.D., Strack, A.M., Cascio, C.S., 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* 4, 517–526.
- 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.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19, 269–301.
- De Souza, E.B., Van Loon, G.R., 1982. Stress-induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a nonadrenocorticotropin-mediated mechanism. *Endocrinology* 110, 23–33.
- Dunn, A.J., Berridge, C.W., 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.* 15, 71–100.
- Engeland, W.C., Miller, P., Gann, D.S., 1989. Dissociation between changes in plasma bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin after hemorrhage in awake dogs. *Endocrinology* 124, 2978–2985.
- Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* 136, 5336–5342.
- Gagliano, H., Fuentes, S., Nadal, R., Armario, A., 2008. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary–adrenal responses. *Behav. Brain Res.* 187, 239–245.
- García, A., Armario, A., 2001. Individual differences in the recovery of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague–Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 363–374.
- Graessler, J., Kvetnansky, R., Jezova, D., Dobrakovova, M., Van Loon, G.R., 1989. Prior immobilization stress alters adrenal hormone responses to hemorrhage in rats. *Am. J. Physiol.* 257, R661–R667.

- Hardin, J.W., Hilbe, J.M., 2003. *Generalized Estimating Equations*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.
- Heinrichs, S.C., De Souza, E.B., Schulteis, G., Lapsansky, J.L., Grigoriadis, D.E., 2002. Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharmacology* 27, 194–202.
- Heydendael, W., Sharma, K., Iyer, V., Luz, S., Piel, D., Beck, S., Bhatnagar, S., 2011. Orexins/hypocretins act in the posterior paraventricular thalamic nucleus during repeated stress to regulate facilitation to novel stress. *Endocrinology* 152, 4738–4752.
- Jenkins, J.S., Meakin, J.W., Nelson, D.H., Thorn, G.W., 1958. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* 128, 478–480.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2002. Prior stressor exposure primes the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 27, 353–365.
- Keck, M.E., Welt, T., Wigger, A., Renner, U., Engelmann, M., Holsboer, F., Landgraf, R., 2001. The anxiolytic effect of the CRH(1) receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats. *Eur. J. Neurosci.* 13, 373–380.
- Keller-Wood, M.E., Dallman, M.F., 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5, 1–24.
- Keller-Wood, M.E., Shinsako, J., Dallman, M.F., 1983. Inhibition of the adrenocorticotropin and corticosteroid responses to hypoglycemia after prior stress. *Endocrinology* 113, 491–496.
- Kennett, G.A., Dickinson, S.L., Curzon, G., 1985. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res.* 330, 253–263.
- Kvetnansky, R., Mikulaj, L., 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87, 738–743.
- Le Mevel, J.C., Abitbol, S., Beraud, G., Maniey, J., 1979. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinology* 105, 812–817.
- Lilly, M.P., DeMaria, E.J., Bruhn, T.O., Gann, D.S., 1989. Potentiated cortisol response to paired hemorrhage: role of angiotensin and vasopressin. *Am. J. Physiol.* 257, R118–R126.
- Martí, O., Armario, A., 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 241–260.
- Martí, O., Gavalda, A., Gómez, F., Armario, A., 1994. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology* 60, 1–7.
- Martí, O., Gavalda, A., Jolín, T., Armario, A., 1996. Acute stress attenuates but does not abolish circadian rhythmicity of serum thyrotrophin and growth hormone in the rat. *Eur. J. Endocrinol.* 135, 703–708.
- Martí, O., Andrés, R., Armario, A., 1999. Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *Am. J. Physiol.* 277, R869–R877.
- Martí, O., García, A., Vallés, A., Harbuz, M.S., Armario, A., 2001. Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis that consolidate with time. *Eur. J. Neurosci.* 13, 129–136.
- McCulloch, C., Searle, S., 2001. *Generalized, Linear and Mixed Models*. John Wiley & Sons, New York.
- Moldow, R.L., Beck, K.D., Zhu, G., Beldowicz, D., Brennan, F.X., Ottenweller, J.E., Servatius, R.J., 2001. Pharmacological suppression of corticosterone secretion in response to a

- physical stressor does not prevent the delayed persistent increase in circulating basal corticosterone concentration. *Stress* 4, 137–141.
- Moldow, R.L., Beck, K.D., Weaver, S., Servatius, R.J., 2005. Blockage of glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptors prevents the persistent increase in circulating basal corticosterone concentrations following stress in the rat. *Neurosci. Lett.* 374, 25–28.
- Muñoz-Abellán, C., Andero, R., Nadal, R., Armario, A., 2008. Marked dissociation between hypothalamic–pituitary–adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1139–1150.
- Muñoz-Abellán, C., Rabasa, C., Daviu, N., Nadal, R., Armario, A., 2011. Behavioral and endocrine consequences of simultaneous exposure to two different stressors in rats: interaction or independence? *PLoS One* 6, e21426.
- O'Connor, K.A., Johnson, J.D., Hammack, S.E., Brooks, L.M., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2003. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 28, 481–500.
- O'Connor, K.A., Ginsberg, A.B., Maksimova, E., Wieseler Frank, J.L., Johnson, J.D., Spencer, R.L., Campeau, S., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2004. Stress-induced sensitization of the hypothalamic–pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology* 80, 252–263.
- Rabasa, C., Delgado-Morales, R., Munoz-Abellan, C., Nadal, R., Armario, A., 2011. Adaptation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav. Brain Res.* 217, 232–239.
- Rainnie, D.G., Bergeron, R., Sajdyk, T.J., Patil, M., Gehlert, D.R., Shekhar, A., 2004. Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *J. Neurosci.* 24, 3471–3479.
- Rotllant, D., Armario, A., 2005. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Neuroscience* 130, 427–434.
- Rotllant, D., Ons, S., Carrasco, J., Armario, A., 2002. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary–adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur. J. Neurosci.* 16, 693–700.
- Saal, R.L., Dong, Y., Bonci, A., Malenka, R.C., 2003. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37, 577–582.
- Sarnyai, Z., Shaham, Y., Heinrichs, S.C., 2001. The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol. Rev.* 53, 209–243.
- Servatius, R.J., Ottenweller, J.E., Natelson, B.H., 1995. Delayed startle sensitization distinguishes rats exposed to one or three stress sessions: further evidence toward an animal model of PTSD. *Biol. Psychiatry* 38, 539–546.
- Servatius, R.J., Brennan, F.X., Moldow, R., Pogach, L., Natelson, B.H., Ottenweller, J.E., 2001. Persistent hormonal effects of stress are not due to reduced food intake or exposure to stressed rats. *Endocrine* 14, 181–187.
- Servatius, R.J., Beck, K.D., Moldow, R.L., Salameh, G., Tumminello, T.P., Short, K.R., 2005. A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity. *Biol. Psychiatry* 57, 865–872.
- Spiga, F., Harrison, L.R., MacSweeney, C.P., Thomson, F.J., Craighead, M., Lightman, S.L., 2009. Effect of vasopressin 1b receptor blockade on the hypothalamic–pituitary–adrenal response of chronically stressed rats to a heterotypic stressor. *J. Endocrinol.* 200, 285–291.
- Tanimura, S.M., Watts, A.G., 1998. Corticosterone can facilitate as well as inhibit corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139, 3830–3836.

- Vahl, T.P., Ulrich-Lai, Y.M., Ostrander, M.M., Dolgas, C.M., Elfers, E.E., Seeley, R.J., D'Alessio, D.A., Herman, J.P., 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E823–E828.
- Van Dijken, H.H., de Goeij, D.C., Sutanto, W., Mos, J., de Kloet, E.R., Tilders, F.J., 1993. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain–pituitary–adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58, 57–64.
- Weinberg, M.S., Grissom, N., Paul, E., Bhatnagar, S., Maier, S.F., Spencer, R.L., 2010. Inescapable but not escapable stress leads to increased struggling behavior and basolateral amygdala c-fos gene expression in response to subsequent novel stress challenge. *Neuroscience* 170, 138–148.
- Wong, Y.N., Cassano, W.J., D'Mello, A.P., 2000. Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Neuroendocrinology* 71, 354–365.
- Zelena, D., Mergl, Z., Foldes, A., Kovacs, K.J., Toth, Z., Makara, G.B., 2003. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary–adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1110–E1117.

Artículo 3.

The stressor characteristics determine the induction and expression of heterotypic sensitization of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in adult male rats

Xavier Belda, Roser Nadal and Antonio Armario

(En revisión)

Abstract

It is well-established that under certain conditions prior exposure to acute and chronic stressors results in enhanced hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) response (i.e. plasma levels of ACTH and corticosterone) to novel (heterotypic) challenging stressors when assessed on the days following such an exposure. However, the results are very often controversial and the factors determining results are unclear. The present work focuses on the identification of the characteristics of both triggering and challenging stressors that affect acute stress-induced HPA cross-sensitization in adult male rats. Our results indicate that HPA cross-sensitization depends on the intensity of the triggering stressor, whereas the length of exposure mainly affects the perdurability of the effect. For instance, a brief (5 min) exposure to immobilization (IMO), a severe stressor, was enough to induce nearly maximum heterotypic sensitization on the day after, but how long sensitization lasted was depended of the length of exposure to IMO. Importantly, the expression of HPA sensitization was partially dependent on the intensity of the challenging stressor (better observed with mild stressors), but more strongly dependent on the duration of the challenging stressor (better detected with short exposures). Heterotypic HPA sensitization might have developed to optimize biologically adaptive processes when further encountering brief stressors.

Introduction

Exposure to acute stress elicits immediate behavioral and physiological alterations. Typical behavioral changes are reduced activity and enhanced anxiety, particularly with relatively severe stressors (Armario et al., 2008; Wiedenmayer, 2004). The prototypical physiological changes are the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and certain components of the autonomous nervous system (Herman et al., 2003). The activation of the latter mainly affects its sympathetic branch with important cardiovascular changes and the release of noradrenaline and adrenaline to the bloodstream.

Stress-induced activation of the HPA axis is the result of the convergence of brain processing into the medial parvocellular subdivision of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (mpdPVN) where neurons synthesizing the corticotropin-releasing hormone (CRH) and other ACTH secretagogues (v.g. vasopressin) are located (Armario, 2006). CRH is considered the main hypothalamic stimulatory factor controlling both the synthesis and release of ACTH by corticotrope cells of the anterior pituitary. In turn, ACTH controls the synthesis and secretion of glucocorticoids (cortisol in humans and most mammals, corticosterone in rats and mice) from the adrenal cortex. Stress-induced glucocorticoid release exerts a wide range of central and peripheral action, including mobilization of resources, modulation of immune function and negative feedback (Frank et al., 2013; Sapolsky et al., 2000).

Although all the above changes, when present, are likely to be transient after mild stressors, exposure to severe stressors can leave a trace that last for several days or weeks (Armario et al., 2008; Belda et al., 2015). The long-lasting behavioral effects of severe stressors are reminiscent of behavioral alterations observed in humans exposed to traumatic experiences. There are initially prominent behavioral perturbations that vanish over days or weeks in most subjects, whereas in particularly susceptible people those perturbations persist for a long-time and can lead to post-traumatic stress disorders and/or depression (Davidson et al., 2004). Long-lasting stress-induced neurobiological alterations have been described in humans, although the results are still inconclusive (Bonne et al., 2004; Olf et al., 2005; Stam, 2007). In animals, it is well-known that a prior history of acute stress can induce sensitization of certain behavioral and physiological responses to novel (heterotypic) stressors applied on the following days and this has been particularly well-characterized regarding the HPA axis (Belda et al., 2015). Unfortunately the characteristics of the triggering stressors determining the magnitude and duration of stress-induced heterotypic HPA sensitization have not been studied and several other critical questions remain to be answered.

A major contribution of the severity of the triggering stressor is likely as HPA sensitization has been mainly reported after exposure to immobilization on boards (IMO) or electric tail-shock protocols typical of the classical learned helplessness procedure (Belda et al., 2008, 2012; Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003, 2004). However, there are no studies directly demonstrating such hypothesis. In addition, careful inspection of published data strongly suggest that acute stress-induced HPA sensitization could not only be dependent on the intensity and/or length of the triggering stressor, but also on the duration of the heterotypic stressor in that it appears to be better observed with a short-exposure to the stressor (Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003).

Therefore, the experiments discussed in the present work were designed to specifically demonstrate that: (i) acute stress-induced HPA sensitization is only observed with severe triggering stressors; (ii) more prolonged exposure to the acute triggering stressor might potentiate HPA sensitization; and (iii) that duration of exposure to the challenging stressor might be critical to detect HPA sensitization.

Materials and Methods

Animals and procedures

Male Sprague-Dawley rats from the Animal Facility of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) were used. They were 2-3 months old at the beginning of the experiments. They were housed in pairs under standard conditions of temperature (21 ± 1 °C), lighting cycle (lights on 07:00-19:00 h), and food and water ad libitum. All animals were habituated to handling (at least three times) and blood-sampling (one time) by the tail-nick procedure (Belda et al., 2012) prior to the experiments, which were always carried out in the morning. The cage-mates were always tested simultaneously. The experi-

mental protocol was approved by the Committee of Ethics of the Universitat Autònoma de Barcelona and the Generalitat de Catalunya and was carried out in accordance to the European Communities Council Directive (2010-63-UE) and Spanish legislation (RD 53/2013).

Experimental designs

Experiment 1

	Triggering Stressor(s)	Challenging Stressor(s)
Exp. 1	Forced Swim (30 min) Foot-shocks (30 min) IMO (30 min)	Open Field (15 min)
Exp. 2	IMO (2 h)	Open Field (5 min) Forced Swim (5 min) Forced Swim (30 min)
Exp. 3	IMO (5 min) IMO (30 min) IMO (4 h) Corticosterone	Open Field (5 min)
Exp. 4	IMO (15 min) IMO (2h)	Forced Swim (10 min) 2 or 7 days later

Table 1. Scheme of triggering and challenging stressors used in the experimental procedures.

The aim was to demonstrate that the intensity of the initial TRIGGERING STRESSOR could be critical to observe cross-sensitization of the HPA axis to superimposed novel stressors. On day 1, animals were assigned to four groups (10 rats per group): CONTROL, maintained in their home cages; SWIM, rats were subjected to forced swim for 30 min, allocating them individually in transparent cylindrical plastic tanks (height = 40 cm, internal diameter = 19 cm) containing water (36°C) to a level of 24 cm (Dal-Zotto et al., 2000); SHOCK, rats were placed in shock chambers consisting of clear Plexiglas boxes (57 x 41 x 70 cm) with a metal removable grid floor of 44 stainless steel rods (0.4 cm diameter) spaced 1.5 cm center to center (Daviu et al., 2012), where they received one 3 s, 1.0 mA, foot-shock each min for 30 min; and IMO for 30 min, consisting of taping the four rat limbs to metal mounts attached to a board, as described previously (Belda et al., 2012). These stressors were chosen on the basis of prior data suggesting that they differ in intensity as evaluated by various stress markers (Márquez et al., 2002; Rabasa et al., 2015). Body weight changes on the next 24 h were measured to confirm differences between the stressors (Martí et al., 1994). On day 2, all the animals were individually in-

roduced into an open field (OF) for 15 min and blood sampled immediately after the test. The OF was a plastic gray rectangular box (56 x 36.5 x 31 cm) opened at the top, where each animal was initially placed facing a corner. The apparatus was cleaned carefully between animals with tap water containing ethanol (5% v/v). OF behavior was videotaped from the top by a video camera (Sony SSC-M388 CE, BW) situated 150 cm above the center of the cage. The box was divided into 12 areas (10 of them in contact with the walls and 2 in the center of the box) and the number of areas crossed (peripheral and central) was manually estimated (Belda et al., 2012).

Experiment 2

We tested how the characteristics of the novel CHALLENGING STRESSOR (intensity and duration) could affect HPA cross-sensitization. On day 1, animals were assigned to two groups: CONTROL (n=26) and IMO for 2 h (n=26). On day 2, rats from each group were exposed to either an OF for 5 min (n=9), or SWIM for 5 min (n=9), or SWIM for 30 min (n=8). Blood samples were taken immediately after the stressor (END) and again 30 min later (R30). The latter time point was added because sampling immediately after 5 min stress cannot assess actual corticosterone response.

Experiment 3

In addition to its severity, the LENGTH of exposure to the TRIGGERING STRESSOR might be important to determine HPA cross-sensitization. Thus, we studied the influence of the duration of the initial triggering stressor, and compared the effects of prior prolonged exposure to IMO with an exogenous corticosterone administration schedule mimicking release of corticosterone during prolonged IMO. On day 1, rats were not stressed (CONTROL, n=10) or subjected to 5 min, 30 min or 4 h of IMO (n=8 per group); an additional group was administered 5 mg/kg corticosterone (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) at time 0 and 2 h later (B[5+5]; n=8). The dose and times of injection were chosen on the basis of previous pilot studies (Belda and Armario, unpublished). Blood samples were taken in all groups to compare plasma levels of ACTH and corticosterone. On day 2, all animals were exposed to the optimum conditions to detect cross-sensitization (5 min OF) and blood samples were obtained immediately after stressor (END) and at R30. OF behavior was videotaped. Only the first 4 minutes of behavior were analyzed because for 4 rats the video camera inadvertently stopped before 5 min. An additional cohort of rats was studied (excluding the 30 min IMO group) to know how the day 1 treatments affect to resting levels of ACTH and corticosterone on day 2 (n=6 per group).

Experiment 4

Although previous data suggest that length of the triggering stressor could be relevant for the magnitude of HPA cross-sensitization of the HPA axis, we wanted to demonstrate that it could be also relevant for the DURATION of the phenomenon. Twenty four rats were subjected to IMO for 15 min or 2 h, either 2 or 7 days (n=6 per group)

before being subjected, together with an additional control group (n=6) to 10 min SWIM. One blood sample was obtained immediately after SWIM. Note that sub-optimal conditions of the heterotypic stressor were chosen (SWIM instead of OF, and 10 min instead of 5 min) to better detect group differences

Radioimmunoassays

Plasma ACTH and corticosterone levels were analyzed by radioimmunoassay as previously described (Rabasa et al., 2011). All samples to be statistically compared were processed in the same assay to avoid inter-assay variability.

Statistical analysis

The statistical package for social science (SPSS) program was used (version 18 for Windows). Statistical analysis was made using the generalized linear model (GzLM; McCulloch and Searle, 2001). The between-subjects factor was either day 1 or day 2 treatments. When more than one blood sample was included in the analysis, TIME was the within-subjects factor and we used the generalized estimating equations (GEE) model (Hardin and Hilbe, 2003). These models are a more flexible statistical tool than the standard general linear model (GLM) because several types of distribution and different covariance structures of the repeated measures data could be chosen. In addition, the generalized linear model does not require homogeneity of variances and admit missing values without removing all data subject. The significance of the effects was determined by the Wald chi-square statistic (X^2). After the main analysis, appropriate pair-wise comparisons were done using the sequential Bonferroni corrections. The criterion for significance was set at $p < 0.05$.

Results

Experiment 1

The GzLM analysis of changes in body weight from day 1 to day 2 (**Fig. 1A**) showed significant TRIGGERING STRESSOR effect ($X^2(3)=33.6$; $p<0.001$) in that SHOCK and IMO significantly reduced body weight, the strongest effect observed after IMO. To evaluate cross-sensitization of the HPA axis, we measured plasma ACTH (**Fig. 1B**) and corticosterone (**Fig. 1C**) levels immediately after 15 min OF on day 2. Statistical analysis of day 2 data showed effect of TRIGGERING STRESSOR on ACTH ($X^2(3)=17.4$; $p=0.001$) and corticosterone ($X^2(3)=14.9$; $p=0.002$). Post-hoc comparisons of ACTH levels revealed that prior foot-shock tended to increase the response to the OF, but the effect was only significant after prior IMO. Post-hoc comparisons of corticosterone levels revealed that both prior foot-shock and IMO increased to the same extent the response to the OF.

Statistical analysis of OF behavior showed significant effects of TRIGGERING STRESSOR on peripheral ambulation (**Fig. 1D**; $X^2(3)=63.1$; $p<0.001$), central ambulation (**Fig. 1E**; $X^2(3)=27.0$; $p<0.001$) and rearings (**Fig. 1F**; $X^2(3)=57.0$; $p<0.001$). Whereas prior SWIM had no effect, prior IMO reduced both peripheral and central ambulation, but not rearing, and SHOCK had the highest impact, markedly decreasing all behaviors.

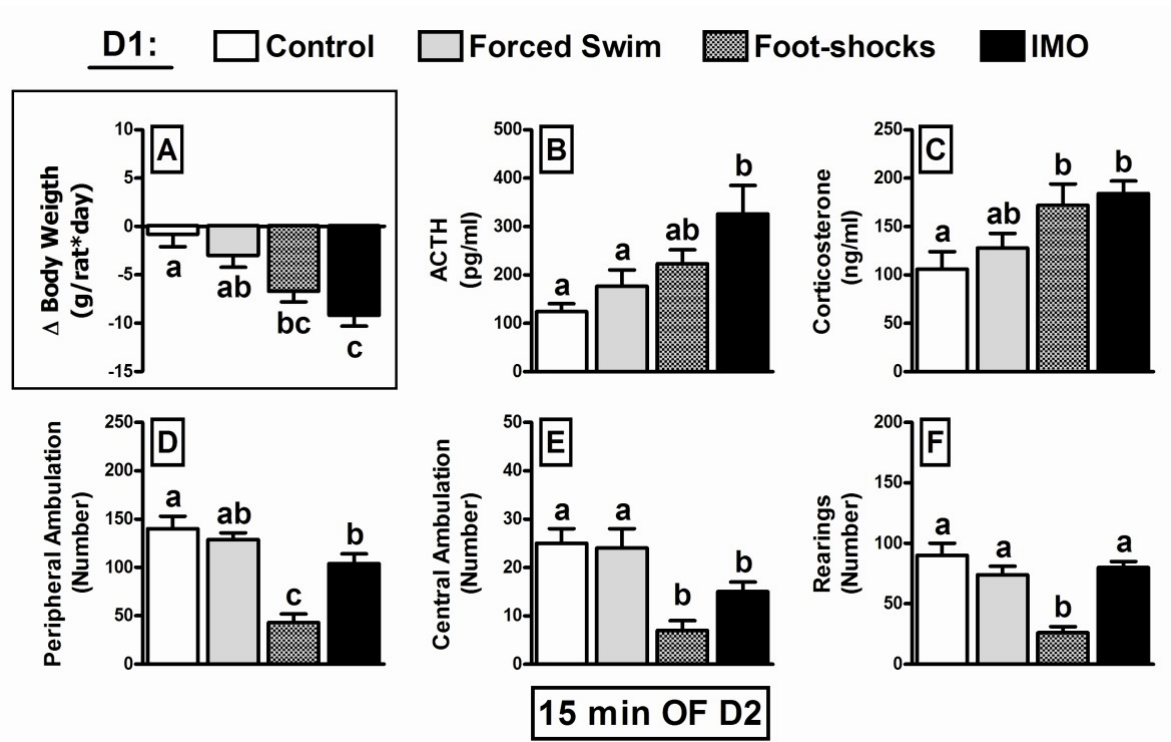


Fig. 1. Influence of prior exposure to various stressors for 30 min on HPA and behavioral response to a 15 min open-field on the day after.

Means and SEM ($n=10$ per group) are represented. Groups labelled with different letters differ statistically. The intensity of the triggering stressors was evaluated by body weight changes (A). The magnitude of ACTH and corticosterone cross-sensitization (B, C) paralleled body weight changes. Inhibition of OF activity followed a different pattern (D, E, F) in that prior SHOCK profoundly decreased activity due to cognitive generalization, a phenomenon associated to contextual fear conditioning rather than to the intensity of the stressor (see text).

Experiment 2

Statistical analysis of the different CHALLENGING STRESSOR conditions on day 2 was done separately because differences in stress exposure time did not allow appropriate comparisons between the three conditions.

The GEE analysis of ACTH response to the 5 min OF (**Fig. 2A**) showed significant effect of PRIOR IMO ($X^2(1)=87.6$; $p<0.001$), TIME ($X^2(1)=53.2$; $p<0.001$) and their interaction ($X^2(1)=9.6$; $p=0.002$). Prior exposure to IMO increased the ACTH response at the two times ($p<0.001$ in both cases). Regarding corticosterone response (**Fig. 2B**), the GEE analysis showed only significant effect of PRIOR IMO ($X^2(1)=21.7$; $p<0.001$), with an overall higher response in rats previously exposed to IMO.

The analysis of the ACTH response to 5 min SWIM (**Fig. 2A**), showed significant effect of PRIOR IMO ($X^2(1)=15.5$; $p<0.001$), TIME ($X^2(1)=212.6$; $p<0.001$) and their interaction ($X^2(1)=14.2$; $p<0.001$). Prior exposure to IMO increased the ACTH response only immediately after SWIM (END; $p<0.001$). Regarding corticosterone (**Fig. 2B**), the GEE analysis showed only significant effect of TIME (Wald $X^2(1)=21.7$; $p<0.001$), with no evidence for cross-sensitization.

Finally, the GEE analysis of ACTH response to 30 min SWIM (**Fig. 2A**) showed only significant effect of TIME ($X^2(1)=250.6$; $p<0.001$), but not PRIOR IMO. Regarding corticosterone response (**Fig. 2B**), the analysis showed significant effect of PRIOR IMO ($X^2(1)=4.7$; $p=0.031$) and TIME (Wald $X^2(1)=7.5$; $p=0.006$), indicating mild cross-sensitization.

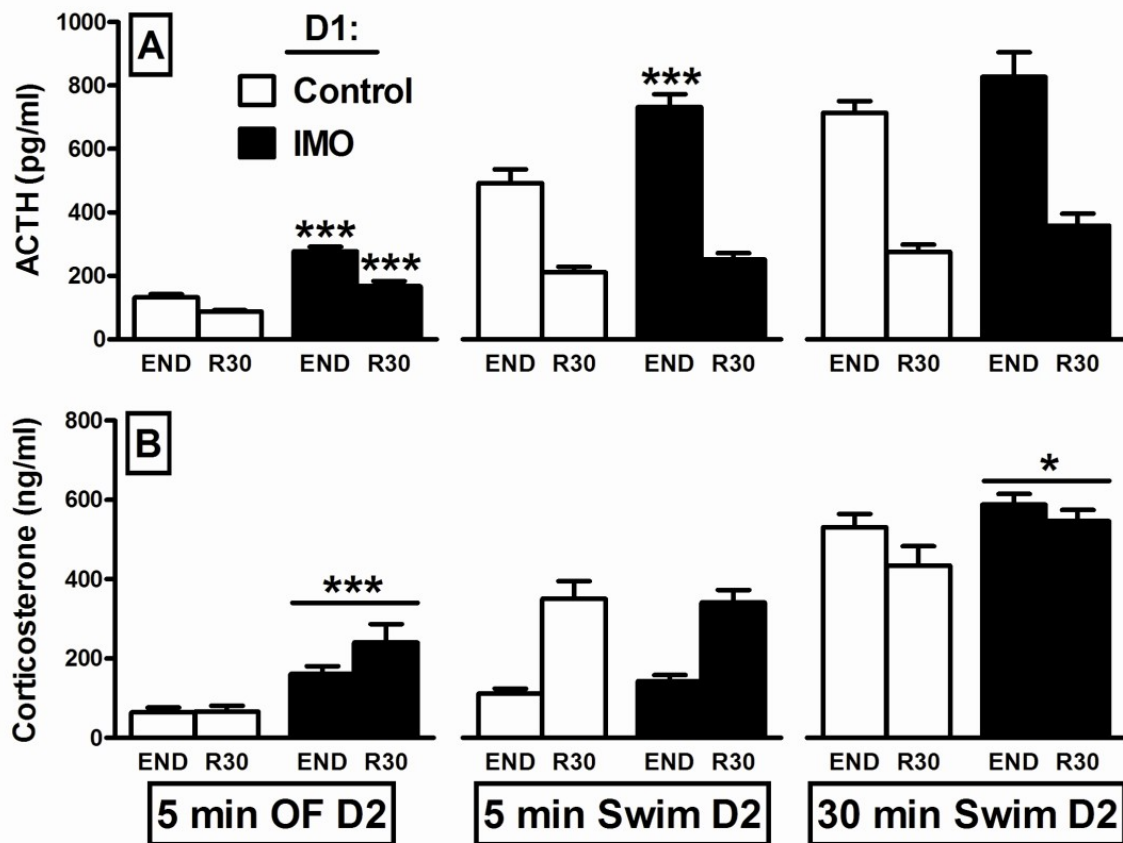


Fig. 2. IMO-induced HPA cross-sensitization is dependent on the characteristics of the challenging stressors.

Means and SEM ($n=8-9$ per group) of plasma levels of ACTH (A) and corticosterone (B) are represented.

Rats exposed to 2 h IMO were exposed the day after to 5 min open-field (OF) or to 5 or 30 min forced swim (SWIM) and blood sampled just after the stressors (END) and again 30 min later (R30).

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus respective control times.

Experiment 3

The statistical analysis of resting hormone levels on day 2 showed effect of LENGTH of prior IMO exposure on plasma ACTH (**Fig. 3A**; $X2(3)=43.6$; $p<0.001$) and corticosterone (**Fig. 3B**; $X2(3)=30.5$; $p<0.001$). The 4 h IMO group had higher resting levels of both hormones than the other groups. Exposure to 5 min IMO increased resting levels of corticosterone but not ACTH. Administration of exogenous corticosterone had no effect on resting hormonal levels.

The GEE analysis of ACTH response to 5 min OF on day 2 (**Fig. 3C**) showed significant effect of LENGTH of prior IMO ($X2(4)=298.5$; $p<0.001$), TIME ($X2(1)=45.3$; $p<0.001$) and their interaction ($X2(4)=54.1$; $p<0.001$). The various lengths of prior IMO quite similarly increased the ACTH response to the OF at both END and R30; in contrast, prior corticosterone administration deeply inhibited the OF ACTH response. The analysis of corticosterone response (**Fig. 3D**), showed significant effect of LENGTH of prior IMO ($X2(4)=316.7$; $p<0.001$), TIME ($X2(1)=15.1$; $p<0.001$) and their interaction ($X2(4)=38.0$; $p<0.001$). All prior IMO groups had higher levels of corticosterone at END, the effect being greater in the 4 h IMO group; at R30, prior exposure to 30 and 4 h IMO significantly increased corticosterone response, but the 5 min IMO group did not. Prior corticosterone administration did not affect corticosterone response to the OF at END, but profoundly inhibited it at R30.

The statistical analysis of the impact of LENGTH of IMO on OF behavior only showed significant effect of peripheral ambulation (**Fig. 3E**; $X2(3)=15.9$; $p=0.003$) in that previous exposure to 4 h of IMO markedly decreased it. No significant effect was found on central ambulation or rearing activity (**Figs. 3F and 3G**, respectively).

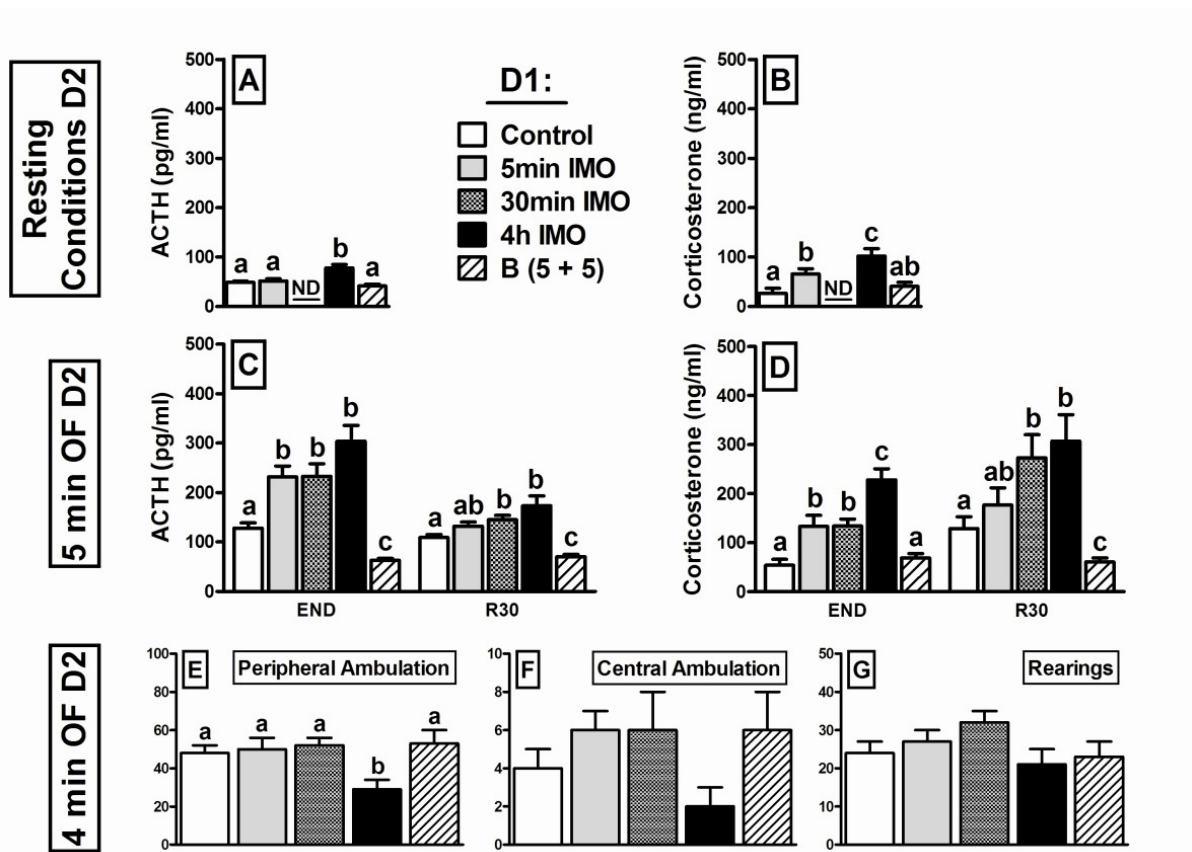


Fig. 3. Prior exposure to different IMO periods or to corticosterone [B(5+5)] administration influences HPA and behavioral responses to a 5 min open-field (OF) on the day after.

Means and SEM are represented. Groups labelled with different letters differ statistically. Panels A and B showed resting ACTH and corticosterone levels ($n=6$ per group; ND, no data for this group) and Panels C and D the hormonal response to the OF ($n=8-10$ per group). Blood samples were taken just after the stressor (END) and again 30 min later (R30). Only 4 h IMO resulted in reduced activity in the next day OF activity (Panels E-G).

Experiment 4

To evaluate whether prior IMO exposure actually caused HPA cross-sensitization, we analyzed the data including only the factor prior IMO, which was significant for both ACTH ($X^2(4)=27.7$; $p=0.001$) and corticosterone ($X^2(4)=22.0$; $p<0.001$). Post-hoc analysis showed that prior IMO exposure always induced cross-sensitization of the response of both hormones, except 15 min IMO exposure when tested 7 days later (Figs. 4A and 4B). These results indicate that longer prior IMO exposure translates into longer duration of cross-sensitization. This conclusion was further supported by the analysis that excluded controls to focus on the effects of factors IMO LENGTH and DAYS elapsed between stressors. The GEE analysis of ACTH and corticosterone showed significant effect of IMO LENGTH ($X^2(1)=9.4$; $p=0.002$; $X^2(1)=6.8$; $p=0.009$; respectively) and DAYS ($X^2(1)=7.8$; $p=0.005$; $X^2(1)=5.0$; $p=0.026$; respectively), but not of their interaction, indicating that duration of prior IMO affected both the magnitude and the duration of cross-sensitization.

Previous treatment:

□ Control ■ 15 min IMO ■ 2 h IMO

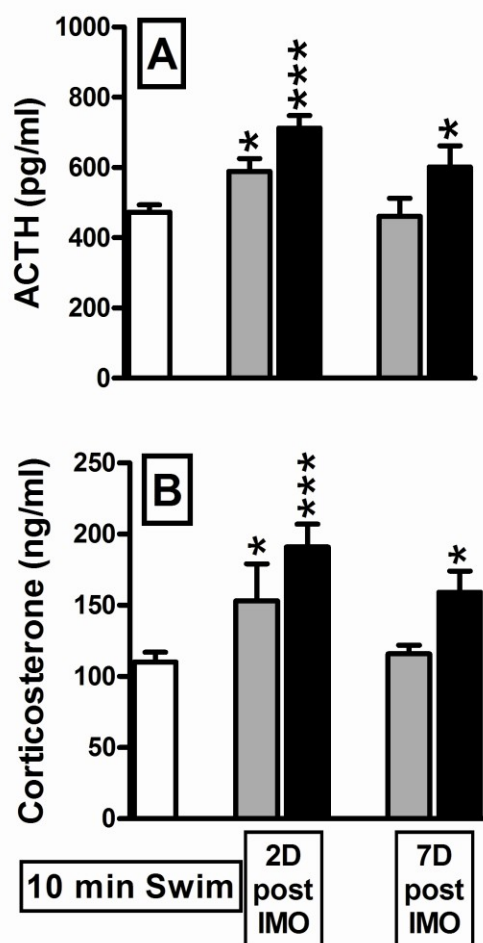


Fig. 4. Duration of HPA cross-sensitization is dependent on the length of exposure to the triggering (IMO) stressor.

Means and SEM ($n=6$ per group) are represented. ACTH (A) and corticosterone (B) responses to 10 min forced swim (SWIM) were studied in rats previously exposed to IMO for 15 min or 2 h, either 2 or 7 days before.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus control.

Discussion

The present studies delineate the main parametric factors involved in acute stress-induced sensitization of the HPA response to heterotypic stressors in adult male rats. The major findings are that: (i) a brief exposure to severe stressors is enough to induce sensitization, but longer lasting exposure resulted in longer lasting effects; (ii) sensitization is optimally observed with short exposure to the challenging stressor (i.e. 5 min), and masked by much longer exposure (i.e. 30 min); and (iii) lower intensity of challenging stressors favor detection of sensitization.

Although severe stressors such as tail-shock (typical of the learned-helplessness paradigm) and IMO appear to consistently induce HPA sensitization (Belda et al., 2008; 2012; Gagliano et al., 2008; Johnson et al., 2002; O'Connor et al., 2003; 2004), the specific contribution of the severity of the stressors has not been previously studied. In a first experiment we studied whether HPA sensitization was dependent on the intensity of the triggering (inductive) stressor. To this end, rats were exposed for 30 min to three stressors putatively differing in intensity on the basis of prior work (Márquez et al., 2002; Rabasa et al., 2015): SWIM, SHOCK and IMO. Changes in body weight gain confirmed the expected results in that IMO was the strongest stressor, followed by SHOCK and then SWIM.

When exposed for 15 min to an OF on the next day, the results showed no sensitization of the ACTH or corticosterone response to the OF in SWIM animals, whereas those exposed to SHOCK or IMO did show sensitization. A gradual effect was apparent in that SHOCK rats did not differ in terms of ACTH but did in corticosterone with respect to control animals, whereas IMO rats differed from control and SWIM rats regarding the two hormones. Lack of significant ACTH sensitization after SHOCK despite clear corticosterone sensitization can be explained in two ways. First, sensitization might affect not only ACTH release but also enhance adrenal responsiveness to circulating ACTH. Second, sensitization of ACTH release could be transient (see below), mainly affecting the initial response to the stressor (i.e. first 5 min). As a consequence after 15 min exposure ACTH levels are already declining but sensitization is clearly observed in plasma corticosterone due to the lag of about 15 min between peaks of ACTH and corticosterone.

Behavior in the OF reveals a marked dissociation from the HPA response. Exposure to SWIM did not alter either ambulatory activity in the central and peripheral part of the OF or rearing. IMO reduced horizontal activity but not rearing, suggesting that vertical activity is more resistant to the negative impact of stress. Changes after IMO are typical of exposure to severe stressors (Belda et al., 2012; Berridge and Dunn, 1989; Kennett et al., 1985; Lehnert et al., 1984). In contrast to the relatively modest effect of IMO, SHOCK strongly inhibited both horizontal activity and rearing. The observed dissociation between HPA indexes and behavior regarding IMO and SHOCK are likely to be due to the particular properties of SHOCK to develop cognitive generalization of fear to

environments completely different from that where they were shocked (Daviu et al., 2010, 2014a; Radulovic et al., 1998; van Dijken et al., 1992), which is associated to the acquisition of context fear conditioning (Daviu et al., 2010; Radulovic et al., 1998), a property not shared by IMO (Daviu et al., 2012).

The possibility discussed above that HPA cross-sensitization would be dependent on the length of exposure to the challenging stressor would be tentatively supported by results obtained after tail-shock in that sensitization was clearly observed during the initial period of exposure to the novel stressor, but not later on (i.e. Johnson et al., 2002). However, the importance of the intensity of the heterotypic stressor to detect sensitization has not been specifically addressed. To test this, rats immobilized for 2 h the day before were exposed to 5 min OF or 5 min SWIM to study the contribution of the intensity of the heterotypic stressor, or to 30 min SWIM to know the contribution of the duration of the heterotypic stressor. Marked IMO-induced sensitization of the ACTH response was observed immediately after 5 min exposure to either OF or SWIM, but only after the OF in the post-stress period. In contrast, not significant ACTH sensitization was observed after 30 min SWIM. The pattern of corticosterone response partially differed from that of ACTH. A clear sensitization was observed after the 5 min OF, no sensitization after 5 min SWIM and modest sensitization after 30 min SWIM. The lack of changes in the 5 min SWIM group during the post-stress period is puzzling as ACTH sensitization was observed at 5 min, but it is possible that the effect was too transient to be reflected later on corticosterone.

The above results strongly indicate that expression of HPA sensitization is dependent on the intensity of the challenging stressor, but also of the period of exposure to such a stressor. The critical contribution of the duration of exposure to the heterotypic stressor might be relevant to explain the inconsistent results regarding the influence of prior chronic stress exposure to emotional stressors on heterotypic sensitization of the HPA axis. When the response to the heterotypic stressor is assessed after 30-60 min exposure, the results are not consistent (i.e. Babb et al., 2014; Bhatnagar and Vining, 2003; Chung et al., 2000; Mansi and Drolet, 1997; Spiga et al., 2009; Weinberg et al., 2009). However, consistent cross-sensitization has been observed when exposure to the challenging stressor was of about 5 min (Daviu et al., 2014b; Hauger et al., 1990; Lachuer et al., 1994). For instance, daily repeated exposure to IMO causes marked cross-sensitization of the ACTH response to a 5 min OF exposure (Daviu et al., 2014b) in contrast to other results using the same chronic stressor but a longer exposure to the challenging stressor (Armario et al., 1988).

The finding that sensitization is particularly evident after short exposure to the heterotypic stressors is of great interest and can be explained in some different ways. First, in nature, exposure to non-social stressors is likely to be of short duration and, therefore, the adaptive biological consequences of HPA sensitization evolved to respond to those conditions. After this initial period, sensitization could be counteracted by other processes, likely to be related to the lack of signs of actual danger. Alternatively, sensitiza-

tion could actually represent a process of accelerating rather than increasing HPA response to novel stressors, this acceleration offering advantages when confronted with short duration stressors. For instance, faster glucocorticoid release could contribute to improve consolidation of memory related to short-lasting stressful situations.

While acute severe stressors consistently induce HPA sensitization, how long has to be exposure to those stressors to induce sensitization is unknown. We then immobilized rats for 5 min, 30 min or 4 h of IMO and the next day sensitization of the HPA response to a short OF exposure was studied. Surprisingly, HPA sensitization was of similar magnitude after 5 and 30 min IMO, with an additional small effect after 4 h IMO. These results not only demonstrate that HPA sensitization can be observed with brief exposure to traumatic stressors, but also indicate that it is unlikely that negative glucocorticoid feedback is operative under stress as prolonged activation of the HPA axis caused by 4 h IMO did not result in impaired HPA response to additional stressors on the next day. The lack of effect of stress-induced glucocorticoid release on negative feedback is consistent with the hypothesis of Dallman and Jones (1973) that exposure to stress causes a facilitation of the HPA responsiveness that overcomes negative glucocorticoid feedback. To confirm such a hypothesis, we introduced a group of rats given exogenous corticosterone simulating the release caused by 4 h IMO. Next day HPA response to the OF was completely blocked in these corticosterone-injected animals, indicating that a strong negative feedback was still present at this time. Although negative glucocorticoid feedback is not usually tested on the day after a single administration of natural glucocorticoids, there is some evidence for similar long-lasting effects of cortisol administration (Filaretov and Balashov, 1988). Therefore, it appears that IMO-induced facilitation of the HPA axis was enough to overcome negative glucocorticoid feedback.

Although a brief exposure to IMO is enough to induce HPA cross-sensitization, the duration of such sensitized state could be dependent on the length of initial exposure to IMO. To test this possibility, rats were exposed to 15 min or 2 h IMO and HPA response to 10 min SWIM was studied two or seven days later. We chose suboptimal conditions of the challenging stressor (10 min instead of 5 min exposure, and SWIM instead of OF) to better discriminate between the effects of the two IMO lengths. Two days after, both IMO periods elicited ACTH and corticosterone cross-sensitization, but the effect was greater after 2 h IMO. Seven days after IMO, significant sensitization was restricted to the 2 h IMO group and was of lower magnitude than that observed on the day after. This confirms that HPA cross-sensitization is longer lasting after a more prolonged exposure to the inductive stressor.

The precise mechanisms involved in acute-stress induced cross-sensitization of the HPA axis remains largely unknown (Belda et al., 2015), although pharmacological activation of the HPA axis is not enough to induce this process. Moreover, it does not require either glucocorticoid receptors or activation of CRH-1 receptors (Belda et al., 2012) and appears to be located at the level of the PVN or above rather than at the anterior pituitary (O'Connor et al., 2004).

In conclusion, the present results delineate the main characteristics of heterotypic HPA sensitization, demonstrating that HPA sensitization is critically dependent on the characteristic of both the triggering (inductive) and the challenging stressor. More particularly, the intensity of the inductive stressor is a more critical factor than its duration, although longer exposures to the stressor can maintain sensitization for more days. Length of exposure to the triggering stressor rather than its intensity is of major importance to detect sensitization, and this can explain controversial results in the literature, particularly regarding chronic stress-induced HPA sensitization.

Contributors

AA and XB were responsible for the study concept and design, RN participated in the design of the study and the analysis and discussion of the results. XB was the main responsible for all experiments, data and statistical analyses. AA wrote the manuscript that was further discussed by all authors. All authors have reviewed the manuscript and approved the final version submitted for publication.

Role of funding sources

The laboratory was supported by Spanish grants to AA and/or RN from Plan Nacional sobre Drogas (2011/021), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-53876R), Instituto de Salud Carlos III (RD12/0028/0014, Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Ministerio de Sanidad y Consumo), Fondos Feder and Generalitat de Catalunya (SGR2014-1020). RN is a recipient of an ICREA-ACADEMIA award (Generalitat de Catalunya). The funding sources had no role either in the design, collection, analysis and interpretation of the data or in the decision to submit the article for publication

References

- Armario, A., 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 485-501.
- Armario, A., Escorihuela, R.M., Nadal, R., 2008. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1121-1135.
- Armario, A., Hidalgo, J., Giralt, M., 1988. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47, 263-267.
- Babb, J.A., Masini, C.V., Day, H.E., Campeau, S., 2014. Habituation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones to repeated homotypic stress and subsequent heterotypic stressor exposure in male and female rats. *Stress* 17, 224-234.
- 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, 515-524.

- Belda, X., Fuentes, S., Daviu, N., Nadal, R., Armario, A., 2015. Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress*, in press.
- Belda, X., Fuentes, S., Nadal, R., Armario, A., 2008. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Horm. Behav.* 54, 654-661.
- Berridge, C.W., Dunn, A.J., 1989. Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine-stimulated release of CRF. *J. Neurosci.* 9, 3513-3521.
- Bhatnagar, S., Vining, C., 2003. Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm. Behav.* 43, 158-165.
- Bonne, O., Grillon, C., Vythilingam, M., Neumeister, A., Charney, D.S., 2004. Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 65-94.
- Chung, K.K., Martinez, M., Herbert, J., 2000. c-fos expression, behavioural, endocrine and autonomic responses to acute social stress in male rats after chronic restraint: modulation by serotonin. *Neuroscience* 95, 453-463.
- Dallman, M.F., Jones, M.T., 1973. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92, 1367-1375.
- Dal-Zotto, S., Marti, O., Armario, A., 2000. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav. Brain Res.* 114, 175-181.
- Davidson, J.R., Stein, D.J., Shalev, A.Y., Yehuda, R., 2004. Posttraumatic stress disorder: acquisition, recognition, course, and treatment. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 16, 135-147.
- Daviu, N., Andero, R., Armario, A., Nadal, R., 2014a. Sex differences in the behavioural and hypothalamic-pituitary-adrenal response to contextual fear conditioning in rats. *Horm. Behav.* 66, 713-723.
- 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, 183-190.
- Daviu, N., Rabasa, C., Nadal, R., Armario, A., 2014b. 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, 176-185.
- Filaretov, A.A., Balashov, Yu.G., 1988. Corticosteroid feedback: I. General characteristics, role of adrenal cortex. *Exp. Clin. Endocrinol.* 91, 143-148.
- Frank, M.G., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2013. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain Behav. Immun.* 33, 1-6.
- Gagliano, H., Fuentes, S., Nadal, R., Armario, A., 2008. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. *Behav. Brain Res.* 187, 239-245.
- Hardin, J.W., Hilbe, J.M., 2003. Generalized estimating equations. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Florida.

- Hauger, R.L., Lorang, M., Irwin, M., Aguilera, G., 1990. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res.* 532, 34-40.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151-180.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2002. Prior stressor exposure primes the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 27, 353-365.
- Kennett, G.A., Dickinson, S.L., Curzon, G., 1985. Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 143-152.
- Lachuer, J., Delton, I., Buda, M., Tappaz, M., 1994. The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res.* 638, 196-202.
- Lehnert, H., Reinstein, D.K., Strowbridge, B.W., Wurtman, R.J., 1984. Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrollable stress: effects of dietary tyrosine. *Brain Res.* 303, 215-223.
- Mansi, J.A., Drolet, G., 1997. Chronic stress induces sensitization in sympathoadrenal responses to stress in borderline hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 272, R813-820.
- 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, 181-185.
- 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, 747-753.
- McCulloch, C., Searle, S., 2001. Generalized, linear and mixed models. John Wiley & Sons, New York.
- O'Connor, K.A., Ginsberg, A.B., Maksimova, E., Wieseler Frank, J.L., Johnson, J.D., Spencer, R.L., Campeau, S., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2004. Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology* 80, 252-263.
- O'Connor, K.A., Johnson, J.D., Hammack, S.E., Brooks, L.M., Spencer, R.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2003. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 28, 481-500.
- Olf, M., Langeland, W., Gersons, B.P., 2005. Effects of appraisal and coping on the neuroendocrine response to extreme stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 457-467.
- 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, 125-133.
- 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, 179-189.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 21, 55-89.

- Spiga, F., Harrison, L.R., MacSweeney, C.P., Thomson, F.J., Craighead, M., Lightman, S.L., 2009. Effect of vasopressin 1b receptor blockade on the hypothalamic-pituitary-adrenal response of chronically stressed rats to a heterotypic stressor. *J. Endocrinol.* 200, 285-291.
- Stam, R., 2007. PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 1: human studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 530-557.
- Van Dijken, H.H., Van der Heyden, J.A., Mos, J., Tilders, F.J., 1992. Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol. Behav.* 51, 787-794.
- Weinberg, M.S., Bhatt, A.P., Girotti, M., Masini, C.V., Day, H.E., Campeau, S., Spencer, R.L., 2009. Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology* 150, 749-761.
- Wiedenmayer, C.P., 2004. Adaptations or pathologies? Long-term changes in brain and behavior after a single exposure to severe threat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 1-12.

Artículo 4.

Stress-induced sensitization: the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and beyond

*Xavier Belda, Silvia Fuentes, Núria Daviu, Roser Nadal and
Antonio Armario*

Stress 62 (2015) 269-279

DOI: 10.3109/10253890.2015.1067678

Discusión General

El propósito principal de este trabajo ha sido determinar algunas de las características de los estímulos estresantes emocionales que están implicadas en la sensibilización a largo plazo de la respuesta del eje HPA y la respuesta conductual a nuevas situaciones de estrés (sensibilización cruzada), así como estudiar posibles mecanismos subyacentes. Además de la implicación teórica, una finalidad importante ha sido dar luz respecto a las discrepancias que existen en la literatura en referencia a estos procesos de sensibilización.

La literatura respecto a la sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA es relativamente extensa tras la exposición a situaciones de estrés crónico y, en cambio, mucho más escasa tras la exposición aguda. En nuestra revisión sobre el tema, incluida en la presente tesis (Belda et al, 2015), ya hemos indicado algunas de las razones de los resultados controvertidos observados tras una historia de estrés crónico, en las que se han acumulado más datos experimentales. Son fundamentalmente las siguientes:

- (1)** Considerar que una mayor respuesta de la corticosterona al estímulo heterotípico es siempre un reflejo de una mayor liberación de ACTH, asunción que, como se ha discutido en el artículo de revisión, es en muchos casos errónea.
- (2)** En función de los resultados obtenidos en el último estudio experimental de la presente tesis utilizando exposición aguda, no crónica, a estrés, para inducir sensibilización, se hace patente que la duración y, en menor medida, la intensidad del estímulo heterotípico puede ser un factor crítico para que aparezca la sensibilización cruzada tras una historia previa de estrés (sea ésta aguda o crónica).
- (3)** Cuando los animales son expuestos a una nueva situación de estrés al día siguiente a una historia de estrés crónico, los mecanismos de retro-inhibición de los glucocorticoides podrían jugar un papel suficientemente importante como para reducir moderadamente la activación del eje causada por la nueva situación estresante.

Si las consecuencias del estrés crónico sobre la respuesta del eje HPA a nuevos estímulos estresantes han generado resultados controvertidos, existe más consistencia respecto a la influencia de un estrés agudo previo, como pondremos de manifiesto a lo largo de la presente discusión de nuestros principales resultados.

Más complejo es caracterizar las consecuencias a corto y largo plazo de la exposición a situaciones de estrés agudo sobre la conducta. Para situar la discusión en un marco general que nos permita una más correcta interpretación de los resultados, hemos de considerar varios aspectos críticos que a lo largo de la discusión se comentarán en más detalle, y que ahora sólo exponemos brevemente:

- (1)** El tiempo transcurrido entre la exposición al estrés y la valoración de la conducta es muy relevante, dado que muchos de los cambios pueden ser transitorios (minutos u horas posteriores). En general, cuando hablamos de efectos a largo plazo nos referimos a efectos que se observan más allá de las 24 h iniciales.

(2) La intensidad del estímulo pueda jugar un papel muy importante, pero también es crítica la cualidad del mismo. En este sentido, es importante distinguir entre cambios conductuales que se denominan asociativos y estarían relacionados con algún tipo de aprendizaje, y cambios no asociativos, que son independientes de cualquier tipo de aprendizaje. La sensibilización se incluiría dentro de los procesos no asociativos. Esta distinción es de gran importancia dado que aspectos cualitativos de los estímulos estresantes pueden diferir respecto al establecimiento de procesos asociativos. Este es el caso de la IMO respecto a la exposición a choques eléctricos, como hemos puesto de manifiesto en nuestro laboratorio (Davíu et al, 2012). El establecimiento del condicionamiento del miedo al contexto típicamente observado tras la exposición a choques eléctricos puede tener consecuencias a largo plazo sobre la conducta muy distintas de las observadas con un estímulo como la IMO, que no permite establecer este tipo de asociación.

(3) La mera exposición de los animales a un ambiente nuevo, que es típica de muchas pruebas conductuales clásicas (incluyendo el EPM), puede constituir un estrés moderado, pero hemos de distinguir entre esta situación, básicamente inevitable, y aquella en la que estudiamos como un estímulo sobreimpuesto va a modificar la conducta de los animales en función de su historia previa de estrés. En el segundo caso intentamos evaluar cómo el estrés previo ha modificado la respuesta del animal a nuevas situaciones de estrés (para estudiar por ejemplo sensibilización cruzada), pero es evidente que la interpretación de los resultados del primer caso es mucho más ambigua.

(4) Las consecuencias conductuales (o endocrinas) de una historia previa de estrés sobre el estado “basal” o la respuesta a nuevas situaciones de estrés dependerán de qué valora la prueba conductual concreta (o la respuesta endocrina concreta). Se ha de ser muy cauto en extrapolar los resultados obtenidos con unas variables particulares a otras variables distintas.

Dinámica temporal de los efectos conductuales y endocrinos de una sola exposición a la IMO

Diversos estudios han mostrado que, una sesión breve de choques eléctricos (tanto en las patas como en la cola) es capaz de inducir sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA en respuesta a ambientes nuevos, efecto que suele manifestarse a lo largo de las 2-3 semanas posteriores a la exposición a los choques (v.g. van Dijken et al, 1993; Johnson et al, 2002a; 2003; O'Connor et al, 2004). En el primero de los estudios citados, la mayor respuesta de ACTH a un ambiente nuevo se observó 2 semanas después de la exposición a choques eléctricos de moderada intensidad y duración, lo que sugeriría que los animales utilizados (ratas Wistar) eran especialmente sensibles a los efectos del estrés. En nuestro laboratorio hemos observado repetidamente que una sola exposición a la IMO, también es capaz de inducir sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a un ambiente nuevo, aunque el efecto no suele manifestarse más allá de una semana

(Gagliano et al, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2008). Las posibles razones de las discrepancias en la duración de la sensibilización cruzada del eje HPA en animales expuestos a IMO respecto a los expuestos al choque no son claras, dado que la intensidad de la IMO es superior a la del choque en función de todos los marcadores biológicos clásicos de intensidad de estrés (v.g. Márquez et al, 2002).

Es interesante destacar que también hay discrepancias respecto a la duración de los efectos conductuales. La exposición a choques eléctricos en las patas, incluso la exposición a un solo choque, es capaz de generar hipo-actividad en ambientes nuevos, que puede ser observada desde días hasta semanas después de la administración del choque (v.g. Van Dijken et al, 1992a; 1992b; 1992c; 1993; Van den Berg et al, 1998; Stam et al, 2002; Siegmund y Wotjak, 2007). Sin embargo, la exposición a otras situaciones de estrés de igual o superior intensidad (derrota social, exposición a un depredador, olor de depredador) no da lugar a cambios conductuales tan consistentes respecto al comportamiento en ambientes nuevos, sean estos adecuados para valorar actividad/exploración o para valorar más específicamente ansiedad (ver Armario et al, 2008). Utilizando la IMO, que es de gran intensidad, puede observarse hipo-actividad en el OF pasados 1 o 2 días (Davivi et al, 2014b; Gagliano et al, 2014), pero no se observan efectos sobre la conducta en términos de actividad más allá de los 5 o 14 días post-IMO, dependiendo de la prueba (Belda et al, 2004; Gagliano et al, 2008).

A partir de estas observaciones decidimos estudiar con mayor profundidad la dinámica temporal de los efectos de una sola exposición a la IMO, prestando especial atención a la comparación de los efectos endocrinos (eje HPA) y conductuales. Asumimos como hipótesis que los efectos a largo plazo de una única exposición a un estímulo estresante intenso sobre la respuesta endocrina y conductual a ambientes nuevos podrían ser relativamente transitorios (pocos días). Por otro lado, teniendo en cuenta que la actividad basal del eje HPA se normaliza a partir de las 48 h de la exposición a situaciones estresantes de elevada intensidad (v.g. Fleshner et al, 1995; Servatius et al, 1995; Martí et al, 1996; Gagliano et al, 2008) en tanto que la respuesta a una nueva situación de estrés dura mucho más tiempo, también asumimos que los efectos conductuales podían desvanecerse más rápidamente en condiciones de bajo estrés (exposición directa a los ambientes nuevos) que si se les sobre-imponía una nueva situación estresante, incluso si ésta era breve. Es decir, la normalización de la conducta del animal podría ser solo aparente, detectándose efectos del estrés previo solo cuando el animal estuviera sometido a una nueva situación de estrés.

Observamos que la exposición previa a 2h de IMO fue capaz de inducir una sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA al EPM, que iba acompañada por signos de conductas ansiosas. Estas respuestas alteradas se mantuvieron hasta 7 días después de la IMO, aunque la dinámica de recuperación hacia una respuesta normal fue más pronunciada en el caso de las hormonas del eje HPA (**Artículo 1, experimentos 1-3**). También mostramos que, una única exposición a 1 h de IMO ya no daba lugar a una respuesta conductual alterada en el EPM pasados 10 días (**Artículo 1, experimento 4**).

La sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA inducida por la IMO en respuesta a la exposición a ambientes nuevos va en la misma dirección que datos previos en los que se ha utilizado una sesión relativamente breve de choques eléctricos en las patas (Van Dijken et al, 1993), IMO (Gagliano et al, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2008), o una sesión larga de choques eléctricos en la cola, típico del paradigma de indefensión aprendida (Johnson et al, 2002a; O'Connor et al, 2003; 2004). La sensibilización del eje HPA inducida por la IMO, es específica de la exposición a estímulos estresantes heterotípicos, ya que en nuestro laboratorio hemos encontrado consistentemente que una única exposición a la IMO da lugar a largo plazo a una desensibilización de la respuesta de este eje al estímulo homotípico (Armario et al, 2004).

Nuestros resultados indican que una sola exposición a la IMO es capaz de inducir cambios en ansiedad en los días siguientes, pero los efectos son relativamente transitorios. Ya hemos comentado que existen marcadas discrepancias en la literatura al respecto (Armario et al, 2008), probablemente relacionadas con diferencias entre animales y cepas en la susceptibilidad al estrés (Armario & Nadal, 2013), pero también con el tipo de estímulo estresante utilizado. Utilizando el choque eléctrico como modelo, varios laboratorios han mostrado efectos sobre la conducta en ambientes nuevos más a largo plazo que los observados por nosotros con la IMO (Armario et al, 2008). No obstante, el choque eléctrico posee unas características muy específicas que deben tenerse en cuenta a la hora de extraer conclusiones. Los animales expuestos a choques eléctricos desarrollan rápidamente condicionamiento del miedo al contexto (la cámara donde tienen lugar los choques), pero también a otros ambientes parcialmente diferentes de donde recibieron los choques, un fenómeno denominado generalización contextual (Frankland et al, 1998; Gonzalez et al, 2003). Sin embargo, el efecto del choque eléctrico sobre la conducta en ambientes nuevos (van Dijken et al, 1992; Radulovic et al, 1998; Daviu et al, 2010; 2012; 2014a) parece ser un tipo muy especial de generalización, que no depende de ningún tipo de clave contextual y persiste aunque se eliminen claves no contextuales asociadas al procedimiento como por ejemplo el experimentador o la ruta de transporte (Daviu et al, 2010; 2012; 2014a). Además, estos efectos dependen del desarrollo de condicionamiento del miedo y no de la exposición al estímulo estresante per se, ya que cuando se imposibilita la formación del condicionamiento deja de observarse efecto sobre la conducta (Radulovic et al, 1998; Daviu et al, 2010; Sauerhöfer, 2012). Por todo ello, se ha sugerido que la exposición a choques eléctricos en las patas desarrolla algún tipo de generalización cognitiva del miedo a cualquier ambiente desconocido, independientemente de su configuración particular (Daviu et al, 2014a). Esta alta capacidad de condicionamiento del choque eléctrico contrasta totalmente con la IMO, cuya capacidad de crear cualquier tipo de condicionamiento se ha mostrado nula hasta la fecha (Daviu et al, 2012).

La liberación de corticosterona inducida por la exposición a la IMO podría estar involucrada en la inducción y/o expresión de los cambios a largo plazo en las conductas ansio-

sas, puesto que este estímulo provoca una elevada y prolongada liberación de corticosterona, pudiéndose observar niveles basales más elevados de esta hormona durante varios días posteriores a la IMO. Desafortunadamente, el papel de la administración aguda de glucocorticoides (incluyendo la corticosterona) sobre las conductas ansiosas es controvertido, habiéndose observado tanto efectos ansiolíticos (File et al, 1979; Andreatini y Leite, 1994) como ansiogénicos (Calvo et al, 1998; Calfa et al, 2006). También se ha observado efecto ansiogénico a largo plazo (12 días) tras la administración de una dosis de corticosterona (Mitra & Sapolsky, 2008). Consistente con un efecto ansiogénico, la inhibición de la síntesis o el bloqueo de la acción de la corticosterona mediante antagonistas GR o MR eliminan los efectos ansiogénicos del estrés por inmovilización en tubo (restraint) (Calvo et al, 1998; Calvo & Volosín, 2001). Aunque MR and GR pueden participar en la inducción de la ansiedad, es posible que lo hagan actuando en diferentes áreas del SNC. Así, la ansiedad inducida por la exposición a derrota social es mimetizada por la administración de corticosterona en el septum lateral y es bloqueada por la administración de un antagonista GR pero no uno MR (Calfa et al, 2006). Sin embargo, algunos estudios con modelos animales de PTSD sugieren que los efectos ansiogénicos a largo plazo causados por la exposición al estrés por orina de gato (posible depredador de la rata) se reducen por la administración, previa o inmediatamente posterior al estrés, de corticosterona (Cohen et al, 2006; 2008).

Una exposición previa al estrés puede incrementar transitoriamente la ansiedad o inducir cambios conductuales, que vuelven progresivamente a la normalidad. Sin embargo, esta normalidad puede ser más aparente que real si no se exponen a condiciones en las cuáles los cambios latentes puedan manifestarse. Es decir, estos animales podrían quedar en un estado de mayor vulnerabilidad frente a estímulos estresantes sobreimpuestos. Para comprobar esta hipótesis, escogimos 1h de IMO y 10 días de intervalo entre estímulos, asumiendo que tras este intervalo de tiempo sería poco probable observar efectos directos de la IMO sobre la respuesta al EPM (**Artículo 1, experimentos 4 y 5**). Pudimos observar que una única exposición a 1 h de IMO no daba lugar a una conducta alterada en el EPM pasados 10 días; pero la sobreimposición de un estímulo estresante (choques eléctricos suaves) indujo la aparición de conductas ansiosas en el EPM en los animales previamente expuestos a IMO, sin afectar a las ratas control. Estos datos indican que, los animales previamente expuestos a IMO, mantienen latente durante largo plazo una mayor vulnerabilidad a determinados estímulos, aunque el efecto previo del estrés no es evidente a no ser que se les exponga a un nuevo estímulo estresante.

Además, encontramos que la respuesta de corticosterona a la sesión breve de choques fue similar en los controles y en las ratas previamente expuestas a IMO a pesar de que, solo en estas últimas, se observó un incremento de las conductas ansiosas en el EPM inducidas por el estrés sobreimpuesto. La respuesta de *freezing* tras los choques eléctricos fue similar en el grupo control y en el grupo IMO, indicando que la respuesta inmediata de *freezing* y la ansiedad generada posteriormente son fenómenos disociados. Por lo tanto, la sensibilización conductual a un estímulo estresante sobreimpuesto es más duradera que los efectos sobre la conducta, valorados en condiciones basales, y la sensi-

bilización cruzada del eje HPA. No obstante, esto no imposibilita que algunos componentes del eje HPA u otros sistemas biológicos activados durante la respuesta al estímulo estresante original, puedan intervenir en cambios a largo plazo sobre la expresión génica y, por consiguiente, sobre la conducta. Estos datos sugieren que la sensibilización cruzada del eje HPA y las conductas ansiosas inducidas por la IMO son presumiblemente el resultado, al menos parcialmente, de procesos independientes.

Los datos obtenidos apoyan la idea de que los cambios inducidos en el EPM por el estrés agudo sobreimpuesto son más apropiados para evocar ansiedad y estudiar el efecto de fármacos ansiolíticos que la evaluación en condiciones libres de estrés (Korte y De Boer, 2003). Además, esto es consistente con: i) la sensibilización a largo plazo de algunas respuestas fisiológicas a estímulos estresantes sobreimpuestos, tras la exposición previa a sesiones relativamente cortas de choques eléctricos (Stam et al, 1996; Bruijnzeel et al, 2001); y ii) el incremento del miedo condicionado causado por una única exposición previa a determinados estímulos estresantes (Cordero et al, 2003; Rau et al, 2005; Baratta et al, 2007; Iwamoto et al, 2007; Kohda et al, 2007). Nuestros resultados también son consistentes con el hecho ampliamente aceptado de que los pacientes con PTSD se caracterizan por una mayor respuesta a estímulos estresantes no directamente relacionados a la situación traumática (Stam et al, 2007).

Papel de los glucocorticoides en la sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA

La sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA inducida por la exposición aguda al estrés parece estar directamente relacionada con la intensidad y/o duración de los estímulos estresantes. Por ejemplo, el *restraint*, claramente menos severo que la IMO (Campmany et al, 1996; Martí et al, 2001; Rabasa et al, 2011a), no ha mostrado inducir sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a un nuevo estímulo aplicado al día siguiente (Wong et al, 2000) o este efecto ha sido muy modesto (Spiga et al, 2009). Sin embargo, Wong et al (2000) demostraron que el bloqueo de la liberación de corticosterona inducida por la exposición al *restraint* sí permitía encontrar una sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a estímulos estresantes posteriores. Estos datos parecen indicar que la liberación de glucocorticoides durante el estrés puede actuar frenando la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por estrés, de acuerdo con la teoría de la facilitación propuesta por Dallman y Jones (1973). El papel de otros factores, aparte de la severidad del estímulo estresante, en el proceso de sensibilización cruzada es muy poco conocido.

La sensibilización de la respuesta del eje HPA a nuevas situaciones de estrés podría aparecer en todas aquellas condiciones en las que se dé una marcada activación del eje HPA, cualquiera que sea la naturaleza del estímulo (farmacológico, sistémico o emocional). Para estudiar si la sensibilización cruzada podría ser consecuencia exclusivamente de una intensa activación del eje HPA, independientemente de las características del estímulo, o estar ligada a las características específicas del estímulo estresante concreto,

realizamos una aproximación mediante la administración de metirapona (**Artículo 2, experimento 1**). La metirapona, que es un inhibidor de la 11 β -hidroxilasa (Jenkins et al, 1958), enzima crítica para la síntesis de glucocorticoides, ha mostrado a altas dosis actuar por sí misma como un estímulo estresante farmacológico (Rotllant et al, 2002). Por esta razón estudiamos el efecto de distintas dosis de metirapona sobre los niveles de ACTH y el ritmo circadiano de liberación de las hormonas del eje HPA. Pudimos confirmar, de acuerdo con resultados previos (Rotllant et al, 2002; Rotllant y Armario, 2005), una activación dosis-dependiente de la liberación de ACTH en el periodo inmediatamente posterior al fármaco y que la administración de dosis bajas cursaba con pocos efectos sobre el ritmo circadiano de ACTH y corticosterona, mientras que una dosis alta causaba una profunda desregulación del eje HPA. Sin embargo, a pesar de la elevada activación del eje HPA causada por la dosis más alta de metirapona, ésta dejó apenas un leve efecto residual sobre la actividad basal del eje HPA al día siguiente, y no afectó a la respuesta endocrina a un ambiente nuevo tres días después. Esta ausencia de efecto sobre la respuesta al ambiente nuevo sugiere que una elevada activación del eje HPA no conlleva necesariamente sensibilización cruzada a largo plazo de la respuesta endocrina a estímulos estresantes suaves. Es decir, la sensibilización cruzada del eje HPA no es una consecuencia universal de todos los estímulos que dan lugar a una activación del eje HPA (u otras respuestas de estrés), aunque esta activación sea de gran intensidad.

A pesar de estos resultados, seguía siendo necesaria la comprobación directa de que los glucocorticoides liberados durante la exposición a estrés no estuviesen limitando la inducción de la sensibilización cruzada. En base a los datos previos del Artículo 1, en los que se observaba que la IMO inducía sensibilización a largo plazo de la respuesta del eje HPA a un estímulo heterotípico, elegimos de nuevo este estímulo para el estudio. Además, en base a los datos del experimento anterior escogimos una dosis de metirapona que fuese capaz de inhibir de forma sustancial la respuesta de los glucocorticoides a la IMO, sin afectar apenas a la actividad basal del eje HPA. Los resultados de este estudio (**Artículo 2, experimento 2**) mostraron que la administración de metirapona reducía considerablemente la respuesta de corticosterona a la IMO, al mismo tiempo que incrementaba la respuesta de ACTH. Estos resultados eran los esperados en base a observaciones previas (Akana et al, 1992; Andrés et al, 1999; Dal-Zotto et al, 2003). Sin embargo, esta desregulación de la respuesta del eje HPA a la IMO en los animales tratados con metirapona no se tradujo en cambio alguno en el incremento en los niveles basales de corticosterona observados al día siguiente a la exposición a la IMO (**Artículo 1, experimento 3**). Un incremento en los niveles basales de corticosterona suele observarse al día siguiente a la exposición a situaciones estresantes de elevada intensidad como la IMO o la exposición a choques eléctricos (Fleshner et al, 1995; Servatius et al, 1995; Martí et al, 1996). Más relevante es el hecho de que el bloqueo mediante metirapona de la liberación de glucocorticoides inducida por la IMO no alteró el grado de sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA a la exposición a un ambiente nuevo, tres días después de la IMO.

Estos datos sugerían que la liberación de glucocorticoides durante el estrés no juega un papel crítico en la sensibilización heterotípica a largo plazo del eje HPA. No obstante, dado que la inhibición de la liberación de glucocorticoides en respuesta a la IMO no fue total tras la administración previa de metirapona, no podíamos descartar que los niveles de corticosterona alcanzados por estos animales fuesen aún suficientes para unirse a los receptores MR y probablemente, en parte, a los GR. Además, se ha observado que dosis bajas de corticosterona son importantes en ratas ADX para poder dar una respuesta adecuada del eje HPA frente a estímulos estresantes (Tanimura y Watts, 1998). Por consiguiente, seguía siendo posible que los glucocorticoides pudieran tener un papel permisivo respecto a la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por la IMO. Para descartar un posible papel de los GR, realizamos otro experimento administrando altas dosis de mifepristona, antagonista de los GR, antes de la exposición a la IMO (**Artículo 2, experimento 3**). El bloqueo de los GR no afectó ni a la respuesta del eje HPA a la IMO, ni a los efectos a largo plazo de la exposición previa a la IMO sobre la respuesta endocrina y conductual a un ambiente nuevo. Parece por lo tanto improbable que los glucocorticoides jueguen un papel relevante en la sensibilización cruzada del eje HPA causada por la exposición a situaciones estresantes de elevada intensidad.

Los mecanismos subyacentes a la sensibilización cruzada del eje HPA se desconocen. Trabajos previos, utilizando los choques eléctricos en la cola como estímulo estresante inductor, han demostrado que la sensibilización cruzada del eje HPA está asociada a una reducción de la eficacia de los mecanismos de retroinhibición de los glucocorticoides (O'Connor et al, 2003). Posteriormente, utilizando el mismo paradigma de estrés, los autores (O'Connor et al, 2004) demostraron que la sensibilización cruzada de la respuesta de ACTH y corticosterona a la exposición a un nuevo estímulo estresante, valorada al día siguiente, iba acompañada de una mayor activación de la adenohipófisis (incremento de la expresión de c-fos y del gen de la POMC) y del PVN (incremento de la expresión de c-fos y del mRNA de la CRH). Estos datos sugieren claramente que la sensibilización tiene lugar a nivel del SNC más que a nivel periférico. Curiosamente, en este mismo estudio, encontraron también sensibilización cruzada en animales ADX, lo que indica que los glucocorticoides no son necesarios para inducir o expresar la sensibilización cruzada del eje HPA. Esta observación avalaría la visión de que la sensibilización observada a nivel periférico es probablemente el resultado de un proceso de sensibilización a nivel del SNC independiente de los glucocorticoides.

Implicación de los receptores CRHR1 en la sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA

Considerando que la sensibilización cruzada del eje HPA parece localizarse a nivel de SNC, existían varias razones para considerar que el CRH podría tener un papel relevante en la inducción de la sensibilización, actuando sobre todo a través de los receptores CRHR1. En primer lugar, hay evidencias de que el CRH está involucrado en la inducción y/o la expresión de la sensibilización motora a la anfetamina inducida por estrés, y que este papel es ejercido a nivel central (Cole et al, 1990; Cador et al, 1993). En segundo

lugar, durante la abstinencia de alcohol se ha observado una inhibición de la interacción social, que está potenciada por la exposición previa a dos sesiones de restraint (separadas entre ellas por una semana de diferencia); este efecto potenciador del estrés es prevenido por la administración previa al restraint de un antagonista de los receptores CRHR1 (Breese et al, 2004). En tercer lugar, los receptores CRHR1 están involucrados en el desarrollo de la hiperalgesia visceral asociada a la exposición al estrés (Larauche et al, 2012). Finalmente, tanto una administración icv prolongada de CRH, como la administración repetida de urocortina en la BLA, causan un incremento a largo plazo de conductas ansiosas, probablemente a través de los receptores CRHR1 (Rainnie et al, 2004; Servatius et al, 2005).

A pesar de estas evidencias, hasta la fecha ningún trabajo había considerado un posible papel del CRH en la sensibilización fisiológica y conductual a largo plazo inducida por una única exposición a estímulos estresantes emocionales. Por este motivo, decidimos realizar un experimento administrando el antagonista de los CRHR1, R121919, antes de la exposición a la IMO (**Artículo 2, experimento 4**). El bloqueo de los CRHR1 redujo la respuesta de ACTH a la IMO, en concordancia con estudios previos con este fármaco (Keck et al, 2001; Heinrichs et al, 2002). Sin embargo, el fármaco no modificó los efectos de la IMO sobre la inducción a largo plazo de la respuesta conductual y de ACTH a un ambiente nuevo. Por lo tanto, nuestros datos indican que es improbable que los CRHR1 participen en el proceso de sensibilización del eje HPA inducido por el estrés, pero sería interesante determinar el papel de estos receptores en la expresión de la sensibilización, así como la posible participación de los receptores CRHR2 en este proceso.

Intensidad y duración del estímulo estresante inductor y sensibilización cruzada a largo plazo

Si se lleva a cabo un análisis detallado de la bibliografía, emerge claramente la posibilidad de que la inducción de la sensibilización cruzada a largo plazo pudiera estar directamente relacionada con la intensidad del estímulo estresante. Mientras que la exposición a estímulos estresantes intensos, como choques eléctricos o IMO son capaces de inducir sensibilización a largo plazo del eje HPA (v.g. van Dijken et al, 1993; Martí et al, 2001; Johnson et al, 2002; O'Connor et al, 2003; 2004; Gagliano et al, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2008; Artículos 1 y 2), ésta no aparece o es débil tras la exposición a estímulos de menor intensidad, como el restraint o el olor a gato (v.g. Wong et al, 2000; Muñoz-Abellán et al, 2008; Spiga et al, 2009). No obstante, ningún trabajo previo había estudiado previamente la contribución específica de la intensidad del estímulo en la inducción de la sensibilización. Para comprobar directamente esta hipótesis utilizamos tres estímulos estresantes que, en base a datos previos (Márquez et al, 2002; Rabasa et al, 2015a), consideramos que divergían en intensidad: natación forzada, choque eléctrico en las patas e IMO (**Artículo 3, experimento 1**). El estudio de los cambios en la ganancia de peso tras la exposición a estos estímulos nos confirmó que estos estímulos tenían un impacto diferente sobre los animales, siendo la IMO el más intenso, seguido del choque y posteriormente de la natación forzada.

Cuando estudiamos al día siguiente la respuesta del eje HPA a un ambiente nuevo se observaron diferencias dependiendo del tratamiento previo de estrés. Mientras que la natación forzada no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de ACTH y corticosterona al ambiente nuevo, la IMO y el choque sí indujeron sensibilización cruzada. Aunque a nivel estadístico la respuesta endocrina al ambiente nuevo no difería entre los animales previamente expuestos a choque o IMO, la comparación con el grupo control de la respuesta de ACTH mostró que la sensibilización cruzada fue más marcada en el grupo IMO. Otros datos de nuestro laboratorio apoyan la importancia de la intensidad del estímulo inicial en la sensibilización cruzada de la respuesta del eje HPA al ambiente nuevo. Así, en un experimento en el que comparamos el efecto de la IMO con el de dos tipos diferentes de choques eléctricos observamos sensibilización cruzada de la respuesta de ACTH después de una exposición previa a la IMO o de una sesión larga de choques intensos, pero no después de una sesión corta de choques eléctricos suaves (**Artículo 4, Figura 2**). Sin embargo, en este caso no podíamos descartar que las diferencias en el tiempo de exposición también tuviesen un papel relevante.

El estudio de la conducta en el ambiente nuevo también puso de manifiesto importantes diferencias dependiendo del tratamiento previo. Mientras que el nado no tuvo efecto sobre ninguna de las conductas estudiadas, la IMO redujo la actividad horizontal pero no la vertical, sugiriendo que ésta última es más resistente al impacto negativo del estrés. Estos cambios producidos por la IMO son típicamente observados tras la exposición a estímulos intensos (Lehnert et al, 1984; Kennett et al, 1984; Berridge y Dunn, 1989; Artículo 2). Por otro lado, el choque indujo una importante inhibición de todas las conductas analizadas, mostrando un impacto superior al de la IMO en todos los casos y, por lo tanto, revelando la existencia de una disociación entre la respuesta del eje HPA y la conducta. No obstante, tal y como hemos comentado en el Artículo 1, esta disociación entre la IMO y los choques eléctricos es probablemente debida a las propiedades particulares del choque eléctrico de desarrollar generalización cognitiva del miedo a ambientes completamente diferentes a los del choque (van Dijken et al, 1992; Radulovic et al, 1998; Daviu et al, 2010; 2012; 2014a).

Habiendo demostrado que la intensidad del estímulo inicial era un factor importante en la sensibilización cruzada, faltaba por comprobar cuán duradero tenía que ser la exposición al estímulo inductor para inducir sensibilización. Para ello, expusimos a ratas a diferentes tiempos de IMO (5 min, 30 min y 4 h) y valoramos su efecto sobre la respuesta endocrina y conductual al ambiente nuevo al día siguiente (**Artículo 3, experimento 3**). Sorprendentemente, la sensibilización cruzada del eje HPA fue de similar magnitud en los grupos expuestos a 5 o 30 min de IMO, con un pequeño efecto adicional en el grupo de 4h. Estos resultados demuestran que la sensibilización cruzada del eje HPA se puede observar con exposiciones muy cortas a estímulos traumáticos. No obstante, cabía la posibilidad que la duración del efecto fuese dependiente de la duración del estímulo inicial. Para comprobar esta hipótesis realizamos un estudio complementario en el que determinamos el efecto de la exposición a dos tiempos diferentes de IMO (15 min o 2 h) sobre la sensibilización heterotípica, incluyendo dos intervalos de tiempo diferentes

entre exposiciones: 2 o 7 días (**Artículo 4, experimento 4**). Los datos confirmaron que el grado de sensibilización cruzada era mayor y más duradero cuanto más prolongada era la exposición al estímulo estresante inductor.

Por otra parte, el hecho de que una activación muy prolongada del eje HPA como la que se observa tras 4 h de exposición a la IMO no diera lugar a una inhibición de la respuesta al ambiente nuevo al día siguiente indicaba que era poco probable que la retroinhibición de los glucocorticoides fuera operativa bajo condiciones de estrés. La constatación de que la liberación de glucocorticoides que tiene lugar como consecuencia de una exposición previa a estrés no es eficaz, a través de la retro-inhibición, para inhibir la respuesta del eje HPA a un estrés posterior se ha explicado sugiriendo que el estrés provoca una facilitación del eje HPA que compensaría los mecanismos de retro-inhibición (Dallman y Jones, 1973). Para confirmar esta hipótesis, introducimos un grupo de animales a los que se les administró corticosterona a una dosis y condiciones que simularan la dinámica de liberación de glucocorticoides del grupo expuesto a 4 h de IMO. Curiosamente, la respuesta de ACTH y corticosterona al ambiente nuevo de este grupo no solo estaba reducida respecto al grupo previamente expuesto a 4 h de IMO sino que estaba totalmente inhibida, indicando que existía todavía a las 24 h de la administración de corticosterona una fuerte retro-inhibición. Aunque el efecto de la retroinhibición de los glucocorticoides sobre la respuesta a un estrés subsiguiente no suele estudiarse al día siguiente de una administración de glucocorticoides, hay alguna evidencia de efectos similares a los del presente estudio tras la administración de cortisol (Filaretov y Balashov, 1988). Estos resultados indican que la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por la IMO es suficiente para contrarrestar completamente la retroinhibición de los glucocorticoides. Pueden existir explicaciones alternativas a este hecho que han sido muy poco exploradas. Una de ellas sería que la exposición a una situación de estrés dejara en suspenso los mecanismos de retro-inhibición, en cuyo caso no haría falta recurrir a una facilitación de la respuesta a un estrés posterior para explicar la falta de eficacia de los glucocorticoides liberados durante la exposición a la primera situación estresante.

Papel de la intensidad y duración del estímulo heterotípico en la expresión de la sensibilización cruzada

Ya hemos mencionado previamente en la discusión la posibilidad de que la detección de la sensibilización cruzada del eje HPA pudiera depender de la duración de la exposición al estímulo heterotípico. Esta posibilidad está respaldada por los resultados obtenidos tras la exposición a choques en la cola, en los que se observa claramente la sensibilización cruzada durante el periodo inicial (5 min) de exposición al nuevo estímulo, pero no más tarde (Johnson et al, 2002a). Además, una revisión detallada de la literatura también sugiere que la intensidad del estímulo heterotípico pudiera ser relevante a la hora de observar sensibilización cruzada. Así, mientras que es muy frecuente encontrar una mayor respuesta al estímulo heterotípico cuando éste es de baja intensidad, como por ejemplo ambientes nuevos (v.g. van Dijken et al, 1993; Johnson et al, 2002a; 2003; O'Connor et al, 2004; Gagliano et al, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2008; Artículos 1, 2 y

3), los cambios son más sutiles cuando el estímulo heterotípico es de mayor intensidad, como la natación forzada (Martí et al, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios específicamente destinados a valorar la importancia de la intensidad del estímulo heterotípico y su duración en la detección de la sensibilización.

Con esta doble finalidad, se estudió el efecto de la exposición previa a la IMO sobre la respuesta del eje HPA a 5 min de ambiente nuevo o de natación forzada, para determinar la contribución de la intensidad del estímulo heterotípico, y a 30 min de natación forzada, para comprobar la contribución de la duración del estímulo heterotípico. Los resultados obtenidos sugieren claramente que la expresión de la sensibilización cruzada del eje HPA es dependiente de la intensidad del estímulo heterotípico, siendo más fácil de detectar con estímulos estresante débiles. Pero aún es más crítico el periodo de exposición a dicho estímulo, pudiendo pasar inadvertida la sensibilización con exposiciones superiores a 10-15 min. La contribución crítica de la duración de la exposición al estímulo heterotípico puede ser relevante para explicar la inconsistencia observada en referencia a la influencia de un estrés crónico previo a estímulos estresantes emocionales sobre la sensibilización cruzada del eje HPA. Cuando la respuesta al estímulo heterotípico es valorada tras 30-60 min de exposición, los resultados no son consistentes (v.g. Mansi y Drolet, 1997; Chung et al, 2000; Bhatnagar y Vining, 2003; Spiga et al, 2009; Weinberg et al, 2009; Babb et al 2014). Sin embargo, se observa mayor consistencia en la sensibilización cruzada cuando la exposición es de unos 5 min (Hauger et al, 1990; Lachuer et al, 1994; Daviu et al, 2014b). A título de ejemplo, la exposición diaria a la IMO causa una profunda sensibilización cruzada de la ACTH en respuesta a 5 min de ambiente nuevo (Daviu et al, 2014b), en contraste a otros resultados usando el mismo estímulo crónico pero exposiciones más largas al estímulo heterotípico (Armario et al, 1988a).

El hecho de que la sensibilización cruzada sea particularmente evidente tras exposiciones cortas a estímulos heterotípicos es de gran interés y puede ser explicada de diferentes maneras. En primer lugar, en la naturaleza, la exposición a estímulos estresantes (excepto algunos de naturaleza social) acostumbra a ser de corta duración y, por consiguiente, cabe considerar en este contexto, las posibles ventajas adaptativas de una sensibilización del eje HPA frente a estas nuevas situaciones. Después de un periodo inicial de hiper-reactividad, la sensibilización podría ser compensada por otros procesos, probablemente relacionados con la pérdida de señales de daño real. Sería lo opuesto a lo que sucede tras la re-exposición al estímulo homotípico, donde la disminución de la respuesta del eje HPA vendría favorecida por la activación de señales de seguridad asociadas a la experiencia previa de que la exposición anterior al mismo estímulo no dio lugar a un daño real al organismo (Rabasa et al, 2015). Como explicación alternativa, la sensibilización cruzada podría en realidad representar un proceso de aceleración más que de incremento de la respuesta del eje HPA a nuevos estímulos estresantes, ofreciendo ventajas cuando el individuo se enfrenta a estímulos estresantes de corta duración. Por ejemplo, una liberación más rápida de glucocorticoides podría contribuir a mejorar la consolidación de la memoria relacionada con nuevas situaciones estresantes de corta

duración, lo que tendría valor adaptativo si en el futuro aparecen de nuevo señales asociadas a estas situaciones.

Como conclusión general, los resultados aquí presentados, junto con el artículo de revisión, delinean las características de la sensibilización cruzada del eje HPA inducida por la exposición al estrés y su relación con la sensibilización conductual. La exposición a situaciones estresantes de elevada intensidad es absolutamente relevante para inducir sensibilización del eje HPA, en tanto que la duración de la exposición al estímulo inductor es más relevante para la duración (días) de la sensibilización que para que ésta se ponga de manifiesto. La sensibilización cruzada del eje HPA se pone más claramente de manifiesto cuando el estímulo utilizado para detectarla es de menor intensidad, pero sobre todo cuando la exposición al mismo es de corta duración (v.g. 5-10 min). No parece que la sensibilización cruzada afecte de forma generalizada a los distintos sistemas endocrinos o fisiológicos, aunque sería muy importante estudiar el fenómeno respecto a la liberación de adrenalina y noradrenalina. La sensibilización cruzada es también extensible a ciertos rasgos conductuales como la ansiedad, pero la dinámica temporal es diferente de la del eje HPA, siendo probable que esta sensibilización conductual frente a nuevas situaciones de estrés sea más duradera que la endocrina. Finalmente, los mecanismos implicados en la sensibilización cruzada del eje HPA o la sensibilización conductual están por establecer. Nuestros datos indican que ni los glucocorticoides ni el CRH, a través de los receptores CRHR1, jugarían un papel relevante respecto al eje HPA.

Conclusiones

Conclusiones

- 1.** La exposición aguda a 2 h de IMO incrementó la respuesta de ACTH y de corticosterona a un ambiente nuevo (laberinto elevado en cruz, EPM) en los tres días posteriores a la exposición, manteniéndose elevada la respuesta de la corticosterona, pero no la de ACTH a los siete días. Por consiguiente, la exposición a la IMO causa una sensibilización cruzada a largo plazo del eje HPA.
- 2.** La exposición aguda a 2 h de IMO incrementó los niveles de ansiedad (reducción del tiempo en los brazos abiertos del EPM) durante la semana siguiente a la exposición, en paralelo con la sensibilización del eje HPA.
- 3.** A los diez días de una exposición aguda a 1 h de IMO no se observaron cambios en el nivel basal de ansiedad, pero la superposición de breves choques eléctricos causó un incremento notable de la ansiedad en los animales previamente expuestos a la IMO pero no en los controles. Esta sensibilización conductual a nuevas situaciones de estrés no se reflejó en una mayor respuesta del eje HPA. Los resultados indican que la sensibilización conductual es más persistente que la endocrina y que la valoración de la conducta en el EPM en condiciones basales puede no reflejar ciertos efectos a largo plazo de la exposición al estrés.
- 4.** De acuerdo con datos previos de nuestro laboratorio, la administración de metirapona (MET, inhibidor de la 11- β -hidroxilasa, enzima crítica para la síntesis de los glucocorticoides) redujo la respuesta de la corticosterona al estrés pero causó una marcada activación del eje HPA (reflejada en los niveles de ACTH), confirmando que actúa como un estímulo estresante de tipo farmacológico. Sin embargo, esta marcada activación del eje HPA no dio lugar a sensibilización cruzada de la respuesta a nuevos estímulos, indicando que una activación del eje HPA no es suficiente para inducir la sensibilización típicamente observada tras la exposición a estímulos emocionales intensos como la IMO.
- 5.** Ni la reducción de la respuesta de la corticosterona a la IMO (con dosis adecuadas de MET) ni el bloqueo de la actividad de la corticosterona mediante el antagonista de los receptores de glucocorticoides mifepristona fue capaz de alterar la sensibilización cruzada del eje HPA, lo que sugiere que los glucocorticoides no están restringiendo el proceso de sensibilización, al menos cuando es desencadenado por estímulos de elevada intensidad.
- 6.** El bloqueo de los receptores tipo 1 de CRH con el antagonista no peptídico (R121919) redujo la respuesta de la ACTH a la IMO, pero no ejerció efecto alguno sobre los cambios conductuales asociados a la IMO o la sensibilización cruzada del eje HPA, lo que sugiere que la activación central del CRH no juega un papel importante en estos efectos.

- 7.** La comparación de los efectos de tres situaciones estresantes que diferían en intensidad (natación forzada, choques eléctricos e IMO) sobre la sensibilización cruzada del eje HPA puso de manifiesto que la magnitud de la sensibilización estaba directamente relacionada con la intensidad de los estímulos estresantes utilizados (intensidad valorada con varios marcadores clásicos de estrés).
- 8.** La detección de la sensibilización cruzada inducida por la IMO vino influida por las características de los estímulos heterotípicos. Esta sensibilización fue muy evidente cuando la exposición al estímulo heterotípico fue de corta duración (5 min), con una moderada influencia de la intensidad del estímulo heterotípico (menor con la natación forzada que con un ambiente nuevo). Sin embargo, no se observó sensibilización cuando la exposición al estímulo heterotípico (natación forzada) fue de 30 min. Por consiguiente la detección de la sensibilización es óptima tras la exposición a estímulos heterotípicos de intensidad baja y corta duración.
- 9.** Una breve exposición a la IMO (5 min) fue suficiente para inducir sensibilización cruzada del eje HPA, pero la magnitud del efecto se incrementó en función de la duración de la exposición a la IMO (5 min, 30 min y 4 h). La administración de dosis de corticosterona que simulaban la activación causada por 4 h de IMO causó un bloqueo total de la respuesta del eje HPA al estímulo heterotípico, en claro contraste con lo observado en el grupo expuesto a IMO. Estos datos apoyan la hipótesis de que la exposición al estrés interfiere con la retro-inhibición de los glucocorticoides.
- 10.** Aunque basta una breve exposición a la IMO para inducir sensibilización cruzada, el tiempo de exposición al estímulo (15 min versus 2 h) fue importante sobre todo para determinar la duración (días) de la sensibilización cruzada del eje HPA.

Referencias

- Adamec R, Kent P, Anisman H, Shallow T, Merali Z (1998) Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals--implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 301-18
- Adamec RE, Shallow T (1993) Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* 54: 101-9
- Adamec RE, Shallow T, Budgell J (1997) Blockade of CCK(B) but not CCK(A) receptors before and after the stress of predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Behav Neurosci* 111: 435-49
- Adan RA, Gispen WH (2000) Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol* 405: 13-24
- Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E (1988) Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J Neurochem* 50: 1678-81
- Aguilera G (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15: 321-50
- Aguilera G (2012) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuroendocrine responses to stress. In: Fink G, Pfaff DW, Levine J (eds) *Handbook of Neuroendocrinology*. Elsevier Inc., pp 175-196
- 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, Dallman MF, Bradbury MJ, Scribner KA, Strack AM, Walker CD (1992) Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology* 131: 57-68
- Akana SF, Hanson ES, Horsley CJ, Strack AM, Bhatnagar S, Bradbury MJ, Milligan ED, Dallman MF (1996) Clamped Corticosterone (B) Reveals the Effect of Endogenous B on Both Facilitated Responsivity to Acute Restraint and Metabolic Responses to Chronic Stress. *Stress* 1: 33-49
- Alescio-Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B (2000) Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin. *Eur J Pharmacol* 405: 63-72
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8: 365-71
- Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (2006) Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 26: 13264-72
- Andreatini R, Leite JR (1994) The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and to to pentylenetetrazol-induced convulsions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 18: 1333-47
- Andrés R, Marti O, Armario A (1999) Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. *Am J Physiol* 277: R863-8
- Anisman H, Merali Z, Hayley S (2003) Sensitization associated with stressors and cytokine treatments. *Brain Behav Immun* 17: 86-93
- Anisman H, Sklar LS (1979) Catecholamine depletion in mice upon reexposure to stress: mediation of the escape deficits produced by inescapable shock. *J Comp Physiol Psychol* 93: 610-25

- Antelman SM, Caggiula AR, Kocan D, Knopf S, Meyer D, Edwards DJ, Barry H, 3rd (1991) One experience with 'lower' or 'higher' intensity stressors, respectively enhances or diminishes responsiveness to haloperidol weeks later: implications for understanding drug variability. *Brain Res* 566: 276-83
- Antelman SM, Knopf S, Kocan D, Edwards DJ (1989) Persistent sensitization of clonidine-induced hypokinesia following one exposure to a stressor: possible relevance to panic disorder and its treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 97-101
- Antelman SM, Knopf S, Kocan D, Edwards DJ, Ritchie JC, Nemeroff CB (1988) One stressful event blocks multiple actions of diazepam for up to at least a month. *Brain Res* 445: 380-5
- 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
- Arlt J, Jahn H, Kellner M, Strohle A, Yassouridis A, Wiedemann K (2003) Modulation of sympathetic activity by corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide. *Neuropeptides* 37: 362-8
- Armario A (1998) Estrés: Concepto y respuesta fisiológica. In: J. A. F. Tresguerres EA, J. Devesa & B. Moreno (ed) *Tratado de Endocrinología Básica y Clínica*. Síntesis
- Armario A (2006a) The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressors. In: Pinaud R, Tremere LA (eds) *Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders*. Springer Science & Business Media, LLC, pp 199-221
- Armario A (2006b) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 485-501
- 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, Giralt M, Marti O, Gavalda A, Hidalgo J, Hsu BR, Kuhn RW (1994) The effect of acute and chronic ACTH administration on pituitary-adrenal response to acute immobilization stress. Relationship to changes in corticosteroid-binding globulin. *Endocr Res* 20: 139-49
- Armario A, Hidalgo J, Giralt M (1988a) Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology* 47: 263-7
- Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Balasch J (1986) Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci Biobehav Rev* 10: 245-50
- 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, Nadal R (2013) Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: a strong challenge and a good opportunity. *Front Pharmacol* 4: 137
- Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J (1985) Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci* 36: 2085-92

- Armario A, Restrepo C, Lopez-Calderon A (1988b) Effect of a chronic stress model of depression on basal and acute stress levels of LH and prolactin in adult male rats. *Biol Psychiatry* 24: 447-50
- Armario A, Valles A, Dal-Zotto S, Marquez C, Belda X (2004) A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the physiological response to the homotypic stressor. *Stress* 7: 157-72
- Babb JA, Masini CV, Day HE, Campeau S (2014) Habituation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones to repeated homotypic stress and subsequent heterotypic stressor exposure in male and female rats. *Stress* 17: 224-34
- Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (2004) Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 81: 162-6
- 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
- Belda X, Márquez 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
- Bentz D, Michael T, de Quervain DJ, Wilhelm FH (2010) Enhancing exposure therapy for anxiety disorders with glucocorticoids: from basic mechanisms of emotional learning to clinical applications. *J Anxiety Disord* 24: 223-30
- Berridge CW, Dunn AJ (1989) Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine-stimulated release of CRF. *J Neurosci* 9: 3513-21
- Bhatnagar S, Dallman M (1998) Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84: 1025-39
- Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P (2002) Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J Neuroendocrinol* 14: 403-10
- Bhatnagar S, Meaney MJ (1995) Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol* 7: 97-108
- Bhatnagar S, Viau V, Chu A, Soriano L, Meijer OC, Dallman MF (2000) A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Neurosci* 20: 5564-73
- Bhatnagar S, Vining C (2003) Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* 43: 158-65
- 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
- Biedenkapp JC, Rudy JW (2007) Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learn Mem* 14: 200-3

- Bijlsma EY, van Leeuwen ML, Westphal KG, Olivier B, Groenink L (2011) Local repeated corticotropin-releasing factor infusion exacerbates anxiety- and fear-related behavior: differential involvement of the basolateral amygdala and medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 173: 82-92.
- Binder EB, Nemeroff CB (2010) The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 15: 574-88
- 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
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab* 19: 175-80
- Boudaba C, Szabo K, Tasker JG (1996) Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci* 16: 7151-60
- Breese GR, Knapp DJ, Overstreet DH (2004) Stress sensitization of ethanol withdrawal-induced reduction in social interaction: inhibition by CRF-1 and benzodiazepine receptor antagonists and a 5-HT_{1A}-receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 29: 470-82
- 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 (Berl)* 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
- 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
- Cador M, Cole BJ, Koob GF, Stinus L, Le Moal M (1993) Central administration of corticotropin releasing factor induces long-term sensitization to D-amphetamine. *Brain Res* 606: 181-6
- Caggiula AR, Antelman SM, Aul E, Knopf S, Edwards DJ (1989) Prior stress attenuates the analgesic response but sensitizes the corticosterone and cortical dopamine responses to stress 10 days later. *Psychopharmacology (Berl)* 99: 233-7
- Cain DW, Cidlowski JA (2015) Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29: 545-56
- Calfa G, Volosin M, Molina VA (2006) Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behav Brain Res* 172: 324-32
- Calvo N, Martijena ID, Molina VA, Volosin M (1998) Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. *Brain Res* 800: 227-35
- Calvo N, Volosin M (2001) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. *Neuroendocrinology* 73: 261-71
- Campeau S, Dolan D, Akil H, Watson SJ (2002) c-fos mRNA induction in acute and chronic audiogenic stress: possible role of the orbitofrontal cortex in habituation. *Stress* 5: 121-130
- Campeau S, Nyhuis TJ, Sasse SK, Day HE, Masini CV (2008) Acute and chronic effects of ferret odor exposure in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1277-86
- 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

- Campmany L, Pol O, Armario A (1996) The effects of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 517-23
- Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA (1995) Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Res Bull* 36: 209-13
- Chaijale NN, Curtis AL, Wood SK, Zhang XY, Bhatnagar S, Reyes BA, Van Bockstaele EJ, Valentino RJ (2013) Social stress engages opioid regulation of locus coeruleus norepinephrine neurons and induces a state of cellular and physical opiate dependence. *Neuropsychopharmacology* 38: 1833-43
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67: 259-84
- Chen J, Young S, Subburaju S, Sheppard J, Kiss A, Atkinson H, Wood S, Lightman S, Serradeil-Le Gal C, Aguilera G (2008) Vasopressin does not mediate hypersensitivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 349-59
- 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
- Christianson JP, Benison AM, Jennings J, Sandsmark EK, Amat J, Kaufman RD, Baratta MV, Paul ED, Campeau S, Watkins LR, Barth DS, Maier SF (2008) The sensory insular cortex mediates the stress-buffering effects of safety signals but not behavioral control. *J Neurosci* 28: 13703-11
- Christianson JP, Jennings JH, Ragole T, Flyer JG, Benison AM, Barth DS, Watkins LR, Maier SF (2011) Safety signals mitigate the consequences of uncontrollable stress via a circuit involving the sensory insular cortex and bed nucleus of the stria terminalis. *Biol Psychiatry* 70: 458-64
- Chung KK, Martinez M, Herbert J (2000) c-fos expression, behavioural, endocrine and autonomic responses to acute social stress in male rats after chronic restraint: modulation by serotonin. *Neuroscience* 95: 453-63
- Cohen H, Matar MA, Buskila D, Kaplan Z, Zohar J (2008) Early post-stressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 64: 708-717
- Cohen H, Zohar J, Gidron Y, Matar MA, Belkind D, Loewenthal U, Kozlovsky N, Kaplan Z (2006). Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biol Psychiatry* 59: 1208-1218
- Cohen H, Zohar J, Matar MA, Zeev K, Loewenthal U, Richter-Levin G (2004) Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 1962-70
- Cole BJ, Cador M, Stinus L, Rivier J, Vale W, Koob GF, Le Moal M (1990) Central administration of a CRF antagonist blocks the development of stress-induced behavioral sensitization. *Brain Res* 512: 343-6
- Cole MA, Kalman BA, Pace TW, Topczewski F, Lowrey MJ, Spencer RL (2000) Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. *J Neuroendocrinol* 12: 1034-42
- 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
- Cordero MI, Venero C, Kruyt ND, Sandi C (2003) Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats. Evidence for a role of corticosterone. *Horm Behav* 44: 338-45

- Cuadra G, Zurita A, Gioino G, Molina V (2001) Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 25: 384-94
- 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 (1993) Stress update Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* 4: 62-9
- Dallman MF, Akana SF, Laugero KD, Gomez F, Manalo S, Bell ME, Bhatnagar S (2003) A spoonful of sugar: feedback signals of energy stores and corticosterone regulate responses to chronic stress. *Physiol Behav* 79: 3-12
- Dallman MF, Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Walker CD, Strack AM, Cascio CS (1992) Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of neuroendocrinology* 4: 517-26
- Dallman MF, Jones MT (1973) Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* 92: 1367-75
- 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 (2003) Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 28: 992-1009
- 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, Delgado R, Armario A (2004) Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress. *Psychopharmacology (Berl)* 177: 230-7
- Daviu N, Andero R, Armario A, Nadal R (2014a) Sex differences in the behavioural and hypothalamic-pituitary-adrenal response to contextual fear conditioning in rats. *Horm Behav* 66: 713-23
- 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 (2014b) 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, Masini CV, Campeau S (2009) Reversible inactivation of the auditory thalamus disrupts HPA axis habituation to repeated loud noise stress exposures. *Brain Res* 1276: 123-30
- 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

- De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* 47: 1117-24
- De Boer SF, Van der Gugten J, Slangen JL (1989) Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol Behav* 45: 789-95
- 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 (2013) Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur J Pharmacol* 719: 53-62
- de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E (2009) Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res* 1293: 129-141
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999) Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22: 422-6
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301
- Di Chiara G, Loddo P, Tanda G (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. *Biol Psychiatry* 46: 1624-33
- 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
- Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG (2009) Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci* 29: 393-401
- 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
- Dobrakovova M, Jurcovicova J (1984) Corticosterone and prolactin responses to repeated handling and transfer of male rats. *Exp Clin Endocrinol* 83: 21-7
- 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
- Enthoven L, Oitzl MS, Koning N, van der Mark M, de Kloet ER (2008) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology* 149: 6366-77
- 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
- Fanselow MS (1981) Naloxone and Pavlovian fear conditioning. *Learn and Motivation* 12: 398-419
- Fanselow MS (1990) Factors governing one-trial contextual conditioning. *Anim. Learn. Behav.* 18: 264-70

- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743-60
- Ferland CL, Harris EP, Lam M, Schrader LA (2014) Facilitation of the HPA axis to a novel acute stress following chronic stress exposure modulates histone acetylation and the ERK/MAPK pathway in the dentate gyrus of male rats. *Endocrinology* 155: 2942-52
- Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Dolgas CM, Herman JP (2003a) Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144: 5249-58
- Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP (2003b) 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
- Filaretov AA, Balashov Yu G (1988) Corticosteroid feedback: I. General characteristics, role of adrenal cortex. *Exp Clin Endocrinol* 91: 143-8
- File SE, Vellucci SV, Wendlandt S (1979) Corticosterone -- an anxiogenic or an anxiolytic agent? *J Pharm Pharmacol* 31: 300-5
- File SE, Zangrossi H, Jr., Sanders FL, Mabbutt PS (1993) Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol Behav* 54: 1109-11
- 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
- Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 24: 19-30
- Frank MG, Thompson BM, Watkins LR, Maier SF (2012) Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun* 26: 337-45
- Frank MG, Watkins LR, Maier SF (2013) Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain Behav Immun* 33: 1-6
- Frankland PW, Cestari V, Filipkowski RK, McDonald RJ, Silva AJ (1998) The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behav Neurosci* 112: 863-74
- 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
- García A, Armario A (2001) Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology* 26: 363-74
- García A, Martí O, Vallés 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
- George SA, Knox D, Curtis AL, Aldridge JW, Valentino RJ, Liberzon I (2013) Altered locus coeruleus-norepinephrine function following single prolonged stress. *Eur J Neurosci* 37: 901-9

- Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL (2006) Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* 138: 1067-81
- Glazer HI, Weiss JM, Pohorecky LA, Miller NE (1975) Monamines as mediators of avoidance-escape behavior. *Psychosom Med* 37: 535-43
- Goldstein DS, Kopin IJ (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10: 109-20
- Gonzalez F, Quinn JJ, Fanselow MS (2003) Differential effects of adding and removing components of a context on the generalization of conditional freezing. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 29: 78-83
- Graessler J, Kvetnansky R, Jezova D, Dobrakovova M, Van Loon GR (1989) Prior immobilization stress alters adrenal hormone responses to hemorrhage in rats. *Am J Physiol* 257: R661-7
- Gray M, Innala L, Viau V (2012) Central vasopressin V1A receptor blockade impedes hypothalamic-pituitary-adrenal habituation to repeated restraint stress exposure in adult male rats. *Neuropsychopharmacology* 37: 2712-9
- Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM (1994) Stress-induced sensitization of dopamine and norepinephrine efflux in medial prefrontal cortex of the rat. *J Neurochem* 63: 575-83
- Grissom N, Bhatnagar S (2009) Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem* 92: 215-24
- Grissom N, Kerr W, Bhatnagar S (2008) Struggling behavior during restraint is regulated by stress experience. *Behav Brain Res* 191: 219-26
- 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 (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol* 350: 299-309
- 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
- Harada K, Yamaji T, Matsuoka N (2008) Activation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 11-6
- Hardin JW, Hilbe JM (2003) *Generalized estimating equations*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton
- Hauger RL, Aguilera G (1992) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptors and hypothalamic pituitary adrenal axis responsiveness during cold stress. *J Neuroendocrinol* 4: 617-24
- Hauger RL, Lorang M, Irwin M, Aguilera G (1990) CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. *Brain Res* 532: 34-40
- 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
- Hayley S, Merali Z, Anisman H (2003) Stress and cytokine-elicited neuroendocrine and neurotransmitter sensitization: implications for depressive illness. *Stress* 6: 19-32

- Heinrichs SC, De Souza EB, Schulteis G, Lapsansky JL, Grigoriadis DE (2002) Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharmacology* 27: 194-202
- Henley DE, Lightman SL (2011) New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience* 180: 1-8
- 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, Dolgas CM, Carlson SL (1998) Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86: 449-59
- 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, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B (2012) Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 45: 292-8
- 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, Prewitt CM, Cullinan WE (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10: 371-94
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Vau V (2010) Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9406-11
- Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 14: 259-68
- Holmes MC, Seckl JR (2006) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Mol Cell Endocrinol* 248: 9-14
- Houston FP, Stevenson GD, McNaughton BL, Barnes CA (1999) Effects of age on the generalization and incubation of memory in the F344 rat. *Learn Mem* 6: 111-9
- Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamawaki S (2006) Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. *Behav Brain Res* 173: 129-37
- Iwamoto Y, Morinobu S, Takahashi T, Yamawaki S (2007) Single prolonged stress increases contextual freezing and the expression of glycine transporter 1 and vesicle-associated membrane protein 2 mRNA in the hippocampus of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 642-51
- 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

- Jaferi A, Bhatnagar S (2007) Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Res* 1186: 212-223.
- Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S (2003) Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiol Behav* 78: 365-73
- Jankord R, Herman JP (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 64-73
- Jedema HP, Finlay JM, Sved AF, Grace AA (2001) Chronic cold exposure potentiates CRH-evoked increases in electrophysiologic activity of locus coeruleus neurons. *Biol Psychiatry* 49: 351-9
- Jedema HP, Gold SJ, Gonzalez-Burgos G, Sved AF, Tobe BJ, Wensel T, Grace AA (2008) Chronic cold exposure increases RGS7 expression and decreases alpha(2)-autoreceptor-mediated inhibition of noradrenergic locus coeruleus neurons. *Eur J Neurosci* 27: 2433-43
- Jedema HP, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM (1999) Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain Res* 830: 211-7
- Jenkins JS, Meakin JW, Nelson DH, Thorn GW (1958) Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* 128: 478-80
- Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Spencer RL, Watkins LR, Maier SF (2002a) Prior stressor exposure primes the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 27: 353-65
- Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Stark M, Watkins LR, Maier SF (2002b) Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* 16: 461-76
- Johnson JD, O'Connor KA, Hansen MK, Watkins LR, Maier SF (2003) Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R422-32
- Johnson JD, O'Connor KA, Watkins LR, Maier SF (2004) The role of IL-1beta in stress-induced sensitization of proinflammatory cytokine and corticosterone responses. *Neuroscience* 127: 569-577
- 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
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16: 223-44
- Kant GJ, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL (1983) Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 967-71
- Kant GJ, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL (1985) Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 631-4
- Karssen AM, Meijer O, Pons D, De Kloet ER (2004) Localization of mRNA expression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier and in the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 1032: 308-11
- Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, Lucassen PJ, de Lange EC, de Boer AG, de Kloet ER (2001) Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* 142: 2686-94
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19204-7

- Kearns RR, Spencer RL (2013) An unexpected increase in restraint duration alters the expression of stress response habituation. *Physiol Behav* 122: 193-200
- Keck ME, Welt T, Wigger A, Renner U, Engelmann M, Holsboer F, Landgraf R (2001) The anxiolytic effect of the CRH(1) receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats. *Eur J Neurosci* 13: 373-80
- 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
- Kennett GA, Chaouloff F, Marcou M, Curzon G (1986) Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. *Brain Res* 382: 416-21
- Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G (1985) Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur J Pharmacol* 119: 143-52
- Kitada Y, Miyauchi T, Satoh A, Satoh S (1981) Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 72: 145-52
- Knox D, George SA, Fitzpatrick CJ, Rabinak CA, Maren S, Liberzon I (2012a) Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. *Learn Mem* 19: 43-9
- Knox D, Nault T, Henderson C, Liberzon I (2012b) Glucocorticoid receptors and extinction retention deficits in the single prolonged stress model. *Neuroscience* 223: 163-73
- Kohda K, Harada K, Kato K, Hoshino A, Motohashi J, Yamaji T, Morinobu S, Matsuoka N, Kato N (2007) Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience* 148: 22-33
- Kollack-Walker S, Don C, Watson SJ, Akil H (1999) Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. *J Neuroendocrinol* 11: 547-59
- Konarska M, Stewart RE, McCarty R (1989) Sensitization of sympathetic-adrenal medullary responses to a novel stressor in chronically stressed laboratory rats. *Physiol Behav* 46: 129-35
- Konarska M, Stewart RE, McCarty R (1990) Habituation and sensitization of plasma catecholamine responses to chronic intermittent stress: effects of stressor intensity. *Physiol Behav* 47: 647-52
- Koob GF (2010) The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 1314: 3-14
- Koob GF, Heinrichs SC (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848: 141-52
- 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, Hermann PM, Kemperman C, Bohus B, van den Hoofdakker RH, Beersma DGM (1990) Single social defeat in male rats induces a gradual but long lasting behavioural change: a model of depression? *Neuroscience Research Communications* 7: 35-41
- 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, De Boer SF (2003) A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463: 163-75
- Kovács KJ, Miklós I, Bali B (2005) Psychological and physiological stressors. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM (eds) *Handbook of stress and the brain*. Elsevier B.V., Baltimore, pp 775-792
- Kuperman Y, Chen A (2008) Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 19: 122-9
- Kvetnansky R (2004) Stressor specificity and effect of prior experience on catecholamine biosynthetic enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase. *Ann N Y Acad Sci* 1032: 117-29
- Kvetnansky R, McCarty R (2000) Adrenal medulla. In: Fink G (ed) *Encyclopedia of stress*. Academic Press, San Diego, pp 63-70
- Kvetnansky R, Mikulaj L (1970) Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87: 738-43
- Kvetnansky R, Nemeth S, Vigas M, Oprsalova Z, Jurcovicova J (1984) Plasma catecholamines in rats during adaptation to intermittent exposure to different stressors. In: Usdin E, Kvetnansky R, Axelrod J (eds) *The role of catecholamines and other neurotransmitters*. Gordon & Breach Sci Publ, New York, pp 537-62
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89: 535-606
- la Fleur SE, Houshyar H, Roy M, Dallman MF (2005) Choice of lard, but not total lard calories, damps adrenocorticotropin responses to restraint. *Endocrinology* 146: 2193-9
- Lachuer J, Delton I, Buda M, Tappaz M (1994) The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 638: 196-202
- 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
- Larauche M, Mulak A, Tache Y (2012) Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Exp Neurol* 233: 49-67
- Laugero KD, Bell ME, Bhatnagar S, Soriano L, Dallman MF (2001) Sucrose ingestion normalizes central expression of corticotropin-releasing-factor messenger ribonucleic acid and energy balance in adrenalectomized rats: a glucocorticoid-metabolic-brain axis? *Endocrinology* 142: 2796-804
- Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behav Brain Res* 145: 89-98
- Lazarowski A, Caltana L, Merelli A, Rubio MD, Ramos AJ, Brusco A (2007) Neuronal mdr-1 gene expression after experimental focal hypoxia: a new obstacle for neuroprotection? *J Neurol Sci* 258: 84-92
- Lazarus RS (1993) From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol* 44: 1-21
- Le Mevel JC, Abitbol S, Beraud G, Maniey J (1979) Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. *Endocrinology* 105: 812-7
- Le Moal M (2007) Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1: S3-9

- LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23: 727-38
- Lehnert H, Reinstein DK, Strowbridge BW, Wurtman RJ (1984) Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrollable stress: effects of dietary tyrosine. *Brain Res* 303: 215-23
- Levine S (2005) Stress: an historical perspective. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM (eds) *Handbook of Stress and the Brain*. Elsevier B.V., Baltimore, pp 3-23
- Lightman SL, Conway-Campbell BL (2010) The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11: 710-8
- Lilly MP, Engeland WC, Gann DS (1982) Adrenal medullary responses to repeated hemorrhage in the anesthetized dog. *Endocrinology* 111: 1917-24
- Lilly MP, Engeland WC, Gann DS (1983) Responses of cortisol secretion to repeated hemorrhage in the anesthetized dog. *Endocrinology* 112: 681-8
- Lilly MP, Engeland WC, Gann DS (1986) Pituitary-adrenal responses to repeated small hemorrhage in conscious dogs. *Am J Physiol* 251: R1200-7
- Ma S, Morilak DA (2005) Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 17: 761-9
- Ma XM, Lightman SL (1998) The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol* 510 (Pt 2): 605-14
- Ma XM, Lightman SL, Aguilera G (1999) Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology* 140: 3623-32
- Maier SF, Kalman BA, Grahn RE (1994) Chlordiazepoxide microinjected into the region of the dorsal raphe nucleus eliminates the interference with escape responding produced by inescapable shock whether administered before inescapable shock or escape testing. *Behav Neurosci* 108: 121-30
- Makino S, Smith MA, Gold PW (2002) Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res* 943: 216-23
- Mana MJ, Grace AA (1997) Chronic cold stress alters the basal and evoked electrophysiological activity of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 81: 1055-64
- Mansi JA, Drolet G (1997) Chronic stress induces sensitization in sympathoadrenal responses to stress in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol* 272: R813-20
- Maras PM, Baram TZ (2012) Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci* 35: 315-24
- Maren S (2008) Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci* 28: 1661-6
- 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
- Marquez C, Nadal R, Armario A (2004) The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123: 601-12
- Martí O, Andrés R, Armario A (1999) Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *Am J Physiol* 277: R869-77

- Martí O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16: 241-60
- Martí O, García A, Vallés 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
- Martí O, Gavalda A, Gómez F, Armario A (1994) Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology* 60: 1-7
- Martí O, Gavalda A, Jolín T, Armario A (1996) Acute stress attenuates but does not abolish circadian rhythmicity of serum thyrotrophin and growth hormone in the rat. *Eur J Endocrinol* 135: 703-8
- Martí O, Martín M, Gavalda A, Giralt M, Hidalgo J, Hsu BR, Kuhn RW, Armario A (1997) Inhibition of corticosteroid-binding globulin caused by a severe stressor is apparently mediated by the adrenal but not by glucocorticoid receptors. *Endocrine* 6: 159-64
- Mason BL, Pariante CM, Thomas SA (2008) A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology* 149: 5244-53
- Mason JW (1968) A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom Med* 30: Suppl:576-607
- Maswood S, Barter JE, Watkins LR, Maier SF (1998) Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res* 783: 115-20
- McCarty R, Horwatt K, Konarska M (1988) Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc Sci Med* 26: 333-41
- McCulloch C, Searle S (2001) Generalized, linear and mixed models. John Wiley & Sons, John Wiley & Sons
- McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ (2005) Differential gene expression in WKY and SHR brain following acute and chronic air-puff stress. *Brain Res Mol Brain Res* 133: 329-36
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840: 33-44
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1-28
- Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER (1998) Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* 139: 1789-93
- Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Bloom FE, Wilson MC (1994) Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci* 14: 5929-38
- Miguel TT, Gomes KS, Nunes-de-Souza RL (2014) Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). *Horm Behav* 66: 247-256.
- Moncek F, Aguilera G, Jezova D (2003) Insufficient activation of adrenocortical but not adrenomedullary hormones during stress in rats subjected to repeated immune challenge. *J Neuroimmunol* 142: 86-92

- 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
- Muñoz-Abellán C, Andero R, Nadal R, Armario A (2008) Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1139-50
- Muñoz-Abellán C, Rabasa C, Daviu N, Nadal R, Armario A (2011) Behavioral and endocrine consequences of simultaneous exposure to two different stressors in rats: interaction or independence? *PLoS One* 6: e21426
- Murua VS, Molina VA (1990) Desipramine and restraint stress induce odor conditioned aversion in rats: suppression by repeated conditioning. *Psychopharmacology (Berl)* 102: 503-6
- Myers B, Carvalho-Netto E, Wick-Carlson D, Wu C, Naser S, Solomon MB, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2015) GABAergic Signaling within a Limbic-Hypothalamic Circuit Integrates Social and Anxiety-Like Behavior with Stress Reactivity. *Neuropsychopharmacology*
- Myers B, Mark Dolgas C, Kasckow J, Cullinan WE, Herman JP (2014) Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct Funct* 219: 1287-303
- Myers B, Mcklveen JM, Herman JP (2012) Neural regulation of the stress response: the many faces of feedback. *Cell Mol Neurobiol* 32: 683-94
- Natelson B H, Creighton D, McCarty R, Tapp WN, Pitman D, Ottenweller JE (1987) Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* 39: 117-125
- Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* 43: 41-6
- Netto SM, Silveira R, Coimbra NC, Joca SR, Guimaraes FS (2002) Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 1135-41
- Nisenbaum LK, Zigmond MJ, Sved AF, Abercrombie ED (1991) Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *J Neurosci* 11: 1478-84
- O'Connor KA, Ginsberg AB, Maksimova E, Wieseler Frank JL, Johnson JD, Spencer RL, Campeau S, Watkins LR, Maier SF (2004) Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression. *Neuroendocrinology* 80: 252-63
- O'Connor KA, Johnson JD, Hammack SE, Brooks LM, Spencer RL, Watkins LR, Maier SF (2003) Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 28: 481-500
- Olson VG, Rockett HR, Reh RK, Redila VA, Tran PM, Venkov HA, Defino MC, Hague C, Peskind ER, Szot P, Raskind MA (2011) The role of norepinephrine in differential response to stress in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 70: 441-8
- Ons S, Rotllant D, Marin-Blasco IJ, Armario A (2010) Immediate-early gene response to repeated immobilization: Fos protein and arc mRNA levels appear to be less sensitive than c-fos mRNA to adaptation. *Eur J Neurosci* 31: 2043-52
- Orr TE, Meyerhoff JL, Mougey EH, Bunnell BN (1990) Hyperresponsiveness of the rat neuroendocrine system due to repeated exposure to stress. *Psychoneuroendocrinology* 15: 317-28

- Overmier JB, Murison R, Milde AM (2006) Sensitization and conditioning as contributors to gastrointestinal vulnerability. *Auton Neurosci* 125: 22-7
- Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22: 502-48
- Pamplona FA, Henes K, Micale V, Mauch CP, Takahashi RN, Wotjak CT (2011) Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *J Psychiatr Res* 45: 354-60
- Pardon MC, Ma S, Morilak DA (2003) Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. *Brain Res* 971: 55-65
- Pastor-Ciurana J, Rabasa C, Ortega-Sanchez JA, Sanchis-Olle M, Gabriel-Salazar M, Ginesta M, Belda X, Daviu N, Nadal R, Armario A (2014) Prior exposure to repeated immobilization or chronic unpredictable stress protects from some negative sequels of an acute immobilization. *Behav Brain Res* 265: 155-62
- 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
- Pijlman FT, Herremans AH, van de Kieft J, Kruse CG, van Ree JM (2003) Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after physical, but not emotional stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 369-80
- Pijlman FT, van Ree JM (2002) Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. *Behav Brain Res* 136: 365-73
- Plaznik A, Stefanski R, Kostowski W (1989) Restraint stress-induced changes in saccharin preference: the effect of antidepressive treatment and diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 33: 755-9
- 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, Deniel M, Jalfre M (1979) Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 57: 431-6
- Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1993) Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav* 54: 1215-20
- Rabasa C, Delgado-Morales R, Gomez-Roman A, Nadal R, Armario A (2013) Adaptation of the pituitary-adrenal axis to daily repeated forced swim exposure in rats is dependent on the temperature of water. *Stress* 16: 698-705
- Rabasa C, Delgado-Morales R, Munoz-Abellan C, Nadal R, Armario A (2011a) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav Brain Res* 217: 232-9
- Rabasa C, Gagliano H, Pastor-Ciurana J, Fuentes S, Belda X, Nadal R, Armario A (2015a) 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 (2011b) Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav* 103: 125-33
- Rabasa C, Pastor-Ciurana J, Delgado-Morales R, Gomez-Roman A, Carrasco J, Gagliano H, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J, Armario A (2015b) Evidence against a critical role of CB1 receptors in adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and other consequences of daily repeated stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 1248-59

- Radley JJ (2012) Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Front Behav Neurosci* 6: 7
- 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, Kabbaj M, Jacobson L, Heydendael W, Yehuda R, Herman JP (2011) Stress risk factors and stress-related pathology: neuroplasticity, epigenetics and endophenotypes. *Stress* 14: 481-97
- 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
- Rahn EJ, Guzman-Karlsson MC, David Sweatt J (2013) Cellular, molecular, and epigenetic mechanisms in non-associative conditioning: implications for pain and memory. *Neurobiol Learn Mem* 105: 133-50
- Rainnie DG, Bergeron R, Sajdyk TJ, Patil M, Gehlert DR, Shekhar A (2004) Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *J Neurosci* 24: 3471-9
- Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, de Kloet ER (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50: 117-23
- Rau V, DeCola JP, Fanselow MS (2005) Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1207-23
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-11
- Richter-Levin G (1998) Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma--potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res* 79: 73-83
- Robinson TE, Berridge KC (2008) Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3137-46
- Rotllant D, Armario A (2005) A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroscience* 130: 427-34
- Rotllant D, Ons S, Carrasco J, Armario A (2002) Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary-adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur J Neurosci* 16: 693-700
- Rusnak M, Kvetnansky R, Jelokova J, Palkovits M (2001) Effect of novel stressors on gene expression of tyrosine hydroxylase and monoamine transporters in brainstem noradrenergic neurons of long-term repeatedly immobilized rats. *Brain Res* 899: 20-35
- Ryan KK, Grayson BE, Jones KR, Schneider AL, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, Ulrich-Lai YM (2012) Physiological responses to acute psychological stress are reduced by the PPARgamma agonist rosiglitazone. *Endocrinology* 153: 1279-87
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37: 577-82
- Sakellaris PC, Vernikos-Danellis J (1975) Increased rate of response of the pituitary-adrenal system in rats adapted to chronic stress. *Endocrinology* 97: 597-602
- 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

- Sauerhofer E, Pamplona FA, Bedenk B, Moll GH, Dawirs RR, von Horsten S, Wotjak CT, Golub Y (2012) Generalization of contextual fear depends on associative rather than non-associative memory components. *Behav Brain Res* 233: 483-93
- 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 (1985) Localization, colocalization, and plasticity of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in rat brain. *Fed Proc* 44: 221-7
- Schmidt ED, Aguilera G, Binnekade R, Tilders FJ (2003) Single administration of interleukin-1 increased corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone-receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus which paralleled long-lasting (weeks) sensitization to emotional stressors. *Neuroscience* 116: 275-83
- Schmidt ED, Janszen AW, Wouterlood FG, Tilders FJ (1995) Interleukin-1-induced long-lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH)-neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Neurosci* 15: 7417-26
- 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 MV, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Muller MB, Holsboer F, de Kloet ER (2005) Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology* 146: 1458-64
- Schwabe L, Joels M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS (2012) Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1740-9
- Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 38: 32
- Servatius RJ, Beck KD, Moldow RL, Salameh G, Tumminello TP, Short KR (2005) A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity. *Biol Psychiatry* 57: 865-72
- Servatius RJ, Ottenweller JE, Bergen MT, Soldan S, Natelson BH (1994) Persistent stress-induced sensitization of adrenocortical and startle responses. *Physiol Behav* 56: 945-54
- 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
- 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

- Smith R, Lovelock M, Owens PC, Chan EC, Falconer J (1988) The effect of repetitive haemorrhage on plasma cortisol, beta-endorphin and N-terminal pro-opiomelanocortin in conscious sheep. *Horm Metab Res* 20: 612-5
- Spiga F, Harrison LR, MacSweeney CP, Thomson FJ, Craighead M, Lightman SL (2009) Effect of vasopressin 1b receptor blockade on the hypothalamic-pituitary-adrenal response of chronically stressed rats to a heterotypic stressor. *J Endocrinol* 200: 285-91
- Stam R (2007) PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 1: human studies. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 530-57
- Stam R, Croiset G, Akkermans LM, Wiegant VM (1996) Sensitization of the colonic response to novel stress after previous stressful experience. *Am J Physiol* 271: R1270-3
- Stam R, van Laar TJ, Akkermans LM, Wiegant VM (2002) Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation. *Behav Brain Res* 132: 69-76
- Steketee JD, Kalivas PW (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 63: 348-65
- Swanson LW, Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6: 269-324
- Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW, Rho JH (1987) The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Ann N Y Acad Sci* 512: 12-23
- Takahashi T, Morinobu S, Iwamoto Y, Yamawaki S (2006) Effect of paroxetine on enhanced contextual fear induced by single prolonged stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 189: 165-73
- Takei S, Morinobu S, Yamamoto S, Fuchikami M, Matsumoto T, Yamawaki S (2011) Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 45: 460-8
- Tanimura SM, Watts AG (1998) Corticosterone can facilitate as well as inhibit corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139: 3830-6
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147: 5549-56
- Tavares RF, Correa FM, Resstel LB (2009) Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87: 2601-7
- Thrivikraman KV, Plotsky PM (1993) Absence of glucocorticoid negative feedback to moderate hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 264: E497-503
- Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, Day TA, Walker FR (2010) Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun* 24: 1058-68
- Uchoa ET, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, de Sousa MB (2014) Novel aspects of glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol* 26: 557-72
- Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC (2006a) Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1128-35
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP (2006b) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E965-73
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409

- Umemoto S, Kawai Y, Senba E (1994a) Differential regulation of IEGs in the rat PVH in single and repeated stress models. *Neuroreport* 6: 201-4
- Umemoto S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E (1997) Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of NGFI-A. *Neuroscience* 80: 763-73
- Umemoto S, Noguchi K, Kawai Y, Senba E (1994b) Repeated stress reduces the subsequent stress-induced expression of Fos in rat brain. *Neurosci Lett* 167: 101-4
- Ursin H (2014) Brain sensitization to external and internal stimuli. *Psychoneuroendocrinology* 42: 134-45
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio DA, Herman JP (2005) Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E823-8
- Vallès A, Martí 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
- Vallès A, Martí O, Armario A (2006) Long-term effects of a single exposure to immobilization: a c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol* 66: 591-602
- Vallès A, Martí O, Harbuz MS, Armario A (2002) A single lipopolysaccharide administration is sufficient to induce a long-term desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 112: 383-9
- Van den Berg CL, Lamberts RR, Wolterink G, Wiegant VM, Van Ree JM (1998) Emotional and footshock stimuli induce differential long-lasting behavioural effects in rats; involvement of opioids. *Brain Res* 799: 6-15
- 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, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ (1992a) Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52: 945-51
- Van Dijken HH, Tilders FJ, Olivier B, Mos J (1992b) Effects of anxiolytic and antidepressant drugs on long-lasting behavioural deficits resulting from one short stress experience in male rats. *Psychopharmacology (Berl)* 109: 395-402
- Van Dijken HH, Van der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ (1992c) Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in male rats. *Physiol Behav* 51: 787-94
- Van Raaij MT, Dobbe CJ, Elvers B, Timmerman A, Schenk E, Oortgiesen M, Wiegant VM (1997) Hormonal status and the neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving subchronic noise exposure. *Neuroendocrinology* 65: 200-9
- Van Winkel R, Stefanis NC, Myin-Germeys I (2008) Psychosocial stress and psychosis. A review of the neurobiological mechanisms and the evidence for gene-stress interaction. *Schizophr Bull* 34: 1095-105
- Vigas M (1984) Problems of definition of stress stimulus and specificity of stress response. In: .Publ. EUeaGaBS (ed) *Stress, the role of catecholamines and other neurotransmitters: proceeding of the third international symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress*, pp 22-35
- Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Loscher W (2004) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience* 123: 751-9

- Wang W, Liu Y, Zheng H, Wang HN, Jin X, Chen YC, Zheng LN, Luo XX, Tan QR (2008) A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neurosci Lett* 441: 237-41
- Watts AG (1996) The impact of physiological stimuli on the expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and other neuropeptide genes. *Front Neuroendocrinol* 17: 281-326
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 26: 109-30
- Weinberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, Campeau S, Spencer RL (2009) Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinology* 150: 749-61
- Weinberg MS, Grissom N, Paul E, Bhatnagar S, Maier SF, Spencer RL (2010a) Inescapable but not escapable stress leads to increased struggling behavior and basolateral amygdala c-fos gene expression in response to subsequent novel stress challenge. *Neuroscience* 170: 138-48
- Weinberg MS, Johnson DC, Bhatt AP, Spencer RL (2010b) Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation. *Neuroscience* 168: 744-56
- Weiss JM (1972) Psychological factors in stress and disease. *Sci Am* 226: 104-13
- Weiss JM, Glazer HI (1975a) Effects of acute exposure to stressors on subsequent avoidance-escape behavior. *Psychosom Med* 37: 499-521
- Weiss JM, Glazer HI, Pohorecky LA, Brick J, Miller NE (1975b) Effects of chronic exposure to stressors on avoidance-escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosom Med* 37: 522-34
- Wiltgen BJ, Silva AJ (2007) Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14: 313-7
- Wong YN, Cassano WJ, Jr., D'Mello AP (2000) Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology* 71: 354-65
- Woodmansee WW, Silbert LH, Maier SF (1993) Factors that modulate inescapable shock-induced reductions in daily activity in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 553-9
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-83
- Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Kurata A, Kozuru T, Yamawaki S (2008) Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology* 33: 2108-16
- Zhang R, Packard BA, Tauchi M, D'Alessio DA, Herman JP (2009) Glucocorticoid regulation of preproglucagon transcription and RNA stability during stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5913-8
- Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2002) Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 448: 217-29

Agradecimientos

Después de una etapa de más de 16 años en el laboratorio son muchas las personas a las que agradecerles el haberme ayudado en mi carrera científica, no solo a compañeros/as sino también a amigos/as y familia. Todos han tenido su papel relevante en aportarme el equilibrio necesario para mejorar a nivel profesional y personal: enseñanza, objetivos comunes, colaboración, apoyo, reconocimiento, afecto, alegría, comprensión...

Por supuesto que la primera persona a la que tengo que dar mis agradecimientos es a Antonio. Tú fuiste quien me dio la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación y quién me sigues enseñando a mejorar mi pensamiento y método crítico en el trabajo. Junto a Antonio, agradecer al otro pilar insustituible del grupo, Roser, la gran cantidad de conocimientos que me has aportado, tu preocupación porque todos mejoremos y tu disponibilidad para ayudarnos siempre que lo necesitamos. Ambos sois personas a las que admiro por vuestra capacidad de trabajo y dedicación, gracias a la cual el grupo HPA ha podido mantenerse todos estos años en una buena posición, pese a los tiempos de crisis que tanto han afectado a la investigación de este país. Agradecer también que durante todos estos años me hayáis hecho partícipe de los objetivos del grupo y confiado la responsabilidad de enseñar a las nuevas generaciones de científicos. Pero más allá de lo estrictamente laboral, agradecer el trato, la ayuda y el reconocimiento en otros ámbitos de la vida, que han derivado en el establecimiento de vínculos emocionales y que hacen que sienta que estoy trabajando con una segunda familia.

Puesto que, aparte de Antonio y Roser, también hay mucha gente a la que darle las gracias y no me gustaría olvidarme de nadie, considero que lo mejor es hacer el reconocimiento desde una perspectiva histórica.

Durante la carrera de biología mis aspiraciones profesionales estaban enfocadas al área de la genética. Eran dos los campos que me apasionaban, el estudio de la genética de poblaciones y la genética del sistema nervioso central. Esto me llevo a realizar las prácticas de empresa en la Unidad de Genética de la UAB con el Dr. Noel Xamena, a quien debo agradecerle el enseñarme las nociones básicas de trabajo en el laboratorio. Debido a esto, hubiese sido impensable venir a parar a la Unidad de Fisiología Animal de no ser por mi amistad con Miguel, quien me enseñó en qué consistía su trabajo (incluido las adrenalectomías) y me presentó a Antonio y al resto de compañeros de esa época (Paqui, Rosa, Arantxa, Octavi, Àstrid y Silvina). No recuerdo exactamente como lo hiciste Miguel, pero al final conseguiste que me sintiese atraído por tu trabajo y acabé pidiéndole a Antonio si podía formar parte de su grupo; justo cuando tú cambiaste de laboratorio... En definitiva, que supongo que debería agradecerte ser el primer responsable de mi deriva profesional ;-). Más allá de este detalle, tengo mucho que agradecerte a nivel profesional y como amigo. Siempre me has dado grandes consejos de ámbito laboral y, aún más importante, tu dedicación, profesionalidad, naturalidad, bondad, preocupación por los amigos, etc., hacen que te tenga como uno de mis mayores referentes para lo que aspiro a ser como persona.

En esos primeros años conocí a muchos compañeros/as que me hicieron engancharme a la Unidad de Fisiología Animal en general y al grupo HPA en particular. Tuve la inmensa

suerte de comenzar mis andaduras con una gran compañera, Cristina Márquez. Ambos vivíamos con gran emoción el poder trabajar en neurociencia, nos complementábamos en conocimientos y trabajábamos como si fuésemos una sola persona. Parecíamos dos niños con zapatos nuevos, trabajando duro pero siempre con una sonrisa en los labios. Muchas, muchas gracias Cristina por compartir conmigo esa ilusión, además de por enseñarme la importancia de la psicobiología en el campo de estudio del estrés y aportarme los conocimientos básicos de estadística (aunque posteriormente han sido Antonio y Roser quienes me han enseñado de forma más constante y extensa los conceptos y modalidades de análisis estadístico). Pero quien representó para mí el modelo de profesionalidad a seguir en esos inicios fue Àstrid. Gracias por enseñarme, aparte de varias técnicas de laboratorio, lo importante de la planificación, la responsabilidad, la formación teórica y la auto-exigencia para llegar a ser un buen científico.

Y cómo no!, dar las gracias a mi compañera Olga, otro ejemplo de profesionalidad y de persona capaz de hacerte sentir como en familia. No sé si consigo mostrarte el gran afecto que te tengo, que sin duda es mucho!! Gracias a Josep, ejemplo de responsabilidad y eficiencia en el trabajo, siempre dispuesto a ayudar en lo que necesites. Si todo el mundo fuese la mitad de bueno de lo que es Josep, de buen seguro que la vida sería más sencilla y todos seríamos más felices. Gracias Javier, todavía tengo la suerte de tenerte como compañero, sigo aprendiendo muchísimas cuestiones técnicas del laboratorio contigo y sé que puedo contar con tu ayuda [siempre y cuando tenga una chocolatina a mano ;-)]. También tengo que agradecer a Lluís, Juanma, Amalia y Mercè que desde el inicio y hasta la actualidad me hayáis hecho sentirme valorado y reconocido.

Ciertamente los inicios constituyeron una gran época en la que, salvando algunas circunstancias algo críticas, lo general era trabajar con ilusión. Siempre recordaré las sobremesas en las que entre Octavi, Quino, Pep, Abbas, Olga, Amalia y demás se liaban unas que no podías parar de reír... Además, un recuerdo especial para los compañeros/as de la AENC-UAB (Toni, Anna, Ana, Diego, Esther, Guillem, Ruben, Mar...). Con ellos aprendí a integrar el concepto de interdisciplinaridad y de lo enriquecedor que puede resultar compartir información entre compañeros que trabajamos en los diferentes ámbitos de estudio de las neurociencias (psicobiología, fisiología, bioquímica, citología/histología, etc). Qué grandes esas neurofarras!!!

Un especial agradecimiento a Mar. Companya ja durant la carrera, sempre m'has donat molt bons consells i has estat disposada a ajudar-me en tot el que calgués a nivell laboral y personal... Amb el temps has esdevingut una de les persones què més respecto, admiro y estimo amb bogeria... En definitiva, el que significa una verdadera amiga!!!

Y reapareció Joan Carles!! Qué gran descubrimiento!! Representación viviente de lo que significa ser un gran docente y un mejor compañero. Responsable de la maquetación de la mayoría de tesis que han salido de la Unidad en esta última década, incluida la mía actual. Moltíssimes gracies per moltes coses: per ajudar-me a millorar com a docent en aquells primers anys, per aportar sempre comentaris interessants, per ajudar-nos de

forma totalment desinteressada tant als meus companys com en a mi en les darreres passes de la tesi, i per tantes coses més... Tens tot el meu reconeixement i estima!!

Pasado algún tiempo llegó la primera promoción de nuevos becarios a los que enseñar: Raúl, el alma siempre inquieta del laboratorio; Sheila, que todo lo que tenía de buena persona y trabajadora lo tenía, con cariño, de entrópica; Silvia, una gran compañera que todavía tenemos la suerte de tener entre nosotros y a la que aprecio muchísimo; y David, el papá de la inmunohistoquímica en nuestro grupo. Gracias en especial a tu David per l'esforç que vas fer perquè el grup tirés endavant. Sempre he considerat que, tot i que podem tenir estratègies diferents, ens assemblem força en la idea que tenim del què es treballar en un laboratori compartit i has estat una de les persones amb les que he treballat més agust.

Y llegó Humberto!!!! Mi super-compañero desde que llegaste y confío que por muchos años más... El Gargamel del laboratorio a la caza de becarios "mugrientos". No nos engañas, todos sabemos que todo lo que tienes de gruñón lo tienes de buen corazón... No hace falta que te diga todo lo que te aprecio, ya lo percibes todos los días en el despacho...jeejeje.

Después de Humberto, una gran hornada de becarios: Almu, Raül Andero, y "les tres besones", Núria, Rabi y Peti. Almu, creo que actualmente eres muy feliz siendo mamá... te deseo que consigas siempre lo que desees en la vida. Raül, des d'un principi vas tenir les idees molt clares del que fer per aconseguir el que volies a nivell científic i el temps t'ha donat la raó; enhorabona!. Rabi, sempre has treballat com una ase i sempre amb un grau molt alt de resiliència... Estic molt orgullós de tu i de que haguem sigut companys. Peti, amor meu, que haig de dir de tu... vas demostrar ser una persona altament qualificada per a la recerca... tot i que ja saps que per a mi la teva vàlua es multiplica per infinit com a persona i amiga. Sé que no cal que t'ho digui, però sempre ocuparàs un gran espai en el meu cor i la meva ment... Núria, la meva "wife in science", no diré prou vegades l'enorme felicitat que ha representat per a mi tenir-te com a companya. Des del meu concepte del que es formar part d'un grup d'investigació, ets la persona més complerta que he conegut fins avui en dia... entrega a la teva feina, responsabilitat, estudi, ajuda als companys, compromís, dedicació en ensenyar als nous... tot això de ben segur que es traduirà en una carrera espectacular! Per últim, no puc deixar d'afegir en aquest grup a la Gemma, la mami de les tres bessones i companya i amiga de tot el grup HPA. Gracias Gemma per cuidar de les nenes i de tots nosaltres!!!

Posteriormente, llegaron Ancor y Naco. Nuestro Naco, un vasco a quien le gusta la guitarra flamenca y "les havaneres" y que pasa más frío que cualquiera de nosotros... la única explicación posible es una mutación genética multidimensional... jejejeje ;-). Gracias por tu compañerismo y afecto!! Ancor, estoy convencido de que conseguirás un buen sitio donde continuar con tu carrera científica y que de aquí a unos años te veremos como IP.

I finalmente la nueva generación, mi “scientific offspring”: Juanan, Maria y Jordi. Tots tres sabeu l’orgullós que em sento de vosaltres, de les ganes que poseu al laboratori, de lo molt que heu après i continueu aprenent, de lo extraordinàriament solidaris que sou amb els companys, de lo responsables que sou... què voleu que us digui el papa que no sapigueu, que us estimo pel que sou i pel que demostreu cada dia.

No quiero dejar de dar las gracias a otros compañeros que, aunque no han estado durante tanto tiempo con nosotros, sí que han hecho aportaciones muy valiosas. Camilo, gracias por tu esfuerzo... los campos abiertos siempre nos recordarán tu estancia con nosotros. Norma, muchas gracias por tu dedicación y cariño... nos demostraste que nunca es tarde para conseguir lo que uno desea en la vida. Pedro, qué grande eres!!! No tengo más que admiración por ti y, si has dejado la ciencia por hacer otro trabajo que te llena más, lo único que puedo decir es que el mundo científico a perdido a un grandísimo cerebro... pero qué le den!!, lo importante son las personas... Gracias también a David Finn, Mariona, Lenka, Rui, Alejandro Amador, Jose, Nela...

Además quería dar las gracias a todos los compañeros de los otros grupos de la Unidad (MTs y Peces) que no he mencionado hasta ahora. En especial a Lorena, Lilo y Davinia, por los que tengo un más que afecto personal. Y a todas aquellas personas que nos han facilitado o facilitan actualmente nuestro trabajo diario: a Carlota, Maica, Paqui y personal administrativo del INc, por facilitarnos los trámites burocráticos y ayudarnos con la ingente cantidad de papeleo derivado de nuestro trabajo; a Pilar, por tener la parte técnica de nuestro laboratorio bajo control; y a Loli, por hacer de forma más que eficiente aquél trabajo que nadie ve y que, siendo imprescindible, es poco valorado.

También quería hacer un agradecimiento muy especial a nuestra técnico de microscopía del INc, Núria. No tan sols agrair-te el que m’has ensenyat amb el microscopi i que em portis cada dia a la feina, si no pel que fas per mi a nivell personal. Considero que ets uns dels millors descobriments com a persona que he fet en els darrers anys. Tant tu com el David, com la resta de la colla, sou una gent meravellosa que valeu molt la pena conèixer...

Y, por supuesto, dar infinitas gracias a todos aquellos que han tenido una gran paciencia conmigo y han aguantado multitud de veces que saliese de mi boca la frase “lo siento, no puedo, tengo que trabajar...”:

Gracias Oscar por tu amistad sin límites !!! En todos estos años me has demostrado día tras día, semana tras semana, lo que es la verdadera amistad. Más allá de lo que he aprendido de ti como persona, te tengo que dar mil gracias por saber que podía contar contigo a pesar de que durante largos intervalos de tiempo no supieses nada de mí.

Gracies als meus amics de carrera: Alceta-Iñigo, Annuski, Àlex, Susi i Alicia. Sempre us tinc molt a prop meu, ni que no estigueu en persona. Durant tots aquests anys m’heu fet costat en tot moment i m’he sentit profundament reconegut per vosaltres. Gracies per ser tan bona gent i estimar-me tal com soc.

Gracies Elena !!! per haver aguantat durant molts anys el dir-te que no tenia vacances, que no podíem fer res un i altre cap de setmana, per portar-me molts cops el sopar a la feina, per recollir d'altres vegades un sac vuit y, malgrat això, continuar estimant-me... Vas tenir una grandíssima paciència...

Gracias a mi niña, Silvia Miquez !!! por darme todo el cariño que me das y por hacerme sentir tan feliz cuando estoy contigo... Quién me iba a decir que ser tan desastre reconociendo caras me conllevaría conocer a una de las personas más importantes en mi vida actualmente!!

Gracies als meus companys de vòlei !!! vosaltres constituïu una de les principals eines per poder-me evadir de la tensió i problemes generats a la feina. A més, al llarg del temps el "puto agüelo" us ha agafat una molt gran estima personal. Gracies per comptar sempre amb mi i tenir la paciència que teniu amb els meus reiterats "ho sento, no puc..."

Finalmente y, precisamente por ello, más importante... MUCHAS, MUCHAS y MUCHÍSIMAS GRACIAS a mi familia. Nada de todo esto hubiese sido posible sin su confianza en mí, su apoyo, su estímulo, su paciencia, sus consejos... Gracias a mi madre por todo lo que me ha dado durante la vida, por apoyarme incondicionalmente y por desistir en la idea de comprarme un loro que dijese "Javi, estudia"... ;-). Gracias a mi padre por insistir en que me hiciese valorar. Gracias a mi hermana por confiar siempre en mí y darme siempre grandísimos consejos... Gracias a Josefina por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que necesitase... Gracias a Ramón por su generosidad y afecto... Y gracias als meus nebots pel gran amor que em donen i que em fan sentir el tiet més afortunat del món.