

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

Corteza prefrontal, amígdala y estrés: estudio de la noradrenalina,
corticosterona y memoria aversiva en la rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Giacomo Ronzoni Blázquez

Director

Alberto del Arco González

Madrid, 2017

© Giacomo Ronzoni Blázquez, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Fisiología



Corteza prefrontal, amígdala y estrés: estudio
de la noradrenalina, corticosterona y memoria
aversiva en la rata

Giacomo Ronzoni Blázquez

Tesis Doctoral
Madrid 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Fisiología



Corteza prefrontal, amígdala y estrés: estudio
de la noradrenalina, corticosterona y memoria
aversiva en la rata

Giacomo Ronzoni Blázquez

Dirigida por:
Alberto del Arco González
Gregorio Segovia Camargo
Francisco Mora Teruel

Tesis Doctoral
Madrid 2015



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
Teléfono +34 91 394 1439
Fax +34 91 394 1628
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

D. ALBERTO DEL ARCO GONZÁLEZ, Profesor contratado doctor; D. GREGORIO SEGOVIA CAMARGO, Profesor Contratado Doctor Y D. FRANCISCO MORA TERUEL, Catedrático de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “Corteza prefrontal, amígdala y estrés: estudio de la noradrenalina, corticosterona y memoria aversiva” que presenta D. GIACOMO RONZONI BLÁZQUEZ para optar al Grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección.

Madrid, Octubre de 2015

D. Giacomo Ronzoni

Dr. Alberto del Arco

Dr. Gregorio Segovia

Dr. Francisco Mora

A mi familia, a Sandra y en especial a mi abuela.
Este libro es para vosotros

Cada acto de percepción, es hasta cierto punto un acto de creación, y cada acto de la memoria es en cierta medida un acto de imaginación.

Oliver Sacks

Pequeñas alas que no sirven para volar, un apéndice que puede ser mortal, un ojo que no puede ver bien o músculos que sirven para mover inútilmente las orejas, no tendrían mucho sentido si uno piensa que las especies fueron una obra divina.

Jerry A Coyne, ¿Por qué la evolución es verdad?

ÍNDICE	Páginas
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Estrés, mecanismos neurobiológicos de adaptación a estrés	9
1.1 Definición de estrés y respuesta fisiológica a estrés	9
1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su regulación	10
1.2.1 Corticosterona y regulación límbica del eje HHA	12
1.3 Respuesta neuroquímica a estrés	14
1.4 Efectos conductuales del estrés	15
1.5 Estrés traumático y trastorno de estrés postraumático	16
1.5.1 Modelos animales para el estudio del estrés traumático	18
1.5.2 Shock eléctrico ineludible	18
1.6 Enriquecimiento ambiental y estrés	19
2. Corteza prefrontal	22
2.1 Estructura anatómica de la corteza prefrontal	22
2.2 Citoarquitectura de la corteza prefrontal	23
2.3 Conexiones anatómicas de la corteza prefrontal	25
2.3.1 Conexiones entre la corteza prefrontal y otras áreas corticales	25
2.3.2 Conexiones entre la corteza prefrontal y áreas subcorticales	25
2.4 Funciones de la corteza prefrontal	26
2.5 Corteza prefrontal y regulación de la respuesta a estrés	27
2.6 Corteza prefrontal y esquizofrenia	29
2.6.1 Mecanismos celulares de la disfunción de NMDA en la psicosis	30
3. Amígdala	32
3.1. Estructura anatómica de la amígdala	32
3.2 Citoarquitectura de la amígdala	33
3.3 Conexiones anatómicas de la amígdala	34
3.3.1 Conexiones entre regiones de la amígdala	34
3.3.2 Conexiones de la amígdala entre áreas corticales y subcorticales	35
3.4 Neuroquímica de la amígdala	37

3.4.1 Noradrenalina	38
3.4.2 Receptores adrenérgicos	40
3.5 Funciones de la amígdala	40
3.5.1 Memoria emocional	41
3.6 Amígdala y trastorno de estrés postraumático	42
3.6.1 Hipótesis noradrenérgica de la hipervigilancia asociada al TEPT	42
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Animales	51
2. Protocolos de estrés	52
2.1 Estrés moderado	52
2.2 Estrés traumático	52
3. Construcción de implantes y cánulas de microdiálisis	53
3.1 Construcción de implantes	53
3.1.1 Implantes de microdiálisis	53
3.1.2 Implantes de microinyecciones	54
3.2 Cánulas de microdiálisis	54
4. Cirugía estereotáxica	57
5. Sistema de perfusión intracerebral in vivo	69
5.1. Protocolo general de perfusión	61
5.2 Análisis de noradrenalina por cromatografía líquida de alta resolución	61
5.3 Condiciones cromatográficas	62
5.4. Calibración	63
5.5 Cálculo del coeficiente de variación	63
5.6 Linealidad del análisis cromatográfico	64
6. Inyecciones intracerebrales	64
6.1 Drogas	65
7. Histología	66
8. Cuantificación de Corticosterona mediante radioinmunoensayo	71
8.1 Obtención de muestras de sangre y plasma	71
8.2 Cuantificación de corticosterona plasmática	71
8.3 Cuantificación de corticosterona libre en muestras de microdiálisis	72
9. Test de evitación pasiva	74

10. Evaluación de la actividad motora espontánea en un ambiente novedoso	74
11. Cuantificación de la expresión de ARN mensajeros específicos	76
11.1 Extracción del ARN	76
11.2 Cuantificación de ARN	77
11.3 Síntesis de ADNc	79
11.4 Amplificación del ADNc	80
12. Análisis estadístico	82
RESULTADOS	85
1 Bloque experimental I: Actividad de la corteza infralímbica y modulación de la respuesta a estrés: estudio del eje HHA y la memoria aversiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.	85
I. Introducción	85
II. Diseño experimental	87
III. Análisis estadístico	88
IV. Resultados	89
1.1 Actividad motora espontánea en un campo abierto y de la latencia de entrada en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA	89
1.2 Efecto de la inhibición de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.	94
1.3 Efecto de la estimulación de la actividad de la corteza infralímbica sobre concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.	98
1.4 Expresión de ARNm del gen de activación celular c-fos y del receptor GABAA en la corteza infralímbica en animales mantenidos control y mantenidos en EA.	102
V Discusión de los resultados	103
2. Bloque experimental II: Disfunción de la CPF medial y modulación de la respuesta a estrés: efecto del bloqueo de receptores NMDA en la CPF sobre la liberación de noradrenalina y corticosterona en amígdala y sobre la memoria aversiva.	108
I. Introducción	108

II. Diseño experimental	110
III. Análisis estadístico	111
IV. Resultados	112
2.1 Efecto de la inyección del antagonista de NMDA CPP en la CPF sobre la actividad motora espontánea.	112
2.2 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala.	114
2.3 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de corticosterona en la amígdala.	116
2.4 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.	118
V Discusión de los resultados	120
3. Bloque experimental III: Cambios a largo plazo en la actividad de la amígdala en respuesta a un estrés traumático: estudio del efecto del IFS sobre la actividad motora espontánea y la transmisión noradrenérgica en la amígdala.	124
I. Introducción	124
II. Diseño experimental	127
III. Análisis estadístico	128
IV. Resultados	129
3.1 Análisis de la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.	129
3.2 Concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala en animales control y expuestos a IFS.	132
3.3 Efecto de la inyección del antagonista β -adrenérgico propranolol en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.	134
3.4 Efecto de la inyección del agonista β -adrenérgico clenbuterol y de noradrenalina en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control.	138
3.5 Expresión de ARNm de receptores en la amígdala, la CPF y el hipocampo de animales control y expuestos a IFS.	141
3.6 Efecto del EA sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.	143

V Discusión de los resultados	147
DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS	155
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	163

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPA	Ácido α -amino-3hidroxi-5metil-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATV	Área tegmental ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro del inglés “ <i>brain derived neurotrophic factor</i> ”
CPF	Corteza prefrontal
CPP	Ácido 3-[(R)-2- carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-fosfónico
CRH	Factor liberador de corticotropina
Ct	valor umbral de ciclos, del inglés “ <i>cycle threshold</i> ”
DEPC	Dietil-pirocarbonato
EA	Enriquecimiento ambiental
GABA	Ácido gamma amino butírico
GR	Receptor de glucocorticoides (tipo II)
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HP	Hipotálamo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IFS	Shock eléctrico ineludible, del inglés “ <i>inescapable foot shock</i> ”
ITC	Complejo de núcleos intercalados de la amígdala
LCRs	Líquido cefalorraquídeo sintético
MR	Receptor de mineralocorticoides (tipo I)
NBST	Núcleo basal de la estría terminal
NMDAR	Receptor glutamatérgico N-metil D-Aspártico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRq-RT	PCR cuantitativa a tiempo real
PVH	Núcleo paraventricular del hipotálamo
RIA	Radioinmunoensayo
TEPT	Trastorno de estrés postraumático

RESUMEN/SUMMARY

La interacción funcional entre la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala así como la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y la liberación de catecolaminas en áreas límbicas del cerebro, juegan un papel clave tanto en la regulación de la respuesta fisiológica a estrés como en respuestas mal-adaptativas a estrés. El procesamiento de la información emocional a largo plazo, es otro de los mecanismos que contribuyen a la capacidad de los individuos para adaptarse a situaciones de estrés.

Diversos estudios han mostrado que la CPF modula la activación del eje HHA en condiciones basales y durante estrés así como la formación de memorias relacionadas con estímulos aversivos. Es más, tanto la transmisión noradrenérgica en la amígdala como los cambios en la concentración de corticosterona en esta misma área del cerebro, son fundamentales en la adquisición y consolidación de la memoria emocional. Sin embargo, y a pesar de su importancia en la regulación de la respuesta a estrés, aún no se conoce bien el papel específico de la CPF y la amígdala en la regulación del eje HHA y en el procesamiento emocional, y en qué medida la alteración de estas áreas facilita respuestas mal-adaptativas a estrés. Por otra parte, el enriquecimiento ambiental (EA) se ha descrito como un modelo experimental que reduce la reactividad a estrés e incrementa la resistencia frente a estímulos aversivos. Además este paradigma experimental está siendo investigado como modelo animal para estudiar los mecanismos neurobiológicos del tratamiento de patologías psiquiátricas relacionadas con el estrés como el trastorno de estrés post-traumático (TEPT).

La presente Tesis Doctoral consta de tres bloques experimentales en los que se investigan diferentes aspectos relacionados con el papel de la CPF y la amígdala en la respuesta a estrés tanto en condiciones fisiológicas (evaluando los efectos de un estrés moderado) como patológicas (evaluando los efectos de un estrés traumático).

Bloque Experimental I

Estudios previos en roedores han sugerido que las regiones prelímbica e infralímbica de la CPF ejercen un papel antagónico sobre la regulación del eje HHA y la memoria aversiva. En concreto, se ha propuesto que la corteza prelímbica inhibe la actividad del eje y los aumentos de corticosterona en respuesta a estrés mientras que la corteza infralímbica estimula su activación en respuesta a dicho estrés. El objetivo del presente

bloque experimental fue investigar los efectos de la inhibición y la estimulación de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática basal y estimulada por estrés de corticosterona y sobre la adquisición de memoria aversiva en un test de evitación pasiva. Además, se estudió si el mantenimiento de los animales en condiciones de EA cambia la función de la corteza infralímbica sobre los parámetros anteriormente citados. Con este objetivo, se llevan a cabo inyecciones locales de muscimol, agonista GABA_A, y picrotoxina, antagonista GABA_A para inhibir y estimular, respectivamente, la actividad de la corteza infralímbica. Las inyecciones se llevaron a cabo 60 minutos antes de ser expuestos a un estrés agudo (shock eléctrico) durante la fase de entrenamiento en un test de evitación pasiva.

Los resultados más relevantes fueron del bloque experimental I fueron: 1) La inhibición de la corteza infralímbica redujo el incremento de corticosterona estimulado por estrés y de memoria aversiva en el test de evitación pasiva. 2) La estimulación de la corteza infralímbica incrementó la concentración plasmática basal de corticosterona. El EA potenció el incremento de los niveles basales de corticosterona inducidos por la estimulación de la corteza infralímbica.

Estos resultados sugieren que la corteza infralímbica es necesaria para la activación del eje HHA en respuesta a un estrés agudo moderado y para la formación de memorias aversivas y además sugieren que el EA potencia el control ejercido por la corteza infralímbica sobre el eje HHA. En este contexto, los resultados presentados en este bloque experimental apoyan la hipótesis de que la alteración en la actividad de la región ventral de la CPF podría ser responsable de patologías psiquiátricas relacionadas con el estrés.

Bloque experimental II

La disfunción de la CPF ha sido asociada con la respuesta exacerbada a estrés observada en los pacientes diagnosticados de esquizofrenia y de elevado riesgo de padecer psicosis. La hipofunción de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA es un modelo experimental utilizado para investigar las alteraciones neurofisiológicas y conductuales asociadas a la psicosis. El objetivo del presente bloque experimental fue estudiar si la alteración de la actividad de la región prelímbica de la CPF, inducida por

la hipofunción de los receptores NMDA mediante inyecciones locales del antagonista NMDA, CPP, cambia los niveles de noradrenalina y corticosterona en la amígdala en respuesta a estrés, medidos en experimentos de microdiálisis, y la adquisición de la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.

Los resultados más relevantes obtenidos en este bloque experimental fueron: 1) la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF no modificó las concentraciones extracelulares de noradrenalina y corticosterona en la amígdala, en respuesta a estrés agudo y 2) La inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF redujo la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.

Estos resultados sugieren que la alteración de actividad de la región prelímbica la CPF altera el procesamiento de la memoria a largo plazo de un estímulo aversivo. Esta alteración no depende de la modificación de la actividad de las proyecciones noradrenérgicas a amígdala ni de la del eje HHA. Por tanto, este déficit de la memoria emocional inducido por la hipofunción de los receptores NMDA en la CPF estaría mediado por proyecciones corticales diferentes a las que regulan la actividad del eje HHA y del sistema noradrenérgico en amígdala.

Bloque Experimental III

La exposición a un estrés traumático puede desencadenar el desarrollo de patologías relacionados con trastornos de ansiedad como es el trastorno de estrés post-traumático (TEPT). Se ha sugerido que una hiperactividad del sistema noradrenérgico podría estar implicada en el mantenimiento de alguna de las alteraciones conductuales asociadas a la exposición a estrés traumático como la hipervigilancia en ambientes novedosos no asociados al trauma. El objetivo del presente bloque experimental fue estudiar si la exposición de los animales a un estrés traumático, shock eléctrico ineludible (IFS), produce cambios a largo plazo en la conducta en respuesta a la novedad, evaluada mediante la exposición a un aparato de campo abierto y si estos cambios se asocian a una hiperactividad noradrenérgica en la amígdala. Para ello, se evaluaron los niveles de noradrenalina en animales expuestos a IFS mediante la técnica de microdiálisis. También se estudió si la reducción en la transmisión noradrenérgica en la amígdala, mediante inyecciones del antagonista β -adrenérgico propranolol en esta área cerebral,

modifica la reactividad en respuesta novedad producida por la exposición a IFS. Añadido a esto, se evaluó si la exposición a IFS modifica los niveles de expresión de ARNm de receptores β -adrenérgicos (β_1 y β_2), de glucocorticoides (GR y MR) y de endocannabinoides (CB1) en las principales áreas que regulan la respuesta a estrés como la amígdala, la CPF y el hipocampo. Por último, se estudió si el mantenimiento de los animales en EA atenúa las alteraciones conductuales producidas por la exposición de los animales a un estrés traumático.

Los resultados más relevantes del presente bloque experimental fueron: 1) La exposición a IFS redujo la actividad motora durante los 5 primeros minutos del test de campo abierto a largo plazo (7 y 28 días). 2) La exposición a IFS incrementó la concentración extracelular estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala. Sin embargo, redujo la concentración extracelular basal de noradrenalina en amígdala. 3) La inyección local de propranolol en la amígdala contrarrestó la reducción de la actividad motora producida por la exposición a IFS. 4) La exposición a IFS alteró la expresión de ARNm de los diferentes receptores en la CPF, el hipocampo y amígdala. 5) El EA no redujo significativamente la inmovilidad en respuesta a novedad producida por la exposición a IFS, aunque incrementó la variabilidad de la respuesta en el grupo de animales mantenidos en estas condiciones.

Estos resultados, sugieren que la exposición a IFS produce un incremento en la actividad noradrenérgica en la amígdala, que es responsable, al menos en parte, de la inmovilidad en respuesta a novedad asociada a los síntomas de hipervigilancia en TETP. La alteración en la expresión de receptores en la CPF y el hipocampo de los animales expuestos a IFS sugieren además que estas áreas cerebrales también estarían implicadas en el mantenimiento de los síntomas del TEPT.

En conjunto, los resultados de la presente Tesis Doctoral apoyan la hipótesis que propone que las alteraciones en la interacción entre distintas áreas del cerebro como la CPF, la amígdala y el hipocampo, producen respuestas mal-adaptativas al estrés (modificación de la actividad del eje HHA y del sistema noradrenérgico) que conllevan el desarrollo de patologías psiquiátricas como el TPET.

The functional interaction between the prefrontal cortex (PFC) and the amygdala as well as the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the release of catecholamines in limbic brain areas, play a key role in regulating both the physiological and the mal-adaptive response to stress. The processing of long term emotional information is another mechanism contributing to the ability of individuals to adapt to stressful situations.

Several studies have shown that the PFC modulates activation of the HPA axis under basal conditions and during stress and also has a crucial role in the formation of memories related to aversive stimuli. Moreover, both noradrenergic transmission in the amygdala and changes in the concentration of corticosterone in that brain area, have a central role in the acquisition and consolidation of emotional memories. However, despite its importance in regulating the response to stress, it is still not well understood the specific role of the PFC and the amygdala in the regulation of the HPA axis and emotional processing, and to what extent an alteration in these areas facilitates mal-adaptation and stress-related disorders. In addition, environmental enrichment (EE) has been described as an experimental model that reduces the reactivity to stress and increases resilience to aversive stimuli. Besides, this experimental paradigm is being investigated as an animal model to study the neurobiological mechanisms of treatment of psychiatric disorders and stress-related disorders including, post-traumatic stress disorder (PTSD).

This Doctoral Thesis consists of three experimental blocks in which the role of the PFC and the amygdala regulating the response to stress in both physiological (evaluating the effects of moderate stress), and pathological conditions (evaluating the effects a traumatic stress) is investigated.

Experimental block I:

Previous studies in rodents have suggested that prelimbic and infralimbic regions of the CPF exert an antagonistic role on the regulation of the HPA axis and the aversive memories. Specifically, it has being proposed that the prelimbic cortex inhibits HPA activity, and hence reduces corticosterone increases in response to stress while the infralimbic cortex stimulates their activation in response to stress. The aim of this

experimental block was to investigate the effects of the stimulation and inhibition of the infralimbic cortex on basal and stress-induced plasma levels of corticosterone and on the acquisition of aversive memory in animals maintained in control and EE conditions. For this purpose, intracortical microinjections of picrotoxin a GABA_A antagonist, and muscimol a GABA_A agonist, were performed in male Wistar rats to stimulate and inhibit, respectively, the activity of the infralimbic cortex. Injections were performed 60 min before foot shock stress and training in the inhibitory avoidance task.

The most relevant results of this experimental block were: 1) the EE reduced spontaneous motor activity in the test of open field, but did not alter the acquisition of aversive memory at 3 and 24 hours after receiving an electric shock during training a passive avoidance test. 2) Inhibition of infralimbic cortex reduced corticosterone increase stimulated by stress and aversive memory in the passive avoidance test. 3) Stimulation of infralimbic cortex increased basal plasma corticosterone. EE potentiated this increase in basal corticosterone levels.

These results suggest that the infralimbic cortex is required for activation of the HPA axis in response to moderate acute stress and in forming aversive memories, and further suggest that the EA enhances the control exercised by the infralimbic cortex on the HPA axis. In this context, the results presented in this experimental block support the hypothesis that an alteration in the activity of the ventral region of the PFC could be responsible for psychiatric pathologies related to stress.

Experimental block II

A dysfunction of the PFC has been associated with the exacerbated response to stress observed in patients diagnosed with schizophrenia and individuals with high risk of developing psychosis. The hypofunction of the NMDA glutamate receptor is an experimental model used to investigate the neurophysiological and behavioral changes associated with psychosis. The aim of this experimental block was to study whether an altered activity of the region prelimbic PFC induced by hypofunction of NMDA receptors through local injections of CPP, a NMDA antagonist, changes the levels of noradrenaline and corticosterone in the amygdala in response to stress, measured

through microdialysis experiments and in the acquisition of aversive memory by means a passive avoidance test.

The most relevant results of this experimental block were: 1) injection of CPP in the prelimbic cortex did not alter the extracellular concentrations of noradrenaline and corticosterone in the amygdala in response to acute stress and 2) CPP injection reduced the retention latency in the passive avoidance test.

These results suggest that an impaired activity in the prelimbic PFC alters the long-term memory processing of an aversive stimulus. This alteration does not depend on the change in activity of noradrenergic projections to the amygdala nor of the HPA axis. Therefore, this emotional memory deficit induced by hypofunction of NMDA receptors in the CPF would be mediated by different cortical projections that regulate the activity of the HPA axis and the noradrenergic system in amygdala.

Experimental block III

Exposure to traumatic stress can trigger the development of stress related disorders such as anxiety disorder and PTSD. It has been suggested that a hyperactivity of the noradrenergic system may be involved in maintaining some of the behavioral changes associated with exposure to traumatic stress such as hypervigilance in novel environments not associated with the trauma. The aim of this experimental block was to investigate whether the exposure to a traumatic stress, as the inescapable foot-shock (IFS), produces long-term changes in behavior as the hiper-reactivity in response to novelty, assessed by exposure to an open field test and whether these changes are associated with noradrenergic hyperactivity in the amygdala. To do this, noradrenaline levels were evaluated by microdialysis in animals exposed to IFS. It was also studied whether the reduction in noradrenergic transmission in the amygdala, through microinjections of propranolol, a β -adrenergic antagonist, modifies the reactivity in response novelty produced by exposure to IFS. Added to this, it was evaluated whether exposure to IFS modifies the mRNA expression levels of β -adrenergic (β_1 y β_2) receptors, glucocorticoid (GR and MR) and endocannabinoids (CB1) in the main areas that regulate the response to stress like the amygdala, the hippocampus and PFC.

Finally, it was examined whether the maintenance of animals in EE attenuates behavioral disorders caused by exposure to a traumatic stress.

The most relevant results of this experimental block were: 1) Exposure to IFS induced a long term reduction of motor activity during the first 5 minutes in the open field test (7 and 28 days after IFS). 2) Exposure to IFS increased extracellular concentration of noradrenaline stimulated by stress in the amygdala, whereas IFS reduced the basal extracellular noradrenaline in the same brain area. 3) Local injection of propranolol in the amygdala counteracted the reduced motor activity produced by exposure to IFS. 4) Exposure to IFS altered mRNA expression of different receptors in the PFC, hippocampus and amygdala. 5) EE did not significantly counteract the immobility in response to novelty produced by IFS exposure, although it increased the variability of the response in the group of animals kept in these conditions.

These results suggest that exposure to IFS produces an increase in noradrenergic activity in the amygdala, which is responsible, at least in part, of immobility in response to novelty associated with hypervigilance symptoms in PTSD. The altered expression of receptors in the PFC and the hippocampus of animals exposed to IFS further suggest that these brain areas would also be involved in the maintenance of PTSD symptoms.

Taken as a whole, the results of this doctoral thesis support the proposed hypothesis that alterations in the interaction between different brain areas such as the PFC, the amygdala and the hippocampus, produces mal-adaptive responses to stress (changing HPA axis activity and noradrenergic system) leading the development of psychiatric disorders such as PTSD.

INTRODUCCIÓN

1. Estrés, mecanismos neurobiológicos de adaptación a estrés

1.1 Definición de estrés y respuesta fisiológica a estrés

Los efectos fisiológicos del estrés y sus consecuencias sobre el organismo, fueron detallados por primera vez por Hans Selye en el año 1936. El estrés se ha definido como un evento en el que un individuo percibe una amenaza potencial o real para su homeostasis (Selye, 1976; McEwen, 2000). Más allá de la naturaleza del evento estresante, la percepción del individuo resulta fundamental para la posterior respuesta del organismo. En este sentido, se ha propuesto una definición que integra varios aspectos respecto a la percepción subjetiva del estrés: 1) en primer lugar, un estímulo estresante debe producir un estado de alerta (debe producir cambios conductuales, o neuroquímicos); 2) además debe resultar aversivo, es decir, los individuos tratarán de evitar exponerse al estímulo estresante siempre que exista la posibilidad y 3) la capacidad de control o predicción del el estímulo estresante; lo que determinará la magnitud de la respuesta a estrés y el grado de susceptibilidad del individuo. Estos aspectos son importantes para entender el desarrollo de secuelas fisiológicas y conductuales tras la exposición a estrés (Kim & Diamond, 2002).

En este sentido, la respuesta fisiológica a estrés de los organismos es un proceso evolutivamente muy conservado que depende del cerebro y tiene como finalidad generar una respuesta inmediata o anticipada frente a una situación de estrés lo cual implica la activación de dos sistemas fundamentales 1) la activación inmediata del sistema nerviosos autónomo simpático, que actúa incrementando los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina que permite la movilización de energía y además un aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial y 2) la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) que es de respuesta algo más lenta ya que requiere varios pasos que culminan con la liberación de glucocorticoides (Schwabe *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2012, 2014; McEwen *et al.*, 2015; McKlveen *et al.*, 2015). Esta respuesta está regulada por diversas áreas del cerebro de entre las cuales destacan áreas del sistema límbico como la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala como se describirá más adelante. Además la respuesta fisiológica a estrés se puede clasificar en dos grandes grupos, en función del tipo de estrés. Por un lado tenemos los de naturaleza física (es decir, cualquier estrés que suponga una alteración física del organismo como pérdida de

sangre, infecciones o dolor) y por otra los no físicos ó “psicogénicos”, que están basados en experiencias pretéritas o en respuestas innatas programadas (restricción de movimiento, exposición a un depredador natural, condicionamiento a miedo, entre otros); sin embargo, no siempre es fácil separar ambos componentes del agente estresante (Lupien *et al.*, 2007; Ulrich-Lai & Herman, 2009).

1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y su regulación

El principal regulador de la homeostasis del organismo es el hipotálamo, siendo una región cerebral que mantiene una homología estructural a lo largo de la evolución (Domínguez *et al.*, 2015). El estrés activa una respuesta neuroendocrina a través del eje HHA con el fin de restablecer la homeostasis del organismo. De manera breve, la detección de un estímulo estresante implica la liberación del factor liberador de corticotropina (CRH) desde el hipotálamo, que alcanza la eminencia media de la hipófisis, donde promueve la liberación de corticotropina (ACTH) a la sangre y que promueve en la corteza adrenal la liberación de corticosterona (cortisol en los humanos y en la mayoría de los mamíferos) (Ulrich-Lai & Herman, 2009) (Figura II). El eje HHA, opera en dos grandes dominios bajo dos situaciones muy diversas: la primera ocurre en condiciones basales o sin estrés, ya que la secreción de corticosterona sigue un ritmo circadiano, con un pico máximo de secreción de corticoides que ocurre durante el inicio del periodo de actividad del organismo (Bouchez *et al.*, 2012; Kalsbeek *et al.*, 2012) que es esencial para la coordinación de la función de las áreas cerebrales implicadas en la regulación de la homeostasis (Herman *et al.*, 2003). El segundo campo de acción del eje es tras la detección de un estímulo estresante como se describe a continuación.

Los glucocorticoides ejercen sus efectos a través de receptores específicos, denominados receptores de mineralocorticoides (MR) o de alta afinidad y receptores de glucocorticoides (GR) de baja afinidad (aproximadamente 10 veces inferior a los MR), de tal forma que en condiciones basales, donde los niveles de corticoides son bajos, estos ejercen sus efectos principalmente activando receptores MR, mientras que cuando los niveles son altos (durante la respuesta a estrés) se unen a receptores de tipo GR (De Kloet *et al.*, 1999). Debido a su naturaleza lipofílica, la corticosterona libre en plasma (entre un 5 y un 10% del total, Rosner, 1990) es capaz de atravesar la barrera hemato-

encefálica. Sin embargo, la inmensa mayoría de corticosterona está unida a globulinas transportadoras de esta hormona (CBGs del inglés *corticosterone binding globulins*) que actúan a modo de reguladores de la disponibilidad de corticosterona, tamponando los efectos deletéreos de una elevada exposición del organismo a estas hormonas (Breuner & Orchinik, 2002). La corticosterona libre denominada “fracción biológica activa” ejerce sus efectos sobre células neuronales y/o de glía uniéndose a los receptores localizados en el citoplasma, y modificando la transcripción de genes específicos. Aunque los efectos genómicos de los corticoides son los más ampliamente descritos, diversos estudios han mostrado efectos rápidos (no mediados por efectos genómicos) de la corticosterona sobre aspectos conductuales, neuroquímicos y electrofisiológicos mediados por receptores que estarían localizados sobre la membrana celular (Sandi *et al.*, 1996; Venero & Borrell, 1999; Dallman, 2005; Herbert *et al.*, 2006; de Kloet, 2008; Joëls *et al.*, 2008; Roozendaal *et al.*, 2010) Aunque no se conocen con detalle los mecanismos celulares de acción de estos receptores, su función podría estar relacionada con la activación de cascadas intracelulares de segundos mensajeros, modulando la transmisión sináptica (Joëls *et al.*, 2008; de Kloet *et al.*, 2008; Prager & Johnson, 2009; Groeneweg *et al.*, 2011).

La acción de los glucocorticoides a corto plazo es beneficiosa para los organismos por sus efectos sobre la respuesta adaptativa a estrés, favoreciendo la supervivencia de los organismos. Sin embargo, la exposición prolongada a estas hormonas puede causar diversas alteraciones conductuales y cognitivas, además de patologías relacionadas con el sistema inmunológico y patologías psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión o trastornos de ansiedad como el TEPT (De Kloet *et al.*, 1999; Sapolsky *et al.*, 2000; McEwen, 2008; Pitman *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2015). Es por ello, que la secreción de glucocorticoides está altamente regulada. La liberación de corticosterona implica diversas áreas cerebrales y un sistema de regulación altamente eficaz. Esta regulación consiste en un sistema de retro-alimentación negativa *feed-back* en el que la propia corticosterona inhibe su liberación, actuando sobre receptores localizados en el núcleo para-ventricular del hipotálamo (PVH) (De Kloet *et al.*, 1998). El PVH presenta un gran número de receptores GR (casi no expresa receptores MR) por tanto es altamente sensible a los cambios de corticosterona producidos en respuesta a estrés (Pryce, 2008). Este mecanismo de retroalimentación negativa se da en dos fases, una rápida en la que la corticosterona controlaría la liberación de CRH y ACTH en el hipotálamo mediante

un mecanismo de acción no genómico (Dallman, 2005; Groeneweg *et al.*, 2011) y una más lenta, que actúa mediante acciones genómicas en las que también intervendrían otras regiones límbicas como la CPF, el hipocampo y la amígdala (Dallman, 2005; Herman *et al.*, 2005; Joëls *et al.*, 2008).

1.2.1 Corticosterona y regulación límbica del eje HHA

A parte del hipotálamo, otras regiones cerebrales del sistema límbico como la CPF, el hipocampo y la amígdala están implicadas en el control de la respuesta a estrés, modulando la actividad del eje HHA bien de manera directa o indirecta (Jankord & Herman, 2008). Estas regiones cerebrales presentan una densidad variable de receptores GR y MR, y por tanto son sensibles a los niveles basales y en respuesta a estrés de glucocorticoides (Reul & De Kloet, 1985; Pryce, 2008) (ver figura I1).

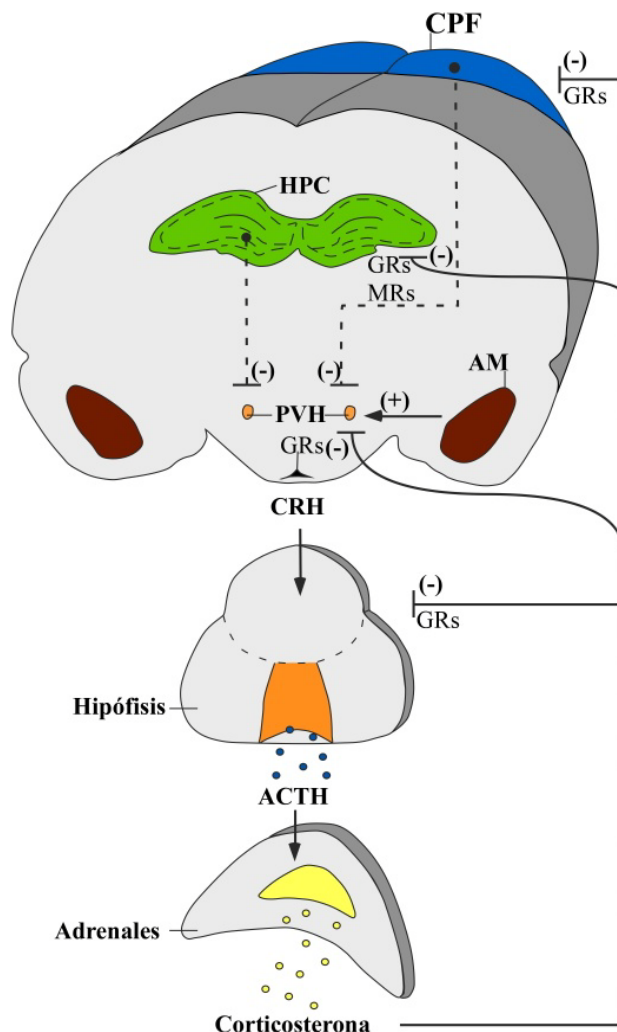
En la CPF se ha descrito la presencia de receptores MR y GR en un ratio GR:MR muy elevado, por lo que se ha supuesto un papel regulador del eje HHA en respuesta a estrés (Meaney & Aitken, 1985; Reul & De Kloet, 1985; McEwen *et al.*, 1986). Este papel regulador permitirá la activación del eje HHA durante estrés y la inhibición del mismo una vez este haya finalizado y dependerá de las distintas regiones que conforman la CPF medial y por tanto del patrón conectivo de cada una de ellas (Ulrich-Lai & Herman, 2009). El papel de la corticosterona en este área ha sido mostrada a partir de estudios de lesiones y de implantes osmóticos de corticosterona en la CPF mostrando menores incrementos de ACTH y de corticosterona en respuesta a estrés (Diorio *et al.*, 1993; Akana *et al.*, 2001). Otros estudios han mostrado que los glucocorticoides administrados directamente en la región infralímbica de la CPF reducen la secreción de corticosterona (Radley *et al.*, 2006; McKlveen *et al.*, 2013), lo cual sugiere un doble papel en la regulación del eje HHA en respuesta a estrés.

La amígdala también participa en la activación y posterior regulación del eje HHA. En concreto, se ha mostrado que la estimulación de la amígdala, produce incrementos en la secreción de corticosterona y ACTH (Dunn & Whitener, 1986; Weidenfeld *et al.*, 1997) mientras que lesiones en la amígdala reduce la secreción de corticosterona en respuesta a estrés (Goldstein *et al.*, 1996; Ulrich-Lai & Herman, 2009). La expresión de receptores MR y GR es más reducida y siendo la densidad de receptores GR comparativamente

mayor a la de MR (Pryce, 2008). Se ha propuesto que la amígdala juega un papel activador del eje HHA en respuesta a estrés (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Añadido a ello, se ha mostrado que el incremento de la expresión de receptores MR en la amígdala reduce la respuesta de ansiedad en los animales tratados, convirtiéndose en una posible vía terapéutica para desórdenes de ansiedad (Mitra *et al.*, 2009).

El hipocampo presenta una gran densidad de receptores GR y MR respecto a las áreas anteriormente descritas y por tanto, se ha propuesto que intervendría en el control del eje HHA tanto en condiciones basales como en respuesta a estrés (Ulrich-Lai & Herman, 2009). En concreto, estudios de lesiones en el hipocampo han mostrado alteraciones del ciclo circadiano de corticosterona en roedores, así como incrementos o secreción prolongada de corticosterona en respuesta a estrés (Fischette *et al.*, 1980; Sapolsky *et al.*, 1984; Herman *et al.*, 1998). En concreto, la regulación del eje HHA está mediada, en gran parte, por el hipocampo ventral y el subículo ventral (Jankord & Herman, 2008).

Figura 11. Representación esquemática de la regulación del eje HHA en respuesta a estrés. Durante una situación de estrés, la amígdala activa al hipotálamo (PVH) que libera CRH y en la hipófisis estimula la síntesis y liberación de ACTH al torrente circulatorio llegando a las glándulas adrenales induciendo la síntesis y liberación de corticosterona. La glándula adrenal también sintetiza y libera catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, en respuesta a estrés (no se muestra en la imagen). La regulación de la liberación de corticosterona tiene lugar mediante diversos mecanismos. En primer lugar, la corticosterona se une a receptores GR de baja afinidad, localizados en la hipófisis y en el propio hipotálamo ejerciendo una regulación por retroalimentación negativa sobre la liberación de ACTH y CRH respectivamente. Tras la activación del eje HHA y una vez que ha terminado el evento estresante, la corticosterona modula la actividad de diversas regiones cerebrales como la corteza prefrontal (CPF) y el hipocampo (HPC) que inhiben indirectamente la producción de CRH por el hipotálamo, recuperando la homeostasis del organismo previa al estrés.



1.3 Respuesta neuroquímica a estrés

El estrés no solo incrementa la actividad del eje HHA, sino que estimula la liberación de diferentes neurotransmisores y moduladores en áreas del cerebro como la CPF, la amígdala, el hipocampo, estructuras cerebrales que tienen un papel reconocido en la organización de la respuesta a estrés (McEwen, 2000; Robbins, 2005; Mora *et al.*, 2012).

Uno de los cambios más estudiados respecto a las alteraciones neuroquímicas en respuesta a estrés ha sido el incremento de la actividad catecolaminérgica (Joëls & Baram, 2009). Los trabajos clásicos de Thierry fueron los primeros que sugirieron el incremento de la concentración de dopamina en la CPF (Thierry *et al.*, 1976). Posteriormente, diversos estudios han mostrado cambios en la concentración de dopamina, noradrenalina, serotonina y acetilcolina en esta área del cerebro empleando diversos estímulos estresantes (Abercrombie *et al.*, 1989; Kawahara *et al.*, 1993; Feenstra *et al.*, 1995a,1995b; Finlay *et al.*, 1995; Mark *et al.*, 1996; Takahata & Moghaddam, 1998; Sullivan & Gratton, 2002; Laplante *et al.*, 2004). En relación a estos resultados, estudios previos realizados en nuestro laboratorio también han mostrado incrementos de dopamina y acetilcolina, en la CPF en respuesta a estrés agudo moderado (restricción del movimiento) (Del Arco & Mora, 2001; Del Arco *et al.*, 2001; Del Arco *et al.*, 2007a, 2007b; Segovia *et al.*, 2008a, 2008b).

Diversos estudios de electrofisiología y microdiálisis han mostrado incrementos en la transmisión noradrenérgica en la CPF, la amígdala y el hipocampo en respuesta a estrés agudo (Abercrombie *et al.*, 1988; Yadid *et al.*, 1993; Cecchi *et al.*, 2002; Morilak *et al.*, 2005). En este contexto, el incremento de la concentración extracelular de noradrenalina en la amígdala en respuesta a diversos tipos de estrés agudo (Tanaka *et al.*, 1991; Galvez *et al.*, 1996; Quirarte *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998; Ma & Morilak, 2005) es especialmente relevante ya que se han vinculado con el papel de la amígdala en la coordinación de la respuesta fisiológica a estrés, así como con su papel en la consolidación de la memoria emocional (McGaugh *et al.*, 2002; McIntyre *et al.*, 2002; 2003; Ledoux, 2003; Phelps & LeDoux, 2005; Roozendaal *et al.*, 2009a). Añadido a esto, se han descrito otros sistemas neuromoduladores que pueden cambiar en la CPF y la amígdala por efecto del estrés. Uno de ellos es el sistema opioide, que modula las

interacciones dopamina-acetilcolina durante estrés (George *et al.*, 2000). También ha recibido especial atención el sistema endocannabinoide, pues se ha demostrado que tiene un papel crucial en la terminación de la respuesta estrés (Hill & Tasker, 2012), reduciendo la actividad GABAérgica sobre neuronas glutamatérgicas de proyección (Hill *et al.*, 2011; McLaughlin *et al.*, 2014). Otro modulador de especial relevancia es el neuropéptido Y ya que regula la liberación de noradrenalina y por tanto regula las funciones de este neurotransmisor en respuesta a estrés (Cohen *et al.*, 2012b). Diversos estudios han mostrado incrementos de este modulador en respuesta a estrés en la amígdala (Cui *et al.*, 2008). Además se han relacionado alteraciones en los niveles de este modulador con el desarrollo de patologías psiquiátricas como el TEPT (Yehuda 2006b; Hendriksen *et al.*, 2012; Sah & Geraciotti, 2013).

1.4. Efectos conductuales del estrés

La respuesta a estrés implica adaptaciones cognitivas a corto y largo plazo como el aprendizaje y la memoria que son importantes a la hora de superar una situación de estrés. (Radley, 2012; McKlveen *et al.*, 2015). Estas adaptaciones en los procesos de memoria y aprendizaje dependen a su vez de cambios neuroquímicos y del eje HHA sobre diversas áreas cerebrales como la CPF, el hipocampo o la amígdala (McKlveen *et al.*, 2015).

El estrés, como se ha descrito anteriormente, activa la respuesta del eje HHA y del sistema nervioso autónomo con el consecuente incremento de glucocorticoides y noradrenalina. Estas hormonas van a tener una influencia sobre el aprendizaje y la conducta como se ha mostrado en animales de experimentación y en humanos (de Quervain *et al.*, 1998, 2009; Schwabe *et al.*, 2012). El efecto de estas hormonas, sobre todo con los niveles de corticosterona, sobre el aprendizaje en diversas tareas se ha descrito que guardan una relación de U invertida, en el que existen unos niveles óptimos para los cuales los niveles de aprendizaje son máximos, mientras que niveles superiores o inferiores de estas hormonas, afectarían de forma negativa al aprendizaje. En la literatura se describen tanto efectos negativos como positivos del estrés sobre la memoria y el aprendizaje. Los efectos positivos del estrés pueden observarse sobre la memoria de eventos con una carga emocional, ya que son mejor o más eficazmente recordados que otros (McGaugh, 2000). Diversos estudios han mostrado el papel de la

corticosterona (De Kloet *et al.*, 1999; Roozendaal *et al.*, 2009b) y su interacción con la noradrenalina (Quirarte *et al.*, 1997; Roozendaal *et al.*, 2002) en el incremento de la memoria emocional. Por otra parte, los efectos negativos del estrés se refieren sobre todo respecto a tareas cognitivas, como la memoria de trabajo, en donde se han relacionado directamente la corticosterona liberada en respuesta a estrés con esos déficits (Parker *et al.*, 2006; Sandi & Pinelo-Nava, 2007).

1.5. Estrés traumático y Trastorno de estrés postraumático

El estrés constituye un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de diversas patologías psiquiátricas (de Kloet *et al.*, 2005). En concreto, la exposición a un estímulo estresante muy intenso, como es un estrés traumático (es decir que genera una sensación de horror y/o indefensión, según el DSM-V) producen alteraciones que pueden conducir al desarrollo de una patología psiquiátrica como el TEPT (Friedman *et al.*, 2011)

Estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia de esta patología es entre el 6 y 7 % de la población (Kessler *et al.*, 1995) y que una elevada proporción de la población se ha visto expuesta a algún tipo de estrés traumático (Morina *et al.*, 2014) pudiendo alcanzar hasta el 50%, aunque el porcentaje de desarrollo posterior de TEPT no alcance el 10 % (Kessler *et al.*, 2005). Sin embargo, la prevalencia de esta patología puede variar en grupos poblacionales de riesgo, zonas de conflicto y en función de la intensidad del estrés traumático, pudiendo ascender a valores de entre el 20 al 40% (de Jong *et al.*, 2001; Olaya *et al.*, 2015).

El TEPT (según el DSM-V) se define como una enfermedad psiquiátrica crónica, que genera respuestas mal-adaptativas a estrés y que se caracteriza por presentar síntomas que se pueden agrupar en 3 grandes grupos: 1) episódicos de re-experiencia del episodio traumático, 2) evitación de los estímulos asociados al episodio traumático y 3) ansiedad generalizada y síntomas de hipervigilancia (Rasmussen *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2011; Pitman *et al.*, 2012). Estas alteraciones psicológicas y conductuales tienen su origen en alteraciones estructurales y funcionales en diversas áreas del cerebro, como son la CPF, la amígdala o el hipocampo (Pitman *et al.*, 2012) y que a su vez producen una alteración en la actividad del eje HHA y del sistema nervioso simpático como se mostró en los primeros estudios con pacientes de TEPT (Mason *et al.*, 1986; Kosten *et al.*, 1987).

Se ha relacionado las alteraciones en del eje HHA en respuesta a estrés, con la aparición patologías psiquiátricas relacionadas con el estrés como la esquizofrenia, la depresión o el TEPT (Lupien *et al.*, 2009; Yehuda, 2009). Estudios clínicos han observado la alteración de los niveles basales de cortisol mostrando reducciones (Boscarino, 1996; Glover & Poland, 2002; Yehuda, 2002; Wingefeld *et al.*, 2015), no diferencias (Pitman & Orr, 1990) o incrementos (Liberzon *et al.*, 1999). La inconsistencia de los resultados pueden deberse al empleo de diversos protocolos, así como a la propia hospitalización de los pacientes para la recogida de muestras, lo cual puede implicar la evocación de recuerdos asociados al estrés traumático. En la actualidad se considera la reducción de los niveles basales de cortisol como marcador de TEPT (Yehuda, 2009; Pitman *et al.*, 2012). Añadido a ello, una característica ampliamente descrita en estos pacientes es un incremento en la respuesta de retroalimentación negativa del eje HHA tras el tratamiento sistémico con dexametasona (un análogo de glucocorticoides) (Yehuda *et al.*, 2004a, 2004b; Yehuda, 2009).

En modelos animales de exposición a estrés traumático se han mostrado niveles basales de corticosterona plasmática similares a los de animales no expuestos a trauma (van Dijken *et al.*, 1993; Louvart *et al.*, 2006, 2009). Por otra parte, algunos estudios han mostrado una sensibilización del eje HHA en forma de incrementos en los niveles plasmáticos de corticosterona (Cohen *et al.*, 2006) o de ACTH (van Dijken *et al.*, 1993) en respuesta a estrés. Añadido a ello, se han descrito resultados similares en modelos animales respecto al incremento de la retroalimentación negativa sobre el eje HHA tras la administración de dexametasona (Liberzon *et al.*, 1997) y además incrementos en la expresión de receptores GR y MR en el hipocampo de animales expuestos a estrés trauma, sugiriendo una relación de la expresión de estos receptores con el incremento de la retroalimentación negativa descrita (Ganon-Elazar & Akirav, 2013; Korem & Akirav, 2014; George *et al.*, 2015). El incremento en los niveles de corticosterona y la intensidad del estrés traumático podría estar relacionado con la sensibilización y la respuesta exagerada frente a estímulos neutros o no relacionados con el contexto traumático, posiblemente a través cambios en la expresión de diversos genes modulados a través de los efectos genómicos de los receptores GR y MR en áreas como la CPF, el hipocampo y la amígdala y que a su vez producen cambios en la plasticidad sináptica entre estas áreas (Deppermann *et al.*, 2014) y constituye una prueba de los posibles

mecanismos implicados en las alteraciones cognitivas descritas en pacientes de TEPT (Kaouane *et al.*, 2012).

1.5.1 Modelos animales para el estudio del estrés traumático

Entre los años 80 y los 90 los estudios en modelos animales de TEPT aportaron evidencias de alteraciones a largo plazo tras la exposición a estrés muy intenso, y permitieron la elaboración de criterios para evaluar la validez de dichos modelos (Yehuda & Antelman, 1993). Desde entonces, diversos modelos experimentales han sido validados como modelos animales para estudiar los efectos de la exposición a estrés traumático (Liberzon *et al.*, 2005) como son: la exposición a depredador natural (Wang *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2013a), el estrés agudo prolongado (Cui *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Ganon-Elazar & Akirav, 2013) y el shock eléctrico ineludible, modelo utilizado en la presente Tesis Doctoral (van Dijken *et al.*, 1992a; Hendriksen *et al.*, 2010). El modelo de exposición a depredador, a pesar de ser el que se acerca a un modelo más etológico, tiene la limitación de que no se puede modular fácilmente la intensidad de la respuesta de los animales (Cohen *et al.*, 2003). El modelo de estrés agudo prolongado también tiene limitaciones ya que no se administra un único tipo de estrés, sino una variedad de estímulos estresantes, haciendo que la característica que define al TEPT en humanos de la exposición a un único tipo de estrés no sea copiada en este modelo experimental (Yamamoto *et al.*, 2009). El IFS consiste en la exposición a un número variable de shocks, durante un breve periodo de tiempo y se caracteriza tanto por su impredecibilidad y no controlabilidad como por su alta intensidad, lo cual asemeja grandemente a las condiciones de un estrés traumático en humanos. Otra ventaja de este modelo es que se puede modular la intensidad del estrés (a diferencia de otros modelos como el de exposición a depredado) ya que estudios en animales y humanos han correlacionado la intensidad del estrés traumático con la severidad de los síntomas (Mikics *et al.*, 2008a, 2008b; de Jong *et al.*, 2001; Kessler *et al.*, 2005).

1.5.2 Shock eléctrico ineludible

El modelo de IFS de sus siglas en inglés *inescapable foot-shock* es uno de los modelos animales más utilizados en la investigación sobre el TEPT. Existe una gran diversidad de protocolos que varían entre el número, la intensidad y la duración de los shocks

eléctricos, así como la posibilidad de exponer a los animales al contexto donde recibieron el shock, que se conoce como re-exposición (Liberzon *et al.*, 2005). Sin embargo, un aspecto común, es que las alteraciones producidas por la exposición a este tipo de estrés traumático son resultado de dos procesos diferentes: por un lado se ha descrito un condicionamiento frente a estímulos asociados al contexto traumático (Pijlman & van Ree, 2002), que deriva de la denominada “incubación de miedo”; y por otro una “sensibilización” fisiológica a una gran variedad de estímulos neutros o estresantes no relacionados con el trauma (Stam *et al.*, 2000; Armario *et al.*, 2008) que se traduce en alteraciones conductuales como la hiper-reactividad frente a estímulos neutros y novedosos (no asociados con el trauma) (Stam *et al.*, 2000; Pamplona *et al.*, 2011); si bien, no se conoce con exactitud el grado de participación de cada uno de los procesos en el desarrollo de alteraciones (Siegmund & Wotjak, 2007a, 2007b).

Numerosos estudios han descrito alteraciones conductuales y fisiológicas en animales a largo (7 días) y muy largo plazo (28 días o más) expuestos a IFS. En concreto, una de las alteraciones conductuales más frecuentemente descritas es la inmovilidad frente a ambientes novedosos que ha sido empleada como índice de hipervigilancia, ya que los animales son expuestos a un contexto en donde el posible peligro es ineludible o difícil de evitar (van Dijken *et al.*, 1992a, 1993; Stam *et al.*, 1995; Pijlman & van Ree, 2002; Louvart *et al.*, 2006; Daviu *et al.*, 2010; Hendriksen *et al.*, 2010, 2012). Junto a ella, se han descrito alteraciones conductuales asociadas con síntomas de hipervigilancia y evitación empleando otros test como la respuesta exagerada de sobresalto (Olson *et al.*, 2011; Kinn Rød *et al.*, 2012), el test elevado en cruz (Louvart *et al.*, 2005; Daviu *et al.*, 2010), y la prueba de silencio repentino (van Dijken *et al.*, 1993; Murison & Overmier, 1998; Hendriksen *et al.*, 2012). También se ha descrito un incremento en la conducta neofóbica en el test de consumo de sacarina (van Dijken *et al.*, 1992a), así como una conducta de escape incrementada en test de evitación pasiva o el test de natación forzada (van Dijken *et al.*, 1992b; Pijlman *et al.*, 2003; Geerse *et al.*, 2006).

1.6. Enriquecimiento ambiental y estrés

El ambiente en el que se desarrolla un individuo, así como su estilo de vida son especialmente relevantes en la posterior aparición de enfermedades psiquiátricas o el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Harrington *et al.*, 2010; Mohajeri &

Leuba, 2009). Por ello, se ha estudiado como las variaciones en el ambiente que nos rodea puede influir sobre la función cerebral con el objetivo de desarrollar tratamientos de patologías psiquiátricas como el TEPT basados en la modificación de las condiciones ambientales (McOmish & Hannan, 2007; Hendriksen *et al.*, 2010). El modelo animal más empleado a este respecto es el del enriquecimiento ambiental (EA).

El EA es una modificación de las condiciones de mantenimiento de los animales de experimentación que consiste en un incremento de la estimulación social, sensorial y motora con respecto a las condiciones habituales de laboratorio (Rosenzweig, 2003), siendo las condiciones en las que se desarrollan estos animales muy variables entre los distintos grupos de investigación (Simpson & Kelly, 2011). El modelo de EA produce una serie de cambios plásticos, tanto morfológicos, como neuroquímicos y conductuales (van Praag *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2007) que tienen implicaciones en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, daño cerebral y patologías psiquiátricas como la esquizofrenia y el trastorno de estrés postraumático (TEPT) (Nithianantharajah & Hannan, 2006). También se ha descrito que el EA puede actuar reduciendo los efectos neuroquímicos y conductuales del estrés, constituyendo un modelo experimental de resistencia a estrés. En este contexto, se ha postulado que el desarrollo en estas condiciones supone la interacción incrementada con otros individuos en un entorno cambiante, lo cual somete al individuo a episodios de estrés moderado de forma repetida, lo que daría lugar a un procesos similar al de habituación a estrés (Fox *et al.*, 2006; Segovia *et al.*, 2009).

A nivel neuroquímico y hormonal se han descrito cambios producidos por el mantenimiento de los animales en condiciones de EA sobre diversos sistemas neurotransmisores. Se han descrito niveles más elevados de noradrenalina y serotonina en el hipocampo de animales mantenidos en EA (Brenes *et al.*, 2009) que se correlacionan con niveles de ansiedad menores en estos animales. Además, estos datos se correlacionan con el incremento en la expresión de receptores de serotonina en esta misma área del cerebro (Brenes *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha descrito una reducción en la liberación de dopamina durante estrés agudo en la CPF de animales mantenidos en condiciones de EA (Del Arco *et al.*, 2007b) que se correlaciona con el menor incremento de corticosterona mostrada en esta misma área del cerebro (Garrido *et al.*, 2013). Estos resultados, apoyan a estudios previos que muestran una reducción en

los incrementos de los niveles de corticosterona en respuesta a estrés en los animales mantenidos en EA (Mlynarik *et al.*, 2004; Moncek *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2009; Sztainberg *et al.*, 2010).

La capacidad del EA para modificar los niveles de neurotransmisores en el cerebro podría explicar en parte el incremento de los mecanismos de plasticidad (Moser *et al.*, 1997; Kolb & Whishaw, 1998; Mohammed *et al.*, 2002; Leggio *et al.*, 2005; Sale *et al.*, 2009), el aumento de la síntesis de factores tróficos (Dahlqvist *et al.*, 1999; Mora *et al.*, 2007; Sale *et al.*, 2007), la neurogénesis (Kempermann *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1999; Segovia *et al.*, 2006) descritos en estos animales. Los cambios en la liberación de monoaminas y de otros sistemas neurotransmisores y moduladores están en paralelo respecto a los cambios morfológicos, que a su vez condicionan la respuesta conductual y el aprendizaje de estos animales (van Praag *et al.*, 2000).

En concordancia con los cambios celulares y neuroquímicos producidos por el EA, se han descrito cambios conductuales en los animales mantenidos en estas condiciones experimentales. Una de las adaptaciones conductuales más ampliamente descritas en los modelos de EA con roedores es una habituación más rápida de la actividad motora espontánea en la prueba del campo abierto (Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Elliott & Grunberg, 2005; Del Arco *et al.* 2007b; Green *et al.*, 2010; Garrido *et al.* 2013) y se ha sugerido que este cambio está relacionado con una mayor capacidad exploratoria de estos animales. En consonancia con estos resultados, se ha mostrado que animales en EA muestran mayores niveles de exploración de un objeto novedoso inicialmente, lo cual sugiere una mayor eficacia exploratoria en estos animales (Zimmermann *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Estos resultados están en concordancia con los menores niveles de impulsividad mostrados por estos animales (Wood *et al.*, 2006; Dalley *et al.*, 2007) y con una mayor resistencia frente a la adicción a drogas (Solinas *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2010). Otros estudios han mostrado que el EA reduce los índices de ansiedad en pruebas como la natación forzada (Brenes *et al.*, 2009), el test elevado en cruz (Chapillon *et al.*, 1999; Brenes *et al.*, 2009; Goes *et al.*, 2015) y la exposición a un macho dominante (Lehmann & Herkenham, 2011). Añadido a ello, los animales mantenidos en condiciones de EA han mostrado una mejor aprendizaje en pruebas de condicionamiento a miedo (Rampon *et al.*, 2000; Barbelivien *et al.*, 2006) así como una mejor memoria emocional (Kazlauckas *et al.*, 2011; Leger *et al.*, 2012).

2 Corteza prefrontal

2.1 Estructura anatómica de la corteza prefrontal

La CPF es la región cortical más anterior del lóbulo frontal del cerebro de mamíferos (Fuster, 1997) Esta área ha alcanzado en el ser humano un volumen relativo superior a cualquier otra especie, siendo su desarrollo filogenético más tardío en la especie humana (Uylings & Van Eden, 1990; Preuss, 1995) Se ha discutido ampliamente acerca de la homología entre las distintas regiones diferenciadas en la CPF en roedores y en primates (Preuss, 1995; Uylings *et al.*, 2003); no obstante, el consenso de que si bien en primates las funciones en las que está involucrada la CPF pueden ser más amplias que en el caso de roedores, la homología entre ambos grupos es hoy indiscutible (Uylings *et al.*, 2003). Así pues, la definición más aceptada para la CPF tanto de roedores como en primates es la región cerebral que recibe aferencias recíprocas del núcleo medio dorsal del tálamo, característica anatómica presente en todos los mamíferos (Leonard, 1969; Fuster, 2009)

Estudios anatómicos, neuroquímicos y holísticos entre áreas han permitido diferenciar las siguientes regiones en la CPF (Dalley *et al.*, 2004) y que se muestran en la figura I2:

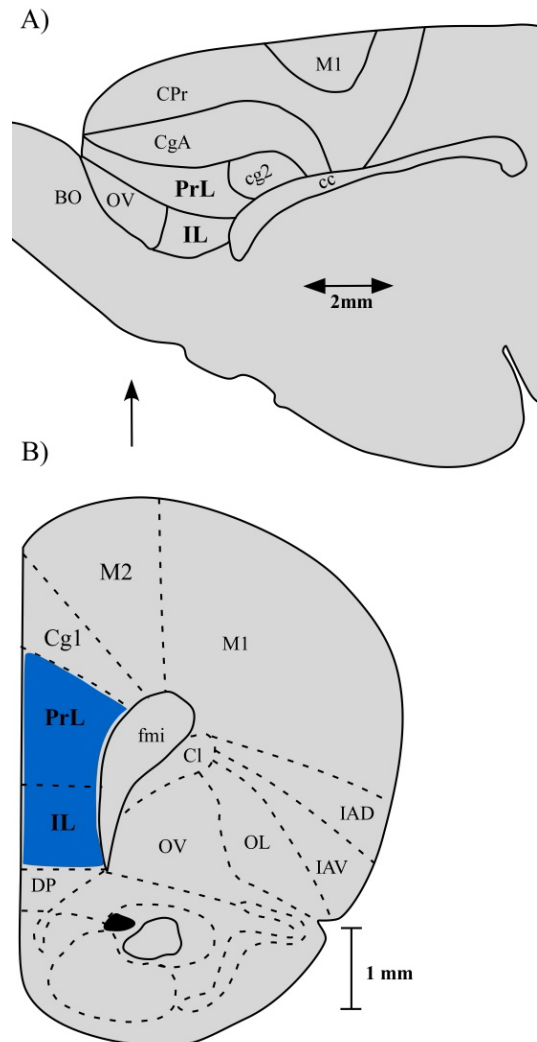


Figura I2. Esquema de la estructura y localización de la corteza prefrontal de la rata. A) Vista lateral; B) Sección coronal unilateral. En el esquema se muestran en azul la región medial ventral de la CPF. Abreviaturas: **BO**: bulbo olfatorio; **cc**: cuerpo calloso; **Cg₂**: corteza cingulada; **CgA**: corteza cingulada anterior; **CI**: claustrum **DP**: corteza dorsal peduncular **IAD**: corteza insular agranular dorsal; **IAV**: corteza insular agranular ventral; **IL**: corteza infralímbica; **M2**: área motora secundaria; **PrL**: corteza prelímbica; **PrC**: corteza precentral; **VLO**: corteza orbital ventrolateral; **OL**: corteza orbital lateral; **M1**: área motora primaria **OV**: corteza orbital ventral.

- Frontal medial: se refiere a la región localizada entre la pared medial anterior y posterior al cuerpo caloso y a su vez se subdivide en:
 - Región dorsal: formada por las cortezas precentral y cingulada anterior.
 - Región ventral: formada por las cortezas prelímbica, infralímbica y orbital medial.
- Lateral: formada por las cortezas insular agranular ventral, insular agranular dorsal y orbital lateral.
- Ventral: formada por las cortezas orbital ventral y orbital ventral lateral.

Cada una de estas subregiones de la CPF presenta funciones asociadas diferentes que están determinadas a su vez por el patrón de conexiones con otras áreas cerebrales o incluso con la propia CPF (Dalley *et al.*, 2004). El presente trabajo de investigación se ha centrado en la región ventral medial de la CPF por su función en la regulación de la respuesta a estrés.

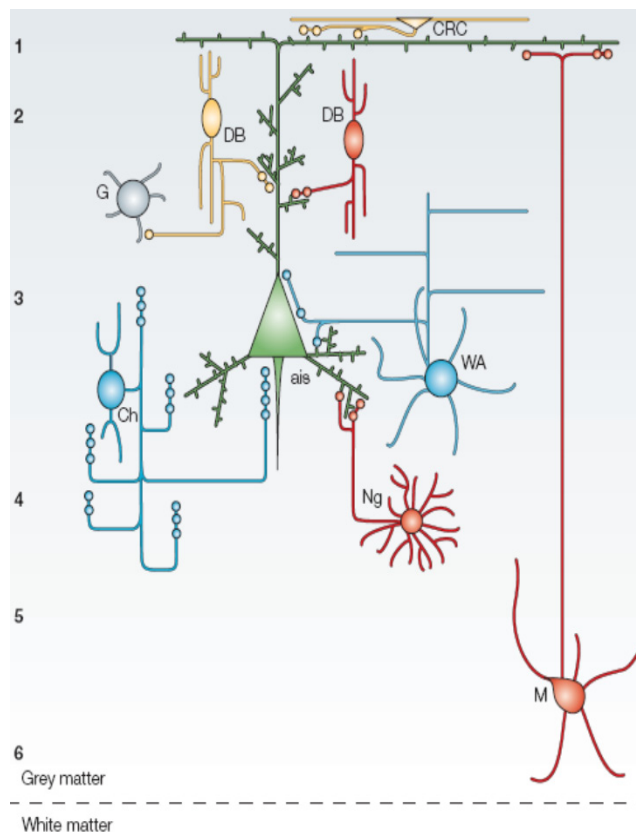
2.2 Citoarquitectura de la corteza prefrontal

En la CPF al igual que en otras áreas de la corteza cerebral existen principalmente dos tipos de neuronas denominadas espinosas y no espinosas. Las neuronas espinosas pueden ser piramidales y no piramidales (DeFelipe & Fariñas, 1992). Las neuronas piramidales son las más numerosas de la corteza (70-85 %) y están presentes en todas las capas de la corteza, exceptuando la capa I. Constituyen un grupo muy heterogéneo, con diversas morfologías en la arborización dendrítica, en las proyecciones colaterales axónicas a nivel del soma celular. Estas diferencias pueden traducirse en una diversidad funcional entre los distintos tipos de neuronas piramidales (DeFelipe & Fariñas, 1992; Somogyi *et al.*, 1998). Del polo superior de la neurona piramidal, de soma triangular, nace una dendrita que se dirige a la superficie, alcanzando la capa I de la corteza, en donde se ramifica profusamente. En la base del soma se originan largas dendritas que se dirigen trasversalmente o a capas más profundas. En la base de la célula se origina el axón, que puede llegar a formar proyecciones que abandonan la corteza y emitir varias colaterales que constituyen circuitos corticales locales de retroalimentación. Estas neuronas son glutamatérgicas. Las neuronas no espinosas son interneuronas con distintas morfologías y patrones de arborización dendrítica. Constituyen del 15 al 30 % de las neuronas de la corteza cerebral y están presentes en todas las áreas y capas

corticales. La mayoría de estas interneuronas liberan el neurotransmisor GABA (Somogyi *et al.*, 1998).

Estas interneuronas forman un grupo muy heterogéneo, con varias sub-poblaciones que pueden distinguirse por la combinación de características morfológicas, fisiológicas y moleculares (figura I3). Un grupo particular y de gran relevancia lo forman las interneuronas que participan en la regulación sobre las neuronas piramidales de proyección (McBain & Fisahn, 2001; Markram *et al.*, 2004). Estas interneuronas reciben el nombre de células candelabro (debido a los dibujos procedentes de los estudios realizados por Santiago Ramón y Cajal) y se caracterizan por expresar una proteína de unión a calcio denominada parvoalbúmina (Lewis & Lunn, 1990). Además estas células proyectan un axón que sinapsa de forma exclusiva con el segmento inicial de las neuronas piramidales, a través de receptores GABA_A, presentando un patrón muy rápido de disparo de potenciales de acción (Somogyi *et al.*, 1998). Las características descritas para las interneuronas GABA, convierten a estas células en posibles reguladores de las proyecciones de las piramidales.

Figura I3. Representación de las características morfológicas y bioquímicas de las interneuronas GABA de la CPF. En el esquema se aprecian las interneuronas en función de las proteínas de unión a calcio que expresan parvoalbúmina (azul), calbindina (rojo) y calretinina (amarillo) y la localización de las aferencias inhibitoras sobre una neurona piramidal (verde) procedentes de distintas clases de interneuronas GABA. Las neuronas candelabro (**Ch**) y las neuronas en cesta (**WA**) emiten proyecciones inhibitoras que sinapsan con el soma y con el primer segmento del axón de la neurona piramidal. Las interneuronas bipolares (**DB**) y neuronas de Martinotti (**M**) emiten proyecciones que sinapsan con dendritas distales de las neuronas piramidales, así como las células de glía (**Ng**). Por último, las células Db y de Cajal-Retzius (**CRC**) parecen estar innervando dendritas distales de células piramidales y otras neuronas GABAérgicas (**G**) de la CPF (Modificado de Lewis *et al.*, 2005).



2.3 Conexiones anatómicas de la corteza prefrontal

La CPF tiene un papel crucial en la regulación y procesamiento de información procedente de diversas áreas corticales y subcorticales, modulando funciones motoras, emocionales y mnemónicas. Este papel regulador depende de las conexiones directas ó indirectas que presenta con todas estas regiones cerebrales, que en muchas ocasiones son recíprocas. Estudios anatómicos realizados mediante la combinación de distintas técnicas inmunohistoquímicas, de transporte retrógrado e hibridación *in situ* han permitido diferenciar y definir la anatomía y la naturaleza (tipo de neurotransmisión) de las proyecciones en la CPF.

2.3.1 Conexiones entre la corteza prefrontal y otras áreas de corteza

Las conexiones entre la CPF y otras áreas de corteza presentan una organización topográfica específica y gran parte de ellas son recíprocas. Esta reciprocidad permite la distinción de tres secciones (Reep *et al.*, 1990):

- Ventral: une las regiones prelímbica e infralímbica con las regiones entorrinal y perirrinal.
- Rostro-caudal: une al área medial precentral y la corteza cingulada con la corteza visual y retrosplenial.
- Rostral: une a la corteza cingulada y al área medial precentral con la corteza sensorimotora y la corteza de asociación somato-sensorial.

2.3.2 Conexiones entre CPF y áreas subcorticales

- Núcleo medio dorsal del tálamo: La mayor densidad de conexiones existentes en la CPF proceden de este núcleo del tálamo (Donoghue & Parham, 1983). Estas conexiones son recíprocas y se distribuyen de manera ordenada terminando principalmente en las capas I y III de la CPF (Uylings & Van Eden, 1990).
- Prosencéfalo basal o núcleo basal de la estría terminal: Las proyecciones desde CPF a esta región son glutamatérgicas y predominantemente recíprocas (Gaykema *et al.*, 1991; Zaborszky *et al.*, 1997) Estas conexiones son recíprocas, de manera que las

proyecciones colinérgicas que parten de esta área, constituyen la principal innervación colinérgica de la CPF (Jacobson *et al.*, 2008).

- Mesencéfalo y puente: Estudios neuroquímicos han descrito conexiones dirigidas al área tegmental ventral (ATV) A10 (Carr & Sesack, 2000) y el locus coeruleus (A6 y A4) (Arnsten & Goldman-Rakic, 1984; Jodo *et al.*, 1998). El ATV envía a su vez proyecciones a través del haz prosencefálico medial (Hökfelt *et al.*, 1974) y constituye la principal proyección dopaminérgica a la CPF (Björklund & Dunnett, 2007). Por otra parte, el locus coeruleus es el principal responsable de la innervación noradrenérgica a la corteza (Morrison *et al.*, 1979) siendo similar entre roedores y primates (Felten & Sladek, 1983). Otras áreas que reciben proyecciones de la CPF son el núcleo del rafe dorsal (B7), la sustancia gris periaqueductal, el núcleo del tracto solitario (NTS), la sustancia negra *pars compacta* (A9) y la formación reticular (Uylings & Van Eden, 1990; Vertes, 2004).
- Sistema límbico: Las conexiones con áreas del sistema límbico como la amígdala y el hipotálamo resultan especialmente relevantes desde el punto de vista de las funciones de la CPF sobre la regulación del eje HHA y la memoria emocional. En concreto se han descrito proyecciones la amígdala (en concreto a la región basolateral) que son recíprocas y que parten esencialmente desde las regiones prelímbica e infralímbica de la CPF (Groenewegen & Uylings, 2000; Vertes, 2004; Gabbott *et al.*, 2005). Otras áreas del sistema límbico con las que está interconectada la CPF son el núcleo accumbens (Burns *et al.*, 1996; Fuster, 1997; Tzschentke & Schmidt, 2000) y el hipocampo (Vertes, 2004; Gabbott *et al.*, 2005).

2.4 Funciones de la corteza prefrontal

El patrón de conexiones ya mencionado determinará a su vez las funciones en las que la CPF participa (Hoover & Vertes, 2007). Entre las múltiples funciones con las que se ha relacionado a esta área cerebral se encuentran: la toma de decisiones (Euston *et al.*, 2012), la memoria de trabajo (Williams & Goldman-Rakic, 1995; D'Esposito, 2007), la flexibilidad cognitiva (Ragozzino, 2002; Robbins & Roberts, 2007), la atención selectiva (Birrell & Brown, 2000; Kozak *et al.*, 2005, 2006) la organización temporal del comportamiento (Fuster, 2000; Uylings *et al.*, 2003), la actividad motora

(Tzschentke & Schmidt, 2000), la interacción social (de Bruin, 1990), la inhibición del comportamiento (Robbins, 2007b), el procesamiento cognitivo de las recompensas (Mora & Myers, 1977). Además la CPF tiene un papel relevante en la respuesta a estrés (Deutch & Roth, 1990; Thierry *et al.*, 1990) y en la modulación de la formación y la expresión de memorias aversivas (Izquierdo *et al.*, 2007; Barsegyan *et al.*, 2010; Sotres-Bayon & Quirk, 2010) que son especialmente relevantes en este trabajo de investigación. Dado el papel de CPF medial en la regulación de la respuesta a estrés (Amat *et al.*, 2005; Ulrich-Lai & Herman, 2009), se ha propuesto que la alteración en la función de la CPF puede ser la base de una respuesta mal-adaptativa a estrés (Moghaddam 2002; Thompson *et al.*, 2004; Van Os *et al.*, 2010; Fusar-Poli *et al.*, 2011).

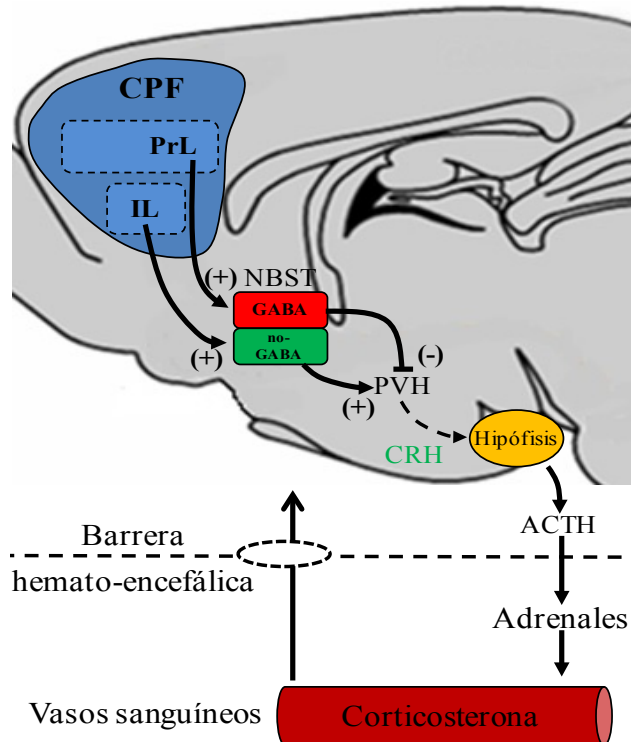
2.5 Corteza prefrontal y regulación de la respuesta a estrés

Se ha establecido una clara diferenciación entre la región dorsal y la región ventral de la CPF en base a características anatómicas, holísticas y funcionales (Heidbreder & Groenewegen, 2003). Aunque se ha propuesto un papel complementario de las cortezas prelímbica e infralímbica sobre la regulación del eje HHA así como en la regulación del sistema nervioso autónomo en respuesta a estrés agudo psicogénico (Shah & Treit, 2003; Ulrich-Lai & Herman, 2009; Radley *et al.*, 2013), existe cierta controversia en el papel concreto que juegan estas dos regiones sobre la regulación del eje HHA. Estudios de lesiones concretas en la corteza prelímbica han mostrado incrementos en la secreción de ACTH y en la duración de la secreción de corticosterona, en respuesta a estrés (Radley *et al.*, 2006), así como incrementos en la expresión de c-fos en el (PVH) (Brake *et al.*, 2000; Gerrits *et al.*, 2003) y un incremento de la frecuencia cardíaca en respuesta a estrés tras el bloqueo de esta región prefrontal (Tavares *et al.*, 2009). En concordancia con estos resultados, la activación farmacológica de la corteza prelímbica produce un bloqueo sobre los incrementos de ACTH (Jones *et al.*, 2011) y corticosterona en respuesta a estrés así como un bloqueo sobre la consolidación de la memoria aversiva en un test de evitación pasiva (Garrido *et al.*, 2012b). Por el contrario, la corteza infralímbica ha sido involucrada en la activación de la respuesta del sistema nervioso autónomo así como en la activación del eje HHA en respuesta a estrés. La lesión de esta región cortical produce una reducción de la frecuencia cardíaca en respuesta a estrés (Tavares *et al.*, 2009) así como una reducción en la expresión de c-fos en el (PVH)

(Radley *et al.*, 2006). Añadido a esto, se ha descrito que la lesión de la corteza infralímbica produce en roedores, un bloqueo en la adquisición de memoria aversiva en un test de evitación pasiva (Jinks & McGregor, 1997).

Esta función complementaria de las cortezas prelímbica e infralímbica en la regulación del eje HHA y del sistema nervioso autónomo en respuesta a estrés se debe, en parte, al patrón de conexiones diferencial que presentan estas áreas. La corteza prelímbica (homóloga a la región cingulada dorsal anterior en primates y humanos) recibe proyecciones del hipocampo ventral y de la región basolateral de la amígdala, las cuales son áreas extensamente descritas en su relación con la expresión de miedo condicionado (Bouton, 2002; Dalley *et al.*, 2004; Vertes, 2004; Sierra-Mercado *et al.*, 2011; Sotres-Bayon *et al.*, 2012). En concreto, estudios de electrofisiología han mostrado una tasa de disparo sostenida de neuronas de esta región cerebral tras la administración un estímulo condicionado a los animales, y que coincidiría con el periodo de completa inmovilidad, esto reflejaría la actividad de procesamiento de esta región (Burgos-Robles *et al.*, 2009). La corteza prelímbica regula la función del PVH mediante proyecciones indirectas GABAérgicas que parten del núcleo basal de la estría terminal (NBST) que inhiben la liberación de CRH y por tanto la liberación de corticosterona en respuesta a estrés (Radley *et al.*, 2013). Por otra parte, la región infralímbica (homóloga a la región ventro-medial en primates y humanos) está implicada en los procesos de extinción de la memoria aversiva, puesto que se ha mostrado incrementos de actividad de neuronas piramidales de esta región frente a estímulos neutros o asociados a eventos no aversivos (Cho *et al.*, 2013) y de actividad en esta región específica del cerebro (Quirk & Beer, 2006). En relación a la regulación del eje HHA en respuesta a estrés, la corteza infralímbica actuaría mediante proyecciones indirectas desde una región no GABAérgica del NBST al hipotálamo, desencadenando la liberación de CRH que estimula la liberación de ACTH en la hipófisis permitiendo la posterior secreción de corticosterona en respuesta a estrés (Radley *et al.*, 2006, 2009, 2012). Además, esta región también está interconectada con la amígdala, preferentemente con la región medial de la amígdala, cuyas funciones están relacionadas con la expresión de miedo, la activación del sistema nervioso autónomo así como la regulación del eje HHA (Rodrigues *et al.*, 2009; Rozeske *et al.*, 2015) (Ver figura I4).

Figura I4. Esquema de un corte transversal del cerebro de rata en el que se representa el papel complementario de las regiones prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la CPF en la regulación del eje HHA en respuesta a estrés. La PrL proyecta y activa una región GABAérgica (en rojo) del núcleo basal de la estría terminal (NTBS). Estas proyecciones GABAérgicas inhiben al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH) y bloquean la liberación de CRH y por tanto la de ACTH en la hipófisis, lo que inhibe la síntesis de corticosterona y su liberación a los vasos sanguíneos. Por otra parte, la IL proyecta y activa una región no GABAérgica del NTBS lo que estimula la liberación de CRH desde el PVH que facilita la liberación de ACTH desde la hipófisis. El incremento de ACTH estimula la síntesis y liberación de corticosterona desde las glándulas adrenales, y posteriormente ejercerá sus efectos en el cerebro.



2.6 Corteza prefrontal y esquizofrenia

Dado el papel de la CPF en la regulación del eje HHA en respuesta a estrés, se ha sugerido una relación entre la función alterada de la CPF y una mayor sensibilidad frente al estrés que pueden facilitar el desarrollo de psicosis (Corcoran *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Van Winkel *et al.*, 2008; Brunelin *et al.*, 2010; Van Os *et al.*, 2010; Mizrahi *et al.*, 2012; Moghaddam, 2013). De hecho, estudios en humanos han mostrado una correlación entre la función anormal de la CPF y una mayor activación dopaminérgica durante estrés (Soliman *et al.* 2008) y durante el desarrollo de tareas cognitivas (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2002; Fusar-Poli *et al.*, 2011). Estudios en animales han mostrado que la inyección de antagonistas NMDA en animales produce alteraciones conductuales como la hiperactividad motora, que recuerdan a los síntomas presentes en pacientes diagnosticados de psicosis (Takahata & Moghaddam, 2003).

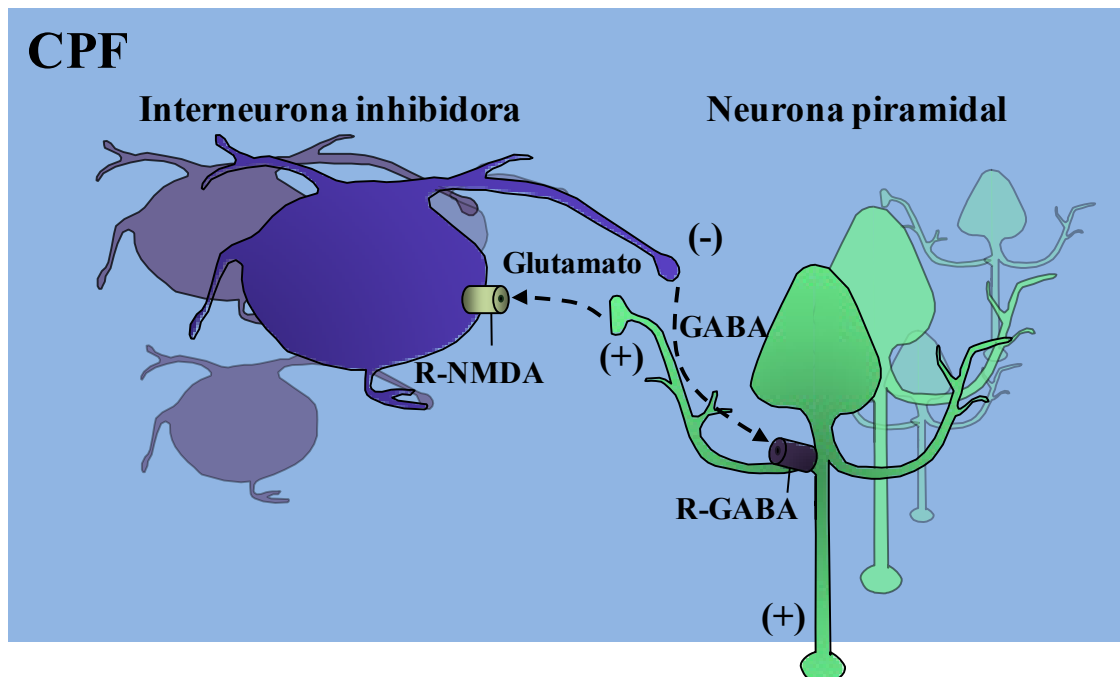
Una de las hipótesis más ampliamente estudiadas en animales de experimentación es la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia. Según la cual, la disfunción de los receptores de glutamato NMDA en la CPF estaría implicada en la alteración de los circuitos cortico-límbicos asociados a la psicosis (Jentsch & Roth, 1999; Krystal *et al.*, 2003; Yang & Chen, 2005; Lewis & Gonzalez-Burgos, 2006). Esta hipótesis se basa en

el efecto tras la administración sistémica de antagonistas NMDA, que produce en personas sanas, síntomas similares a los de pacientes diagnosticados de esquizofrenia (Javitt & Zukin, 1991; Lahti, 1995) y agrava los síntomas en pacientes esquizofrénicos (Lahti *et al.*, 1995, 2001). Además, estudios realizados en animales de experimentación han mostrado una hiperactividad motora (Jentsch *et al.*, 1998) y un incremento de la tasa de disparo de las neuronas piramidales de la CPF (Suzuki *et al.*, 2002) tras la administración sistémica de antagonistas NMDA. Añadido a ello, la inyección local en la CPF de antagonistas de NMDA incrementa la actividad motora, la liberación de dopamina, acetilcolina y corticosterona en áreas límbicas como el núcleo accumbens, el hipocampo y la amígdala de la rata (O'Neill & Liebman, 1987; Crawley *et al.*, 1992; Del Arco & Mora, 2008; Del Arco *et al.*, 2011).

2.6.1 Mecanismos celulares de la disfunción de NMDA en la psicosis

En la CPF, la regulación de las neuronas piramidales de proyección áreas límbicas y subcorticales ocurre a través de un mecanismo de retroalimentación negativa que se establece a través de un grupo de interneuronas específicas. Diversos autores han centrado su atención en las alteraciones sobre este circuito por sus efectos sobre la desregulación de la actividad de las proyecciones corticales y su papel en el desarrollo de la psicosis (Gordon, 2010) (Figura I5). De hecho, un estudio ha mostrado que la alteración de este mecanismo de retroalimentación, mediante la alteración funcional de los receptores NMDA localizados en las interneuronas de la CPF mencionadas anteriormente, produce un estado de hiperactividad y un incremento en la actividad de las neuronas piramidales similares a los observados en los estudios de inyecciones de antagonistas NMDA (Belforte *et al.*, 2010). Añadido a ello, estudios de electrofisiología han mostrado que la administración sistémica de antagonistas NMDA produce una disminución en la tasa de disparo de las interneuronas y al mismo tiempo un incremento en la tasa de disparo de las neuronas piramidales en la CPF (Hodayoun & Moghaddam, 2007) y en el hipocampo (Rujescu *et al.*, 2006). Las interneuronas GABAérgicas, son las neuronas moduladoras de la actividad de las neuronas de proyección corticales (Jackson *et al.*, 2004) y son más sensibles a los antagonistas NMDA que las neuronas piramidales (Grunze *et al.*, 1996). Además, la conformación de los receptores NMDA sufre cambios a lo largo del desarrollo y hasta llegar a la fase adulta (Wang & Gao, 2009), esto convierte a los receptores NMDA localizados sobre estas interneuronas en

dianas potenciales de diversas alteraciones, que pueden ser cruciales para el desarrollo posterior de psicosis (Lewis *et al.*, 2005).



PROYECCIONES A: ÁREAS SUBCORTICALES Y LÍMBICAS

Figura I5. Mecanismo de retroalimentación negativa entre la neurona piramidal y la interneurona GABA en la CPF. El incremento de la tasa de disparo en la neurona excitadora genera a su vez un incremento de la actividad de la interneurona inhibidora a través de los receptores NMDA. A su vez, la interneurona activará los receptores GABA localizados en el primer segmento del axón de la neurona piramidal, regulando así la actividad de las proyecciones descendentes a áreas subcorticales y límbicas.

En este contexto, la CPF y su interacción con la amígdala se ha implicado en el conjunto de alteraciones neuroquímicas y conductuales que ocurren en la esquizofrenia (Williams *et al.*, 2004). Estudios de los patrones de estimulación y de electroencefalografía han mostrado alteraciones en la amígdala de pacientes esquizofrénicos (Stevens, 1973; Torrey & Peterson, 1974; Fudge & Emiliano, 2003). En pacientes sanos, la estimulación directa de la amígdala reproduce comportamientos clínicamente similares a los mostrados por pacientes diagnosticados de esquizofrenia, como miedo ansiedad y alucinaciones complejas (Halgren *et al.*, 1978; Gloor *et al.*, 1982). Estudios más recientes han descrito una reducción del volumen de la amígdala, así como una alteración en la respuesta conductual ante estímulos emocionales de pacientes diagnosticados de esquizofrenia (Taylor *et al.*, 2002, 2005).

3 Amígdala

3.1 Estructura anatómica de la amígdala

La amígdala fue descrita por primera vez a principios del siglo XIX en humanos, por K.F. Burdach, quien la denominó así por el aspecto almendrado que presentaba y se localiza en la región medial anterior del lóbulo temporal y se extiende rostralmente hasta el núcleo basal de la estría terminal (McDonald, 1992).

La estructura y funciones de esta región cerebral están evolutivamente muy conservadas (Moreno & González, 2007; Pabba, 2013). Mediante el empleo de marcadores de desarrollo del sistema nervioso como los genes *pax*, evolutivamente muy conservados en el desarrollo (Joven *et al.*, 2013; Bandín *et al.*, 2014) y de otros factores de transcripción se han observado diferencias y homologías en los patrones conectivos y por tanto en la función que desempeña el complejo amigdalino en los distintos filos de tetrápodos anamniotes y amniotas (Swanson & Petrovich, 1998; Moreno & González, 2003). La complejidad de la amígdala parece ligada a un incremento en la complejidad del medio (paso del agua a la tierra) (Pabba, 2013).

La amígdala de mamíferos se describió por primera vez a principios del siglo XX cuando se detalló su compleja estructura, conformada por una gran diversidad de núcleos (Johnston,

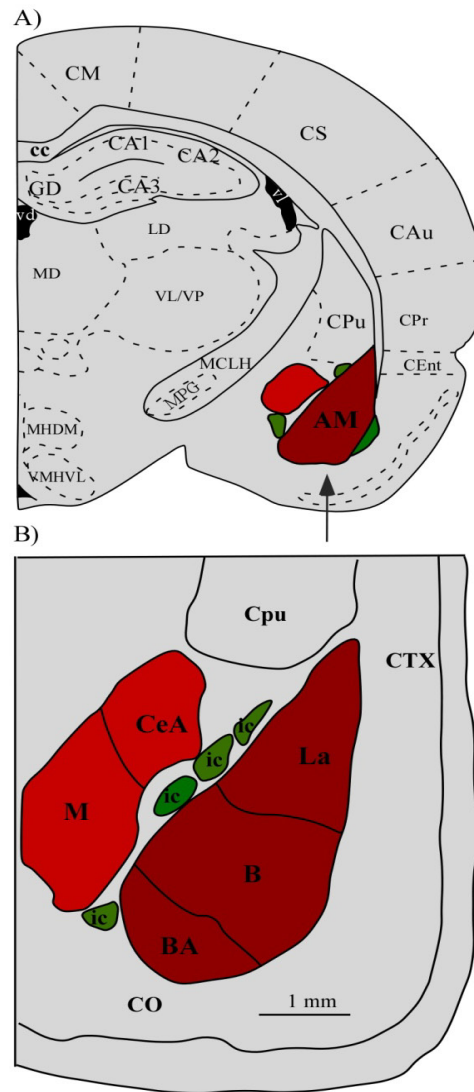


Figura 16. Esquema de la estructura y localización de la amígdala de la rata. A) Sección coronal unilateral; B) Ampliación sobre el lóbulo temporal. En el esquema se muestra en marrón la región basolateral compuesta por los núcleos lateral (**La**), basal (**B**) y basal accesorio (**BA**). En rojo, la región medial con los núcleos central (**CeA**) y medial (**M**) y en verde los núcleos intercalados (**ic**). Abreviaturas: (**CA1**, **Ca2** y **Ca3**) cuerno de Amón regiones 1, 2 y 3; (**CAu**) corteza auditiva; (**cc**) cuerpo caloso; (**CEnt**) corteza entorrinal; (**CM**) corteza motora; (**CPr**) corteza piriforme; (**CPu**) Caudado putamen; (**CS**) corteza sensorial; (**GD**) giro dentado; (**MCLH**) núcleo magnocelular del hipotálamo; (**MD**) núcleo medial del tálamo; (**MHDM**) medial dorsal del hipotálamo; (**MPG**) núcleo geniculado medial; (**LD**) núcleo lateral dorsal del tálamo; (**VMHVL**) núcleo medio ventral del hipotálamo; (**VL/VP**) núcleos ventral lateral y ventral posterior del tálamo.

1923). Estudios histológicos, inmunohistoquímicos y holísticos han permitido diferenciar tres regiones principales anatómicas y funcionalmente diferentes (LeDoux, 2007) (ver Figura I6):

- Región basolateral: que incluye al núcleo lateral, al núcleo basal y al basal accesorio (Krettek & Price, 1978).
- Región medial: que incluye al núcleo central, central medial, central lateral, central capsular y ventral y a la parte de la amígdala incluida en el NBST (McDonald, 1982; Cassell *et al.*, 1986).
- Núcleos intercalados: localizados entre la región basolateral y la región medial (Millhouse, 1986; Sah *et al.*, 2003).

3.2 Citoarquitectura de la amígdala

La amígdala presenta una organización y citoarquitectura similar al de otras partes del telencéfalo. En este sentido la región basolateral presenta una composición celular muy similar al de otras regiones corticales, con la diferencia de que parecen ordenadas de forma aleatoria en vez de en capas. Estudios de marcaje han mostrado que aproximadamente el 80 % de neuronas son piramidales, con una elevada densidad de espinas dendríticas y formando sinapsis no solo dentro de esta región, sino que envían axones a la región central de la amígdala y al hipocampo. Las interneuronas constituyen el 20 % restante de células neuronales. Son en general de tamaño pequeño, sin embargo de morfología variada, muy similar a las interneuronas de corteza cerebral (ver figura I2) (McDonald, 1982, 1992; Davis *et al.*, 1994; Pitkänen *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2003; Mascagni & McDonald, 2009; Pape & Paré, 2010; Orsini & Maren, 2012). Por el contrario, la región medial está más relacionada con el estriado y por tanto presenta grandes similitudes citoarquitectónicas con esta región cerebral. Estudios de marcaje neuronal han mostrado que está formado principalmente por interneuronas GABAérgicas de pequeño tamaño (Cassel *et al.*, 1986), describiéndose grandes diferencias morfológicas entre las interneuronas que conforman los distintos núcleos de esta región de la amígdala. En esta región aparecen neuronas de proyección, que envían axones a diversas estructuras como el hipotálamo o la sustancia gris periacueductal (McDonald, 1982; Davis *et al.*, 1994; Pitkänen *et al.*, 1997; Swanson & Petrovich, 1998; Sah *et al.*, 2003; Pape & Paré, 2010). La región formada por los núcleos intercalados

está constituida por tres grupos diferenciados alrededor de la amígdala. Existen dos tipos de neuronas dentro de los grupos que conforman a los ITC y son comparables a las neuronas de estriado. El primer grupo consiste en neuronas espinosas que sinapsan con núcleos de la región basolateral y medial (Millhouse, 1986). El Segundo grupo de neuronas presenta un soma alargado con dendritas de tipo espinosa y sin espinas, las cuales no parecen ser GABAérgicas, puesto que responden más al marcaje de acetilcolina (Millhouse, 1986; Sah *et al.*, 2003).

3.3 Conexiones anatómicas de la amígdala

Cada región de la amígdala presenta un patrón único de proyecciones aferentes y eferentes. En concreto, la región basolateral de la amígdala es la principal puerta de entrada de proyecciones aferentes a la amígdala (McDonald, 1998), mientras que la región medial es la principal estación de salida de información de la amígdala, (Krettek & Price, 1978). Entre ambos, una compleja red de conexiones intranucleares permite la integración, modulación y posterior transmisión de la información para generar respuestas fisiológicas y conductuales relevantes.

3.3.1 Conexiones entre regiones de la amígdala

El patrón de conexiones entre núcleos de la amígdala sigue una dirección dorso-ventral y latero-medial (Krettek & Price, 1978), es decir desde el núcleo lateral al basal anterior y desde la región basolateral a la región medial, en las que la transmisión GABAérgica juega un papel fundamental (Ehrlich *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2014) y que coincide con la dirección de entrada sensorial de información y salida de información modulando las respuestas emocionales acorde a las circunstancias que rodean al individuo (Pitkänen *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2003; Ehrlich *et al.*, 2009). De esta forma, la información puede ser procesada por diversos sistemas y modificada mediante interacciones con distintas áreas (que permiten la integración de información sensorial de diversa naturaleza (McDonald *et al.*, 1996; Jolkkonen & Pitkänen, 1998; Pitkänen *et al.*, 2000; Sah *et al.*, 2003). Añadido a esto, los núcleos intercalados tienen un papel relevante en los circuitos intra-amigdalinos de procesamiento y regulación de la función (Sha *et al.*, 2003).

3.3.2 Conexiones de la amígdala con áreas corticales y subcorticales

Como se ha descrito anteriormente, la región basolateral es la principal área de entrada de información sensorial a la amígdala. Es por ello, que esta región de la amígdala recibe proyecciones principalmente desde áreas corticales y talámicas así como otras regiones del sistema límbico como el hipocampo la CPF y otras regiones de asociación polimodal. (Turner & Herkenham, 1991; McDonald, 1998). Por otra parte, la región medial de la amígdala y en concreto el núcleo central es la principal estación de salida de información de la amígdala. Esta áreas está conectada bien unidireccional o de manera recíproca con múltiples áreas corticales y subcorticales que participan en la generación de respuestas conductuales, autonómicas, endocrinas relacionadas con el (Krettek & Price, 1978; Veening *et al.*, 1984; LeDoux, 1995; Petrovich & Swanson, 1997; Rosen *et al.*, 1998; Paré *et al.*, 2004; Fanselow & Poulos, 2005) (ver figura I7).

- Conexiones con la CPF: La CPF envía profusas proyecciones a la región basolateral de la amígdala (a los núcleos basal y lateral) mayormente desde la región prelímbica (McDonald, 1998; Groenewegen & Uylings, 2000; Pitkänen *et al.*, 2000; Quirk *et al.*, 2003; Vertes, 2004, 2006; Floresco & Tse, 2007). Estas proyecciones recíprocas son glutamatérgicas y sinapsan sobre interneuronas GABA, inhibiendo la actividad de la amígdala en respuesta a estrés y son esenciales para la regulación del procesamiento emocional (Rosenkranz & Grace, 2002; Quirk *et al.*, 2003; Likhtik *et al.*, 2005). La región medial de la amígdala recibe proyecciones de la CPF, mayoritariamente desde la corteza infralímbica. Estas proyecciones actúan inhibiendo la salida de información desde la amígdala (Vidal-Gonzalez *et al.*, 2006; Rozeske *et al.*, 2015) y son especialmente relevantes en los procesos de extinción de la memoria emocional, en donde un recuerdo antiguo es sustituido por uno nuevo más reciente (Rosenkranz *et al.*, 2003; Sotres-Bayon *et al.*, 2004; Quirk & Beer, 2006).
- Conexiones con el hipotálamo y tronco encefálico: Estas proyecciones son eferentes y parten desde la región medial dirigiéndose al hipotálamo, el NTS y a la sustancia gris periacueductal con la finalidad de coordinar la activación del eje HHA, el sistema nervioso autónomo y la respuesta motora, durante la respuesta a estrés (Veening *et al.*, 1984; Petrovich & Swanson, 1997).

- Conexiones con tálamo y corteza sensorial: El tálamo envía proyecciones a la región basolateral en donde la información llega a la amígdala sin un previo filtrado de control consciente (Turner & Herkenham, 1991; LeDoux, 1995). En este caso, la información principal consiste en estímulos que conducen a respuestas de miedo. Añadido a esto, la región BLA recibe proyecciones desde distintas regiones de la corteza sensorial, como son: visual, auditiva, somatosensorial (incluido el dolor), olfativa y del gusto (Phillips & LeDoux, 1992; Pitkänen *et al.*, 2000). A contrario de las proyecciones tálamo-amígdala, toda esta información que llega a la amígdala desde corteza es altamente detallada. La región central recibe proyecciones unidireccionales desde áreas viscerosensitivas como son áreas corticales relacionadas con el olfato, el gusto o el dolor (Phillips & LeDoux, 1992; Pitkänen *et al.*, 2000).
- Conexiones con el hipocampo y corteza entorrinal: La información sobre el contexto en el que está ocurriendo el estímulo emocional, lo aporta el hipocampo a través de proyecciones a la región basolateral de la amígdala (Pitkänen *et al.*, 2000; Maren & Quirk, 2004). Esto implica detalles sobre el ambiente y las distintas etapas en las que tiene lugar, asociado a la memoria episódica (similar a la episódica en animales) (Clayton & Williams, 2000; Roozendaal *et al.*, 2008; Yassa & Stark, 2011).
- Conexiones con locus coeruleus, prosencéfalo basal, ATV y raphe: Estas proyecciones parten mayoritariamente desde la región medial (núcleo central) y se dirigen a regiones circundantes del locus coeruleus, el prosencéfalo basal, el ATV y núcleo del raphe dorsal, desde donde parten las proyecciones noradrenérgicas (Aston-Jones, 2005), colinérgicas (Carlsen *et al.*, 1985; Zaborszky *et al.*, 1997; Vertes, 2004), dopaminérgicas (Carr & Sesack, 2000; Hasue & Shammah-Lagnado, 2002; Geisler *et al.*, 2007) y serotoninérgicas (Muller *et al.*, 2007) que llegan a la amígdala.
- Proyecciones de los núcleos intercalados: Los núcleos intercalados (mayormente conformados por interneuronas) reciben una robusta proyección glutamatérgica desde la región infralímbica de la CPF (Amir *et al.*, 2011) que cuando se activa, inhiben aquellas áreas sobre las que proyectan y que se localizan sobre el núcleo central medial de la amígdala (Ehrlich *et al.*, 2009) y en concreto sobre una región

discreta constituida por interneuronas. Esta doble inhibición permite la activación de otras áreas de este núcleo, facilitando así su función, que está relacionada con la expresión de miedo (Corcoran & Quirk, 2007; Ciochi *et al.*, 2010).

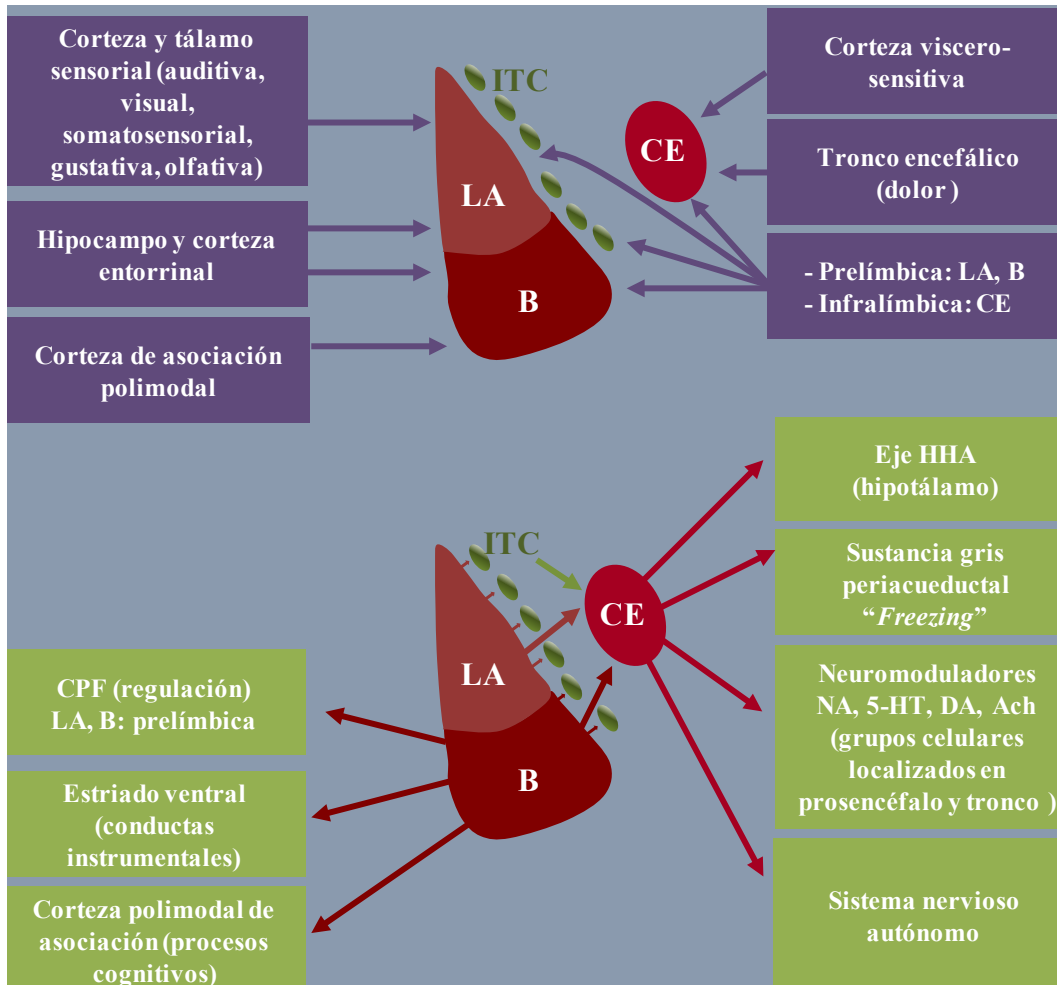


Figura I7. Representación esquemática de las proyecciones aferentes (Imagen superior) y eferentes (imagen inferior) del complejo de la amígdala. Núcleo lateral (LA), núcleo basal (B), núcleo central (CE) y núcleos intercalados (ITC). Abreviaturas: serotonina (5-HT); dopamina (DA); acetilcolina (Ach).

3.4 Neuroquímica de la amígdala

La amígdala es un área cerebral profusamente inervada. Esto hace que sean también múltiples los neurotransmisores que están presentes en ella y que modulan su actividad. Uno de los sistemas más estudiados es la noradrenalina, por su implicación en el procesamiento de la memoria emocional (Roosendaal & McGaugh, 2011). Para más información sobre noradrenalina y el resto de neurotransmisores se pueden consultar las siguientes referencias (Dahlström & Fuxe, 1964; Asan, 1998; Egorov *et al.*, 2006; Mascagni & McDonald, 2009; Atsak *et al.*, 2014).

3.4.1 Noradrenalina

La noradrenalina procede mayoritariamente del locus coeruleus (A6 y A4) (Fuxe *et al.*, 1970) que se encuentra en el tronco encefálico y que es el principal reservorio de somas neuronales noradrenérgicas en el cerebro de roedores, primates (Sadikot & Parent, 1990) así como en humanos (Roozendaal *et al.*, 2009a). Existen otras dos regiones minoritarias que contienen somas neuronales noradrenérgicas son: el sistema tegmental lateral (A5) y (A7) y el grupo dorsal medular (A2) (Fuxe *et al.*, 2007) (Figura I8)

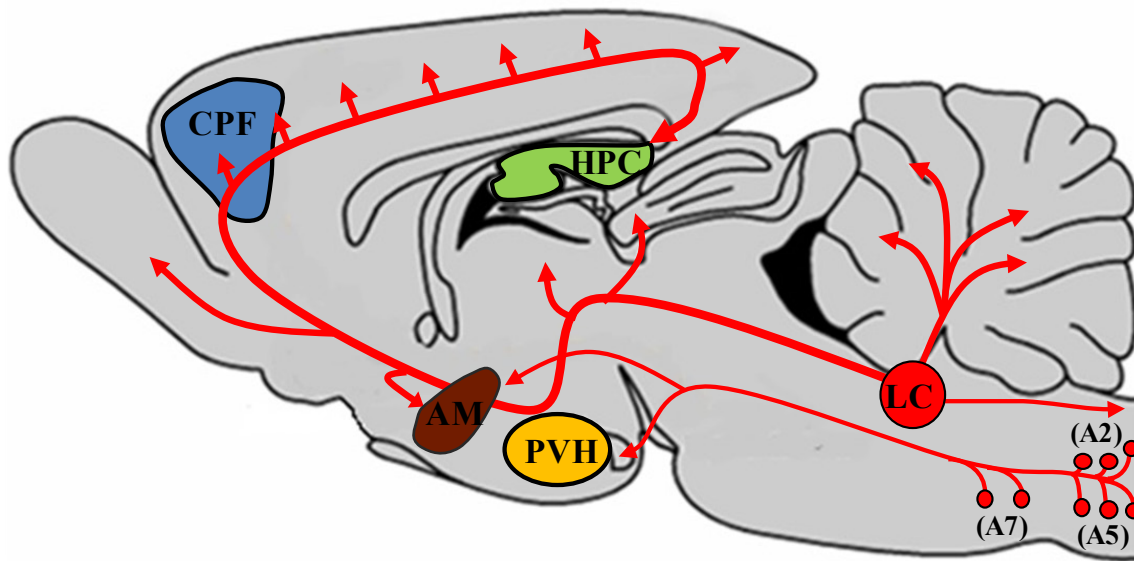


Figura I8. Esquema de un corte sagital del cerebro de rata que muestra las principales vías noradrenérgicas. El principal reservorio de somas de neuronas noradrenérgicas de proyección lo constituye el locus coeruleus (LC) e inerva a áreas corticales y límbicas como la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo (HC) y la amígdala (AM). Otras haz de fibras noradrenérgicas parten desde el área tegmental lateral (A7 y A5) y el grupo dorsal medular (A2) y llegan al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH) y a la amígdala.

La noradrenalina es un neurotransmisor clásico que pertenece a la familia de las catecolaminas y que se caracterizan químicamente por poseer un anillo de benceno, con dos grupos $-OH$ consecutivos y un grupo amina. A este mismo grupo pertenecen otros neurotransmisores como la dopamina y la adrenalina, que en la periferia se pueden actuar también como hormonas.

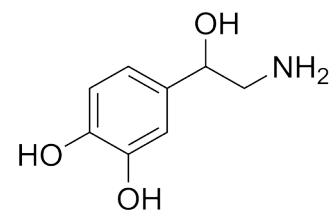


Figura I9. Estructura química de la noradrenalina.

La estructura de las sinapsis noradrenérgica, es en parte de tipo simétricas (clásicas, con una estructura definida) con contactos en espinas dendríticas y en menor medida, somas

y axones neuronales. Sin embargo, las más abundantes son las sinapsis de tipo asimétricas (sin una estructura de sinapsis bien definida) (Maley *et al.*, 1990; Farb *et al.*, 2010). Algunos autores han diferenciado por tanto entre una liberación tónica de noradrenalina (transmisión por volumen) y una acción fásica, que tendría lugar en la hendidura sináptica y que mediaría funciones diferentes de la transmisión por volumen (Aoki *et al.*, 1998; Fuxe *et al.*, 2007; Agnati *et al.*, 2010). En concreto, se han descrito diferencias regionales en la amígdala respecto al tipo de contacto entre terminales noradrenérgicos. En torno a un 30 % de las sinapsis son mediante contacto sináptico, de tipo simétrico (con neuronas glutamatérgicas) y no simétricas (con interneuronas GABA, siendo el restante sinapsis de tipo abiertas. También se ha mostrado la presencia de receptores de noradrenalina en astrocitos, lo que sugiere que podrían estar implicados en las funciones de la noradrenalina en la amígdala (Farb *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015) como se ha mostrado en regiones cerebrales que están estrechamente vinculadas con la amígdala como en el estriado (Martín *et al.*, 2015) (figura I10).

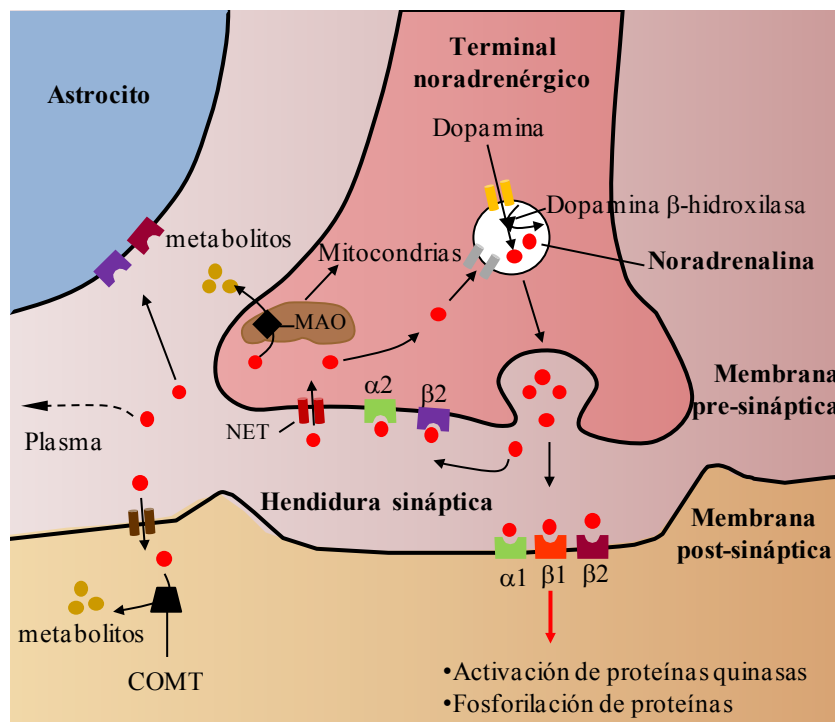


Figura I10. La síntesis y almacenamiento de la noradrenalina tiene lugar en el interior de las vesículas sinápticas, en donde se encuentra la enzima de síntesis del neurotransmisor. La liberación de noradrenalina a la hendidura sináptica tiene lugar tras un estímulo apropiado, actuando sobre receptores adrenérgicos localizados en la membrana pre y post-sináptica neuronal y sobre la membrana de astrocitos. Dos enzimas se encargan de la inactivación de la noradrenalina (y de las catecolaminas en general), la monoamino oxidada (MAO) y la catecol-O-metil-transferasa (COMT), localizadas en el espacio intra-mitocondrial y el espacio intracelular respectivamente, y junto con el transportador de membrana (NET) regulan la concentración y actividad de la noradrenalina en el espacio extracelular. Las moléculas de noradrenalina que no se recapturan difunden al plasma y son metabolizadas en el hígado.

3.4.2 Receptores adrenérgicos

La noradrenalina ejerce sus efectos a través de los receptores de noradrenalina que están ampliamente distribuidos por todo el sistema nervioso central (Rainbow *et al.*, 1984; McCune *et al.*, 1993; Nicholas *et al.*, 1993; Paschalis *et al.*, 2009). Estos receptores los han sido clasificado en tres familias $\alpha 1$, $\alpha 2$, y β ; y cada familia subdividida en tres subclases (Docherty, 1998; Civantos Calzada & Aleixandre de Artiñano, 2001). Aunque se ha descrito que los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se expresan de forma más abundante en el sistema nervioso central, la función de los β resulta crucial y también aunque en menor medida la de los α para el desarrollo de conductas motoras, la respuesta de vigilancia y la consolidación de la memoria (Ferry *et al.*, 1999; Przybylski *et al.*, 1999).

Todos los receptores de noradrenalina son metabotrópicos y presentan una estructura similar conformada por 7 regiones hidrofóbicas, una región C-terminal intracelular a través de la cual contacta con una proteína de unión a GTP y un extremo N-terminal (hidrofílico) y extracelular a través del cual tiene lugar el contacto con el neurotransmisor (Hieble *et al.*, 1995; Ruffolo *et al.*, 1995; Lefkowitz, 2004; Warne *et al.*, 2008). Los receptores $\alpha 1$ y β se expresan mayoritariamente en la membrana post-sináptica, mientras que los $\alpha 2$ aparecen en la membrana pre-sináptica, regulando la liberación sináptica de noradrenalina (Berridge & Waterhouse, 2003). Los receptores adrenérgicos post-sinápticos β ($\beta 1$ y $\beta 2$) se co-expresan en áreas como la CPF, el hipocampo, el hipotálamo y la amígdala (Abraham *et al.*, 2008), incrementando la transmisión sináptica a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa (ruta de activación de 2º mensajero). También los receptores $\alpha 1$ pueden tener un papel sinérgico, pero no directamente activando a la enzima, sino potenciando la respuesta de los receptores tipo β (Roosendaal *et al.*, 2002). Las funciones principales en las que han sido implicados estos receptores son en la respuesta a miedo y en la ansiedad (Aston-Jones *et al.*, 1999; Ledoux, 2003) y con especial relevancia en el aprendizaje y la memoria emocional (McGaugh *et al.*, 2002; Roosendaal *et al.*, 2002, Roosendaal *et al.*, 2006b).

3.5 Funciones de la amígdala

El patrón de conexiones de la amígdala determina las funciones en las que esta área cerebral participa. Los experimentos clásicos de lesiones en esta área mostraron

alteraciones graves de la conducta relacionada con el miedo, la ingesta o el sexo (Klüver & Bucy, 1937). Estudios posteriores de mediados de los años 50 por Weiskrantz revelaron que estas alteraciones conductuales eran fruto de cambios en el procesamiento emocional en la región de la amígdala. Otras funciones en las que ha sido implicada esta área cerebral son procesamiento de recompensas (Baxter & Murray, 2002) y la diferenciación de estímulos aversivos, reforzando la conducta, de lo que se describe su implicación en diferentes aspectos del aprendizaje y la motivación. También se ha descrito su papel como coordinador de la respuesta a estrés (LeDoux, 2007). Sin embargo, uno de los papeles más estudiados de la amígdala es en relación con el procesamiento de la memoria asociada a estímulos emocionales o memoria emocional y en particular, con estímulos aversivos (LeDoux, 2000; Roozendaal *et al.*, 2009a).

3.5.1 Memoria emocional

La memoria emocional se define habitualmente como la memoria asociada a estímulos con una carga emocional, bien sean de naturaleza positiva como recompensas o aversiva como un estímulo estresante, aunque la presencia en el mismo tiempo de ambos tipos de estímulos, generan en la amígdala una respuesta sesgada hacia el estímulo negativo (Livneh & Paz, 2012). La memoria aversiva ha sido reconocida por diversos autores como un mecanismo adaptativo que almacena información relevante para la supervivencia ya que va a influir sobre futuras respuestas ante estímulos estresantes similares (LeDoux, 2000; McGaugh, 2000; Joëls *et al.*, 2011; Schwabe *et al.*, 2012).

La amígdala es un componente importante del sistema implicado en la adquisición, almacenamiento y posterior expresión de la memoria aversiva (LeDoux 2000). Gran número de trabajos han relacionado a la noradrenalina liberada en amígdala durante estrés, y los glucocorticoides con el correcto procesamiento de la memoria aversiva en roedores (Quirarte *et al.*, 1997; Roozendaal *et al.*, 2002 Roozendaal *et al.*, 2009b) y en humanos (Van Marle *et al.*, 2013) Sin embargo, la consolidación de la memoria emocional tiene lugar a través de proyecciones que parten desde la amígdala a otras áreas cerebrales como el hipocampo y la CPF (LeDoux, 2007). La memoria emocional se ha estudiado en animales de experimentación a través de diferentes test de conducta como por ejemplo el test de evitación pasiva, utilizado en la presente Tesis Doctoral

El test de evitación pasiva se ha empleado previamente para evaluar los efectos del estrés sobre la memoria emocional (Izquierdo & Netto, 1985; Wilensky *et al.*, 2000; McGaugh *et al.*, 2002). El estado de alerta producido por la naturaleza aversiva de un shock eléctrico, conlleva el desarrollo de conductas adaptativas, dirigidas a la evitación del contexto en donde recibieron el shock eléctrico (Roosendaal & McGaugh, 2011). En esta prueba, se evalúa el tiempo que tardan los animales en entrar al espacio en donde recibieron el estímulo aversivo (latencia, ver en materiales y métodos) (Gold, 1986; Atucha & Roosendaal, 2015). En este contexto, estudios de microdiálisis han mostrado que la liberación de noradrenalina en amígdala y el grado de alerta durante el shock modula la memoria evaluada a través de este test (Galvez *et al.* 1996). Además el incremento en la liberación de noradrenalina es dependiente de la intensidad del shock (Quirarte *et al.* 1998). Añadido a ello, un estudio ha mostrado que la latencia de entrada 24 horas tras recibir el shock correlaciona positivamente con la mayor cantidad de noradrenalina liberada durante el shock en el test de evitación pasiva (McIntyre *et al.* 2003).

3.6 Amígdala y trastorno de estrés postraumático

Estudios clínicos y en modelos animales de TEPT han investigado las alteraciones en regiones cerebrales y los circuitos implicados en esta patología. En concreto, la amígdala ha recibido una especial atención por su papel en la detección de estímulos aversivos y en la regulación en la respuesta a estrés y por ser un componente fundamental en el circuito que media los efectos de la vigilancia/atención sobre la memoria emocional (Pitman *et al.*, 2012; McGaugh & Roosendaal, 2002; Roosendaal *et al.*, 2000). Mediante técnicas de imagen se ha mostrado un incremento en la actividad de la amígdala en pacientes de TEPT durante la exposición de estímulos asociados al contexto traumático (Protopopescu *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005) y a estímulos neutros o no asociados al contexto del trauma (Shin *et al.*, 2006) (medidos como incremento de flujo sanguíneo y del consumo de oxígeno) que se correlacionan con los síntomas de TEPT y su severidad (Shin *et al.*, 2004). También se ha descrito una hipoactividad de la CPF medial ventral en pacientes de TEPT (Shin *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2011). Los estudios de meta-análisis son importantes en este contexto, ya que han encontrado una correlación en la alteración funcional de estas dos áreas cerebrales en dichos estos pacientes, lo cual sugiere la existencia de una alteración en dichos circuitos que regulan

aspectos emocionales (Rauch *et al.*, 2006; Etkin & Wager, 2007; Hayes *et al.*, 2012), entre las que se incluyen alteraciones en otras áreas cerebrales como el hipocampo (para ver más detalles Liberzon & Sripada, 2008; Pitman *et al.*, 2012). Un estudio reciente en un modelo animal de exposición a estrés traumático ha mostrado alteraciones funcionales en las estas áreas cerebrales similares a las descritas en pacientes de TEPT (Liang *et al.*, 2014).

3.6.1 Hipótesis noradrenérgica de la hipervigilancia asociada al TEPT

La noradrenalina ha adquirido una atención especial dada sus funciones en la amígdala incrementado la memoria emocional y su participación en la regulación de los estados de alerta y vigilancia. Por este motivo, se ha sugerido que una hiperactividad noradrenérgica podría estar implicado en el desarrollo y/o mantenimiento de alguno de las alteraciones conductuales descritas en esta patología como la ansiedad generalizada y la hipervigilancia (Pitman *et al.*, 2012). Esta hipótesis se basa en evidencias procedentes de estudios clínicos y en animales de experimentación en los que se ha mostrado una reducción de estos síntomas tras la administración sistémica de fármacos dirigidos a reducir la transmisión noradrenérgica (Raskind *et al.*, 2003; Vaiva *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2011; Hoge *et al.*, 2012). Por el contrario, la activación farmacológica mediante agonistas de receptores adrenérgicos, precipita o empeora los síntomas de hipervigilancia en dichos pacientes (Southwick *et al.*, 1993, 1997). Sin embargo, estos estudios se basan en la administración sistémica de bloqueantes de la transmisión noradrenérgica, lo cual impide relacionar directamente a la amígdala con las alteraciones conductuales descritas. En este sentido, la alteración en la actividad de neuronas de proyección del locus coeruleus durante estrés en animales de experimentación expuestos previamente constituye una evidencia de la alteración a largo plazo de la transmisión noradrenérgica en el sistema nervioso central (George *et al.*, 2013). De hecho, se ha sugerido que los niveles de noradrenalina en respuesta a estrés podrían estar mediando efectos opuestos en la actividad de la amígdala y la corteza prefrontal (Arnsten, 1998, 2000), lo cual coincide con las alteraciones en la funcionalidad de estas áreas en pacientes de TEPT expuestos a estímulos asociados al trauma y que implicarían la hipofunción de la CPF acompañando a la hiperactividad de la amígdala (Pitman *et al.*, 2012). En consonancia con estos hallazgos, se ha observado la reducción en la actividad de la amígdala y el aumento en la actividad de la CPF

ventromedial en aquellos pacientes que responden a la terapia psicológica (Felmingham *et al.*, 2007). Sin embargo, no está claro y origen y relación entre estas alteraciones funcionales, en relación con el desarrollo de TEPT. Estudios en veteranos con lesiones cerebrales en estas regiones mencionadas mostraron que si bien la integridad de la amígdala parece esencial para el posterior desarrollo de esta patología, la lesión de la CPF no tenía ningún efecto (Koenigs *et al.*, 2008) y por tanto se sugirió que la alteración funcional de esta área podría ser consecuencia de la hiperactividad de la amígdala (Koenigs & Grafman, 2009).

***PLANTEAMIENTO
Y OBJETIVOS***

La respuesta a estrés consiste en la activación de un conjunto de procesos neurofisiológicos con la finalidad de restaurar la homeostasis y desarrollar conductas adaptativas en respuesta a un estímulo estresante real o potencial (De Kloet *et al.*, 1999; McEwen, 2000; Kim & Diamond, 2002). Diferentes estudios en humanos y animales de experimentación han mostrado que la interacción funcional entre la CPF y la amígdala juega un papel clave en la regulación de la respuesta a estrés (Roosendaal *et al.*, 2009a; Ulrich-Lai & Herman, 2009; Barsegyan *et al.*, 2010). De hecho, la alteración tanto en la función de cada una de estas áreas cerebrales, como de su interacción, se ha implicado en respuestas mal-adaptativas a estrés y en el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia o el trastorno de estrés post-traumático (TEPT) (Meyer-Lindenberg, 2010; Pitman *et al.*, 2012; Likhtik & Paz, 2015).

La activación del eje HHA, que conlleva cambios en las concentraciones plasmáticas de corticosterona (cortisol en humanos); y además la liberación de catecolaminas en áreas límbicas del cerebro, son dos de los procesos más estudiados para valorar la adaptación de los individuos ante diferentes estímulos estresantes (Inglis & Moghaddam, 1999; Galvez *et al.*, 1996; Del Arco & Mora, 2001; Sullivan & Gratton, 2002; McEwen, 2008; Garrido *et al.*, 2013). El procesamiento de la información emocional a largo plazo, es otro de los mecanismos que contribuyen a la capacidad de los individuos para adaptarse a situaciones de estrés (Roosendaal *et al.*, 2009b; Likhtik & Paz, 2015). Estudios de lesiones y farmacológicos han mostrado que la CPF modula la activación del eje HHA en condiciones basales y durante estrés (Diorio *et al.*, 1993; Radley *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2012b) y la formación de memorias relacionadas con estímulos aversivos (Roosendaal *et al.*, 2009b). Es más, tanto la transmisión noradrenérgica en la amígdala como los cambios en la concentración de corticosterona en esta misma área del cerebro, son fundamentales en la adquisición y consolidación de la memoria emocional (Roosendaal *et al.*, 2006a, Roosendaal *et al.*, 2006b). Sin embargo, y a pesar de su importancia en la regulación de la respuesta a estrés, aún no se conoce bien el papel específico de la CPF y la amígdala en la regulación del eje HHA y en el procesamiento emocional, y en qué medida la alteración de estas áreas facilita respuestas mal-adaptativas a estrés.

La presente Tesis Doctoral consta de tres bloques experimentales en los que se investigan diferentes aspectos relacionados con el papel de la CPF y la amígdala en la

respuesta a estrés tanto en condiciones fisiológicas (evaluando los efectos de un estrés moderado) como patológicas (evaluando los efectos de un estrés traumático). La siguiente figura P1 resume los aspectos más relevantes objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

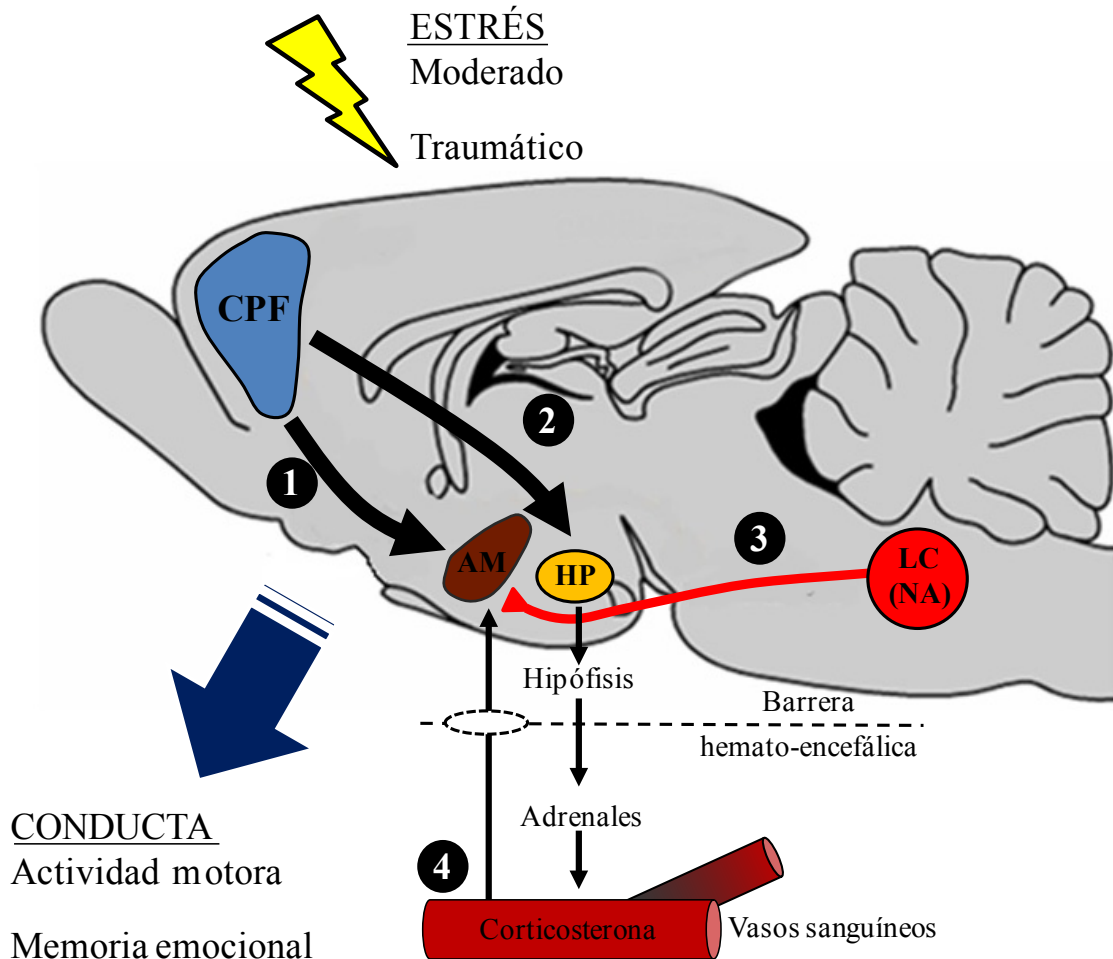


Figura P1. Esquema de las principales vías implicadas en la respuesta a estrés y que se estudian en los tres bloques experimentales de la presente Tesis Doctoral. La corteza prefrontal (CPF) regula la respuesta a estrés a través de su interacción funcional con la amígdala (1) y el hipotálamo (2). Además, durante estrés agudo moderado aumentan las concentraciones de noradrenalina (NA) en la amígdala (AM), a través de proyecciones desde el locus coeruleus (LC) (3), y de corticosterona circulante en el plasma sanguíneo (4). A su vez, la respuesta a estrés también implica adaptaciones conductuales como consecuencia de cambios en el aprendizaje y la memoria. Los cambios en la actividad de la CPF medial modulan las concentraciones de corticosterona en respuesta a estrés agudo (**Bloque experimental I**) y la memoria emocional dependiente de amígdala (**Bloques I y II**). Por otro lado, el estrés agudo intenso (traumático) produce alteraciones a largo plazo en la transmisión noradrenérgica en la amígdala que conlleva alteraciones conductuales motoras como la inmovilidad en respuesta a novedad, empleado como índice de hipervigilancia (**Bloque experimental III**).

Bloque experimental I. Actividad de la corteza infralímbica y modulación de la respuesta a estrés: estudio del eje HHA y la memoria aversiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.

La CPF regula la activación del eje HHA y en consecuencia los niveles plasmáticos de corticosterona en respuesta a estrés (Diorio *et al.*, 1993; Roozendaal *et al.*, 2009a). Estudios previos en roedores han sugerido que la región dorsal (corteza prelímbica) y la región ventral (corteza infralímbica) de la CPF medial ejercen un papel antagónico sobre la regulación del eje HHA. En concreto, se ha propuesto que la corteza prelímbica inhibe la actividad del eje y los aumentos de corticosterona en respuesta a estrés mientras que la corteza infralímbica estimula su activación en respuesta a dicho estrés (Ulrich-Lai & Herman, 2009). De la misma manera, también se ha sugerido que ambas regiones de la CPF medial tienen un papel opuesto en la formación de memoria emocional (Quirk & Mueller, 2008). Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han diferenciado estrictamente entre estas dos regiones cerebrales (Sullivan & Gratton 1999; Radley *et al.*, 2009;) o se han limitado a estudiar el papel de la corteza prelímbica (Weinberg *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2012b). Por tanto, a pesar de que la corteza infralímbica juega un papel fundamental en la adaptación conductual a estrés (McKlveen *et al.*, 2015), aún no se conoce con certeza el mecanismo regulador que ejerce esta región cortical sobre el eje HHA y sobre la memoria emocional.

El bloque experimental I estudia el efecto de la estimulación e inhibición de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y sobre la formación de memoria aversiva. Para ello, se realizaron inyecciones locales de picrotoxina y muscimol, agonista y antagonista, respectivamente, de los receptores GABA_A. Además, en este bloque se estudia si el mantenimiento de los animales en enriquecimiento ambiental (EA) modifica la función de la corteza infralímbica. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el EA reduce los efectos del estrés y modifica la actividad de la CPF (Segovia *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2013). Los objetivos concretos del este bloque experimental son:

- 1.1. Análisis de la actividad motora espontánea en un campo abierto y de la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.

- 1.2. Estudio del efecto de la inhibición de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.
- 1.3. Estudio del efecto de la estimulación de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.
- 1.4. Análisis de la expresión de ARNm del gen de activación celular c-fos y del receptor GABA_A en la corteza infralímbica en animales control y mantenidos en EA.

Bloque experimental II. Disfunción de la CPF medial y modulación de la respuesta a estrés: efecto del bloqueo de receptores NMDA en la CPF sobre la liberación de noradrenalina y corticosterona en amígdala y sobre la memoria aversiva.

Estudios clínicos en pacientes diagnosticados de esquizofrenia e individuos con alto de riesgo de padecer esta enfermedad han mostrado una respuesta exacerbada al estrés (Soliman *et al.*, 2008; van Winkel *et al.*, 2008; Brunelin *et al.*, 2010; Mizrahi *et al.*, 2012; DeVylder *et al.*, 2013;). Esta alteración de la respuesta a estrés ha sido descrita como una potenciación en la liberación de neurotransmisores (por ejemplo una mayor activación catecolaminérgica en áreas límbicas) durante estrés (Soliman *et al.*, 2008). También se han descrito alteraciones en la función de la amígdala en paciente expuestos a estímulos aversivos (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2002; Fusar-Poli *et al.*, 2011). En este sentido, estudios en roedores han mostrado que la liberación de noradrenalina en amígdala (Galvez *et al.*, 1996; McIntyre *et al.*, 2002) actúa de forma sinérgica con la corticosterona para facilitar la adquisición y consolidación de la memoria aversiva (Roosendaal *et al.*, 2006a; Joëls *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2013). Dado el papel regulador de la CPF en la respuesta a estrés, se ha sugerido que la alteración en la función de esta área cerebral podría ser responsable de la respuesta anómala a estrés (Moghaddam, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Amat *et al.*, 2005; Ulrcih-Lai & Herman 2009; Van Os *et al.*, 2010; Fusar-Poli *et al.*, 2011) y el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Javitt & Zukin, 1991; Jentsch & Roth, 1999; Lahti *et al.*, 2001; Belforte *et al.*, 2010).

El bloque experimental II estudia si la alteración en la función de la CPF modifica la liberación de noradrenalina y las concentraciones de corticosterona en la amígdala en

respuesta a estrés y además de la formación de memoria aversiva. Para ello, se realizan inyecciones locales del antagonista NMDA CPP en la CPF. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la inyección de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA en la región prelímbica de la CPF producen alteraciones neuroquímicas y conductuales que sirven de modelo experimental para investigar la esquizofrenia (Del Arco *et al.*, 2008, 2011). Los objetivos concretos del este bloque experimental son:

- 2.1. Estudio del efecto de la inyección del antagonista de NMDA CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la actividad motora espontánea.
- 2.2. Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala.
- 2.3. Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de corticosterona en la amígdala.
- 2.4. Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.

Bloque experimental III. Cambios a largo plazo en la actividad de la amígdala en respuesta a un estrés traumático: estudio del efecto del IFS sobre la actividad motora espontánea y la transmisión noradrenérgica en la amígdala.

La exposición a un estrés traumático puede producir alteraciones neurofisiológicas a largo plazo que afectan a la capacidad de los individuos para adaptarse al medio cambiante en el que viven (Pitman *et al.*, 2012; Likhtik & Paz, 2015). Estudios clínicos han mostrado alteraciones funcionales en la amígdala en pacientes diagnosticados de TEPT (Hayes *et al.*, 2012) que a su vez se han relacionado con las alteraciones conductuales en estos pacientes (Elzinga & Bremner, 2002; Etkin & Wager, 2007; Milad *et al.*, 2006). Aunque no se conoce con detalle el sustrato neurobiológico que subyace a esta patología, estos estudios sugieren que una hiperactividad del sistema noradrenérgico podría estar implicada en el desarrollo y mantenimiento de alguno de sus síntomas como la hipervigilancia (Pitman *et al.*, 2012). En línea con esta posibilidad se ha mostrado una reducción de estos síntomas con la administración sistémica de

fármacos dirigidos a reducir la transmisión noradrenérgica.(Raskind *et al.*, 2003; Vaiva *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2011; Hoge *et al.*, 2012) Añadido a ello, también se ha mostrado un incremento en la actividad del locus coeruleus en respuesta a estrés en animales previamente expuestos a un estrés traumático (George *et al.*, 2013) Sin embargo, a pesar de las evidencias que implican a la noradrenalina en esta patología, no existen estudios que investiguen el papel de este neurotransmisor en los cambios conductuales a largo plazo descritos en los modelos animales de TEPT. Este conocimiento es fundamental en aras a obtener nuevas herramientas terapéuticas, farmacológicas u otras, para tratar este síndrome psiquiátrico.

El bloque experimental III estudia si la exposición de los animales a un estrés traumático, shock eléctrico ineludible (IFS), produce cambios a largo plazo en la actividad noradrenérgica en la amígdala. También se estudia si los cambios en la transmisión noradrenérgica en la amígdala están relacionados con la hipervigilancia, evaluada mediante la actividad motora en respuesta a novedad. Añadido a ello, y dado el efecto del EA atenuando los efectos del estrés, en este bloque experimental se evalúa si el mantenimiento de los animales en EA atenúa las alteraciones conductuales producidas por la exposición de los animales a un estrés traumático. Los objetivos concretos de este bloque experimental son:

- 3.1. Análisis de la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.
- 3.2. Análisis de la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala en animales control y expuestos a IFS.
- 3.3. Estudio del efecto de la inyección del antagonista β -adrenérgico propranolol en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.
- 3.4. Estudio del efecto de la inyección del agonista β -adrenérgico clenbuterol y de noradrenalina en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control.
- 3.5. Estudio de la expresión de ARNm de receptores en la amígdala, la CPF y el hipocampo de animales control y expuestos a IFS.
- 3.6. Estudio del efecto del EA sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Los animales empleados en este trabajo de investigación fueron ratas Wistar macho adultas (Harlan, Holanda). Todos los animales se mantuvieron a una temperatura de 23 ± 2 °C y en ciclo invertido de 12 horas luz/oscuridad (luces encendidas a las 20:00).

En la presente tesis doctoral se emplearon dos tipos de condiciones de mantenimiento de los animales. Los animales mantenidos en condiciones estándar ó control fueron mantenidos por parejas en jaulas de plexiglás (55x35x20 cm). Los animales agrupados por parejas lo fueron en función del peso, tratando de evitar situaciones de dominancia excesiva (puesto que el peso puede ser un marcador del grado de dominancia Sines & Eagleton, 1961). La segunda condición experimental de mantenimiento de los animales fue la de enriquecimiento ambiental. En esta condición los animales se introdujeron en jaulas de grandes dimensiones (120x100x60 cm) de metacrilato. Las jaulas contaban con ruedas para la realización de ejercicio físico voluntario y una rejilla elevada; además se introdujeron una variedad de objetos de diversos materiales, colores y tacto (pelotas, tacos de madera, bloques de construcción de plástico, cilindros y cajas de cartón) que se renovaban 2 veces por semana. Además contaban con tuberías de PVC cuya disposición también se modificaba cada 2 semanas (Figura M1). El acceso a la comida y agua era *ad libitum* para ambas condiciones de mantenimiento.

Los experimentos se realizaron entre las 14:00 y las 19:00 para evitar el efecto de liberación máxima de corticosterona y otras hormonas, que se inicia aproximadamente 2 horas antes del cambio de ciclo de luz de los animales y comienza a descender a las 4 horas tras el despertar (Bouchez *et al.*, 2012);



Figura M1. Fotografías tomadas bajo luz roja de una jaula de EA empleada en el presente trabajo de investigación.

exceptuando los de microdiálisis ya que por razones técnicas de duración de experimento las muestras comenzaban a recogerse 12:00. Todos los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio siguieron las regulaciones españolas para la protección de animales de laboratorio (RD1201/2005; RD53/2013) y los protocolos de estrés llevados a cabo bajo la aprobación de un comité de experimentación animal.

2. Protocolos de estrés.

2.1 Estrés moderado

- **Restricción del movimiento**: La restricción del movimiento de los animales se realiza por medio de un trapo con el que se envuelve al animal a modo de cilindro y con tiras de Velcro® colocadas a las distancia seleccionada, se impide el movimiento del animal. El periodo de duración de este estrés varía en función del protocolo experimental empleado.
- **Restricción del movimiento y pinza en la cola**: Una variación del anterior protocolo implica la colocación de una pinza de plástico en la base de la cola de los animales. Estas pinzas están forradas con algodón para evitar daños o presión excesiva en la cola de los animales. Este protocolo emplea la restricción del movimiento y añade la colocación de la pinza durante los 5 minutos iniciales y finales del periodo de estrés.
- **Shock eléctrico**: Los animales reciben un shock eléctrico en las patas y la cola en un aparato de evitación pasiva (ver en apartado 9). Los animales reciben un shock eléctrico entre 0,3 y 0,6 mA de 2 segundos de duración.

2.2 Estrés traumático

- **Shock eléctrico ineludible (IFS)**: Para desarrollar este modelo, se ha empleado el aparato de evitación pasiva. Cada animal recibe una sesión de 10 shocks de 0.86 mA y 6 segundos de duración en un periodo de 10 minutos. En el caso de los animales control, los animales permanecen en el compartimento oscuro sin recibir

shock alguno. Antes de realizar ningún procedimiento, todos los animales son habituados al experimentador al menos 3 veces.

3. Construcción de implantes y cánulas de microdiálisis

3.1 Construcción de implantes

Los experimentos de microdiálisis y microinyecciones se llevaron a cabo mediante un sistema bilateral de cánulas guía que se implanta en la región cerebral objeto del estudio de la rata, y que se confeccionan en nuestro laboratorio (Segovia *et al.*, 1997). Este sistema, permite una mejor recuperación de los animales tras la cirugía (en comparación con la implantación crónica de la cánula de microdiálisis), de este modo, los niveles de estrés se minimizan y ayuda a la expresión de patrones normales de conducta de los animales operados durante la microdiálisis (de Groote & Linthorst, 2007). Los sistemas de cánulas implantados constan de los siguientes elementos:

3.1.1 Implantes de Microdiálisis

- Dos piezas acoplables macho-hembra de metacrilato y nailon, respectivamente, fabricadas en el taller de apoyo técnico a la investigación de la Facultad de ciencias Físicas de la UCM (Red de Centros de apoyo a la investigación CAI de la UCM)
- Dos cánulas de acero inoxidable (cánulas guía) de 902 μm (20 ga) de diámetro externo y 660 μm de diámetro interno, y cuya longitud varía en función del área de cerebro que se pretende estudiar, en el caso de este trabajo de investigación es la amígdala y son de 10mm de longitud.
- Dos fiadores de acero inoxidable de 24 ga de diámetro y 10 mm de longitud.
- La pieza de metacrilato presenta dos orificios laterales que encajan perfectamente con los que tiene la pieza de nailon, y que permiten la inserción de un tornillo que asegura la inmovilización de la cánula de microdiálisis durante el experimento.

Para la construcción de los implantes, las cánulas guía se insertan en la base de la pieza de nailon que posee dos orificios que se separan dependiendo del área de cerebro elegida, en la amígdala la separación es de 10 mm. Tras insertarse, las cánulas guía se fijan con una capa de pegamento (SuperGlue®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España).

Tras comprobar que la posición de las cánulas es la correcta y están debidamente alineadas, se emplea una resina epoxi para que la unión se vuelva más resistente (Araldit®, Ceys S.A., España). Los fiadores, de 24 ga de diámetro y de 10 mm de longitud se preparan con un extremo estriado para facilitar su colocación, manteniendo libre de residuos el interior de las cánulas guía y extracción antes de la realización del experimento de microdiálisis para poder insertar la cánula. Una segunda pieza de metacrilato, con la misma forma que la pieza usada durante el experimento, pero hueca y sin agujeros, se utiliza como tapa, para evitar la pérdida de los fiadores.

3.1.2 Implantes de Microinyecciones

Los implantes de microinyecciones para la realización simultánea de microdiálisis (Bloque experimental II) se construyen de la misma manera que los implantes para microdiálisis con la modificación de utilizar 4 cánulas guías, dos para las microinyecciones en un área cerebral (corteza prelímbica) y dos para la microdiálisis en otra área (amígdala). Para realizar microinyecciones en la corteza infralímbica (Bloque experimental I) se emplearon unos implantes comerciales (PlasticOne, Roanoke VA, Estados Unidos) cuyas cánulas guía de 23 ga y 10 mm de longitud estaban separadas entre sí por 4 mm (ver bloque experimental I en la sección de resultados). Otro conjunto de cánulas guía de acero inoxidable de 28 ga de diámetro y 15 mm de longitud (sin implante de plástico) fue usado en los experimentos de microinyecciones en la amígdala (Bloque experimental III).

3.2 Cánulas de microdiálisis

Las cánulas de microdiálisis fueron diseñadas y construidas en nuestro laboratorio, y son de diseño concéntrico (Segovia *et al.*, 1997). Los materiales necesarios para su construcción son los siguientes:

- capilar de sílica de 144 μm de diámetro externo y 75 μm de diámetro interno, y una longitud aproximada de 55 mm.
- cánula de acero inoxidable de 640 μm (23 ga) de diámetro externo, 340 μm de diámetro interno y 10 mm de longitud.

- cánula de acero inoxidable de 460 μ m (26 ga) de diámetro externo, 254 μ m de diámetro interno y 45 mm de longitud.
- cánula de acero inoxidable de 910 μ m (20 ga) de diámetro externo, 600 μ m de diámetro interno y 5 mm de longitud.
- extremo final de una punta de pipeta amarilla.
- membrana de diálisis de cuprofano (Hospal, España) de 200 μ m de diámetro, 10mm de longitud y un tamaño de exclusión molecular de 5000 Da.

Los pasos para construir las cánulas de microdiálisis son los siguientes (Figura M2) A) se introduce la sílica a través de la cánula de 23 ga y se fija mediante pegamento (SuperGlue3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España) de modo que la sílica sobresalga 1mm por uno de los extremos de la cánula. B) se acoda la cánula de 26 ga con un ángulo de unos 40° a una distancia aproximada de 10 mm de uno de los extremos, y se realiza un orificio a la altura del codo con ayuda de la lima y una aguja. C) se introduce el extremo de mayor longitud de la sílica por el orificio practicado en el codo, sin que la cánula de 23 ga llegue a contactar con la de 26 ga. Se tapona el orificio mediante pegamento (SuperGlue3 gel®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España). D) se corta un pequeño fragmento de la punta de pipeta, formando una ranura. Se introduce la punta de pipeta por el extremo inferior de la cánula de 23 ga y se hace coincidir el extremo acodado de la cánula de 26 ga en la ranura practicada en la punta. Se rellena totalmente la punta de pipeta con pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España). E) se coloca la cánula de 20 ga sobre el extremo sobresaliente de la cánula de 26 ga, sin que llegue al extremo y se fija con pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España). F) bajo la lupa, se corta el extremo de la sílica de manera que sobresalga 2.5mm desde el extremo de la cánula de 26 ga. Se introduce la membrana por fuera de la sílica y por dentro de la cánula de 26 ga dejando que sobresalga 2.5 mm a partir del extremo de la sílica. G) se fija la membrana a la cánula de 26ga mediante pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España) y se sella el extremo mediante un tapón de 0,5 mm de pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España). H) se ajusta la longitud de la cánula (20-20,5 cm de longitud en el caso de la amígdala) mediante la inserción de un polietileno de 20 ga, cortado a la longitud requerida, por debajo de la punta de pipeta.

Para realizar la inserción de la cánula de microdiálisis en el tejido cerebral el día del experimento se introduce el extremo de ésta a través de uno de los orificios de la pieza macho (correspondiente a aquel hemisferio en el que se vaya a realizar el experimento) procurando que la membrana de microdiálisis quede protegida dentro de la pieza (Figura M3A); a continuación se acopla la pieza de metacrilato con la de nylon y se hace descender la cánula de microdiálisis hasta la profundidad adecuada. Finalmente se fija la cánula mediante un tornillo lateral tipo *Allen* (Figura M3B).

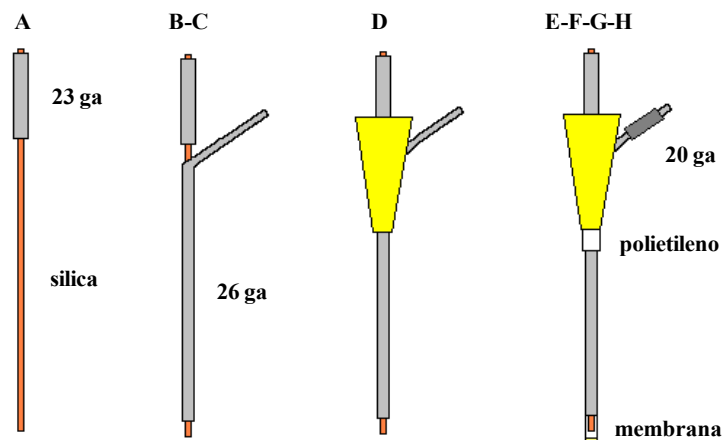


Figura M2. Secuencia de pasos para la construcción de las cánulas de microdiálisis. Modificado de (de Blas, 2011)

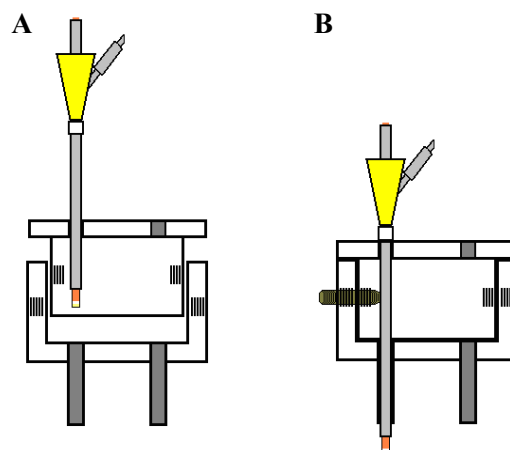


Figura M3. Inserción de la cánula de microdiálisis (A) y fijación al implante mediante un tornillo (B). Modificado de (de Blas, 2011)

4. Cirugía estereotáxica

La colocación quirúrgica de los implantes en las coordenadas apropiadas se realizó mediante un aparato estereotáxico (Kopf instruments, California, Estados Unidos). El anestésico empleado es Equithesin, inyectado intraperitonealmente una dosis de 2,5 mg/kg. El Equithesin se preparó en nuestro laboratorio: en primer lugar se disolvieron 21,25 g de hidrato de coral (Sigma, España) en 49,4 ml de etanol absoluto (Scharlau, España) a continuación y de manera secuencial se añadieron a esta disolución 4,86 g de pentobarbital sódico (Sigma, España) previamente disueltos en 21 ml de agua ultrapura (Mili-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania), 198 ml de 1/2-propilenglicol (Panreac Química S.A.U, España) y 10.63g de sulfato magnésico (Merck, Alemania) disuelto en 50 ml de agua ultrapura. Finalmente se enrasó hasta 500 ml con agua ultrapura; conservando la solución a temperatura ambiente en un recipiente opaco y cerrado.

Tras inducir anestesia profunda (perdida de reflejo plantar y corneal) se rasuró la zona de la cirugía con una maquinilla eléctrica para cortar el pelo (Andis Company, Estados Unidos) y se colocó al animal en el aparato estereotáxico (David Kopf Instruments 900, Estados Unidos) previamente higienizado con etanol 70 %, fijando el maxilar de animal superior a 3,3 mm por debajo de la línea interaural. Tanto el material quirúrgico (previamente autoclavado) como el implante se mantuvieron en una solución antiséptica de cloruro de benzalconio (Armil 1:1000, S.I.F.S.A., España), y antes de su uso, se dejó secar para que no queden restos durante la cirugía. Antes de proceder con la cirugía, el animal recibió una dosis subcutánea en la zona de la cirugía (0.2 ml) de un anestésico local compuesto por lidocaína (20 mg/kg) y adrenalina 2 % (AstraZeneca, Holanda) y una dosis intra-muscular (4 mg/kg) de carprofen (Pzizer, Nueva York, Estados Unidos) un analgésico no esteroideo, y se limpió la zona de cirugía con Betadine® (Medapharma SAU, Francia) aplicado mediante una torunda de algodón. Mediante un bisturí (Aesculap® BB515, Braum, Alemania) se realizó una incisión longitudinal en la piel del cráneo dejando al descubierto la calota del animal. Se abre el campo mediante pinzas hemostáticas modelo Diffenbach® (AgnTho's Ab, Suecia) y tras controlar las posibles hemorragias causadas por el corte con papel hemostático Espongostán Film® (Ferrosan, Dinamarca) se localiza el punto bregma (punto de unión entre las suturas interparietal y fontoparietal), que se utiliza como referencia para calcular las

coordenadas estereotáxicas antero-posterior y lateral según un atlas estereotáxico del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 1998). La coordenada de profundidad, se calcula tomando como referencia la distancia de contacto con la calota, bajo la que se encuentra el área cerebral de interés. A partir de bregma, las coordenadas para la colocación de los implantes, se recogen en la siguiente tabla:

Tabla M1. Resumen de coordenadas estereotáxicas antero-posterior y lateral empleadas para la colocación de implantes respecto a la localización de Bregma, y además la coordenada de profundidad a la que se hace descender la cánula guía.

		Antero-Posterior	Lateral	Profundidad
CPF	Prelímbica	+3,2 mm	± 0,8 mm	- 2,5 mm
	Infralímbica	+ 2,5 mm	± 0,7 mm	- 3,5 mm
Amígdala	Microdiálisis	- 3,1 mm	± 5,0 mm	- 5,5 mm
	Microinyección	-3,1 mm	± 5,0 mm	-6,5 mm

Una vez situado el implante en las coordenadas cada caso, se realizaron los orificios correspondientes para la colocación de 2-3 tornillos de fijación (Agntho's AB, Suecia) y de los orificios correspondientes a las cánulas guía, mediante un taladro dental DESK 300 IN (Silfraden, Italia) con una broca de 1 mm (Meisinger, Alemania). Para limpiar la zona de la calota de restos de taladro, usamos suero salino esterilizado inyectable (laboratorios ERN, Barcelona, España) y dejamos secar la zona. A continuación ayudados de una aguja fina rompemos la membrana de tejido correspondiente a las meninges que protegen al cerebro, ya que es posible que las cánulas guía no sean capaces de romperla por sí solas, evitando futuras hemorragias, y el malestar general del animal (puesto que en el cerebro, los únicos receptores de dolor hasta ahora descritos, se localizan en estas membranas), dejando sangrar (si es el caso) a través de los orificios, evitando así la aparición de coágulos, que afectarán a la conducta del animal. Tras este paso, se limpió la zona, y se hicieron descender las cánulas guía lentamente, hasta su emplazamiento exacto. Tras secar de nuevo la zona mediante torundas de algodón, se fijaron las cánulas al cráneo por medio de resina autopolimerizante Dentalon Plus® (Heraeus Kulzer, Alemania) rodeando los tornillos, cánulas guía e implante y moldeándolo hasta darle una forma de aspecto redondeado (sin esquinas o puntos de agarre, que dificulte al animal un posible enganche y daño del implante). Durante el tiempo de espera a que se endurezca la resina, el animal recibe una dosis subcutánea de

3 ml de suero salino para evitar la deshidratación y que sirve para facilitar la eliminación del anestésico. Posteriormente se introdujeron los fiadores para evitar la oclusión de las cánulas guía y tras limpiar la herida y retirar los restos de resina, se suturó la herida en la parte frontal y posterior (Aesculap®, Braun, Alemania). Durante la cirugía, la temperatura del animal es controlada, y no debería ser inferior a 36 °C.

Tras la cirugía, el animal se mantuvo aislado en una jaula apoyada sobre una manta térmica hasta que es capaz de moverse por sí solo. Al día siguiente el animal fue devuelto a jaula original y durante los siguientes 4-5 días se controló su peso, la evolución de la herida y el estado general del animal. En los casos en los que no hubo ganancia de peso o hay una reducción notable del mismo, se preparó una “papilla” a partir del pienso normal triturado (Teklad laboratory animal diet, Harlan, Reino Unido) y agua, para facilitar la masticación y la ingestión. Cualquier signo de enfermedad o de reducción del bienestar general del animal es observado y en caso de no mejorar, se procedió al sacrificio del animal mediante una sobredosis de anestésico.

5. Sistema de perfusión intra-cerebral *in vivo*.

La perfusión intra-cerebral o microdiálisis es una técnica que permite la recogida de sustancias químicas presentes en el espacio extracelular (Robinson & Justice, 1991). Esta técnica consiste en la perfusión continua de líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) a través de una cánula de microdiálisis. Las sustancias químicas presentes en el tejido en contacto con la membrana dialítica de la cánula, la atraviesan a favor de gradiente de concentración. De esta forma se obtienen las muestras (perfundidos) que posteriormente son fraccionadas y analizadas.

El LCRs con el que se realizó la perfusión tenía un pH de 7,4 y estaba compuesto por NaCl 137 nM (Panreac Química S.A.U., España), KCl 3nM (Merck, Alemania), CaCl₂ 2,4 nM (Merck, Alemania), MgSO₄ 1 nM (Merck, Alemania), NaH₂PO₄ 0,5 nM (Merck, Alemania), NaHPO₄ 2 nM (Merck, Alemania) y glucosa 3 nM (Merck, Alemania), todo ello diluido en 1 litro de agua ultrapura.

El porcentaje de recaptura de las cánulas de microdiálisis, de fabricación propia, se ha situado en torno al 15 % para la noradrenalina. En experimentos previos en nuestro

laboratorio, se añadió nomifensina al LCRs, un inhibidor de la recaptura de catecolaminas, que permiten incrementar los niveles basales de estos neurotransmisores para facilitar su detección por cromatografía (Del Arco *et al.*, 2011a; Ronzoni *et al.*, 2014). En este estudio se empleó una concentración de nomifensina (Sigma, Alemania) de 5 μ M, que entra en el rango descrito en la bibliografía.

El sistema de perfusión utilizado consta de los siguientes elementos (Figura M4):

- bomba de perfusión Harvard 22 (Estados Unidos)
- dos jeringas Hamilton de 1 ml (Suiza)
- una válvula Harvard HV 4-4 de cuatro vías (Estados Unidos)
- un soporte giratorio o *swivel* de dos canales TCS 2-23 (AgnTho's AB, Suecia), que se une a la caja de microdiálisis y al animal
- tubos de etileno propileno fluorizados (FEP Teflon®, AgnTho's AB, Suecia) con un diámetro externo de 23 gay adaptadores para tubos FEP (AgnTho's AB, Suecia).

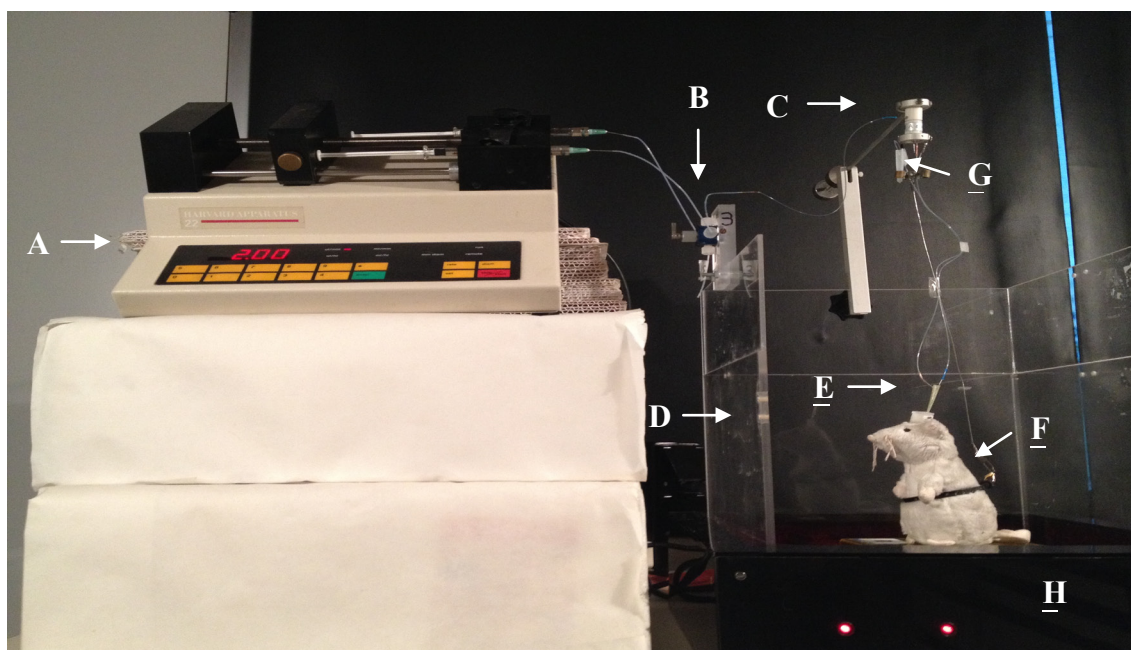


Figura M4. Sistema de perfusión intracerebral *in vivo*. Bomba de perfusión (A); válvula (B); *swivel* (C); jaula de microdiálisis (D); cánula de microdiálisis (E); cinturón de anclaje del animal (F); recogida de la muestra (G); bastidor de la actividad motora (H).

Para llevar a cabo los experimentos de microdiálisis, comenzamos por la sujeción ligera del animal, tras la cual retiramos la tapa del implante y a continuación los fiadores. Se perfunde LCRs a través de la cánula de microdiálisis para generar una presión hidrostática sobre la membrana y prevenir un posible colapso y rotura durante su

inserción a través de la cánula guía. Una vez colocada, se fija la cánula mediante un tornillo *Allen*. A continuación, se ancla al animal a un sistema de sujeción, que emplea una brida de plástico a modo de “cinturón” que lo une al *swivel*, permitiendo moverse al animal libremente por la jaula.

La perfusión se realiza a un flujo constante de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, recogiendo muestras cada 20 o 30 minutos. Todas las muestras obtenidas se separaron en alícuotas para el análisis de noradrenalina y otra el de corticosterona mediante radioinmunoensayo (RIA) (ver apartado 8.3), antes de ser almacenadas a -80°C .

5.1 Protocolo general de perfusión

El diseño del protocolo de perfusión sigue una serie de etapas que son similares en los distintos experimentos realizados en la Tesis Doctoral:

- Habitación a la caja experimental donde se desarrollan los experimentos de microdiálisis.
- Periodo de estabilización: 3 horas que comienzan tras la inserción de la cánula y durante los cuales no se recogen muestra. Este periodo se ha mostrado que es el necesario para que los niveles de neurotransmisores se estabilicen tras insertar la cánula en el tejido cerebral, con el consecuente daño tisular/celular que ocurre (Hernández *et al.*, 2008).
- Periodo basal: se recogen las muestras que se utilizarán posteriormente como referencia de los niveles basales de noradrenalina y corticosterona.
- Periodo post-basal: En donde tiene lugar los estímulos empleados en los distintos experimentos de microdiálisis, microinyección, periodo de estrés (ver apartado 2.1) y periodo post-estrés (consultar el apartado de diseño de los Bloques Experimentales de la sección de Resultados).

5.2 Análisis de noradrenalina por cromatografía líquida de alta resolución

La detección de noradrenalina se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplada a un detector electroquímico siguiendo el método empleado en nuestro laboratorio en estudios previos (Segovia *et al.*, 1997; Segovia & Mora, 1998; Del Arco *et al.*, 2012). El volumen necesario para el análisis de

las catecolaminas fue de 20 μ l, que se inyectaron por medio de un inyector automático refrigerado (4° C) (HP Series 1200, Hewlett-Packard, España), pasando a través de una columna C18 Nova-Pak® C18 (Waters, España), que presenta un tamaño de partícula de 4 μ m, 3,9 mm de diámetro y 150 mm de longitud.

La detección de noradrenalina se realizó mediante un detector electroquímico Couluchem II, modelo 5200 (ESA, Estados Unidos) que consta de dos células analíticas (ESA 5011): la célula 1 o de oxidación se fija a +340 mV, con una sensibilidad de 2 μ A y la célula 2 o de reducción se fija a -250 mV, con una sensibilidad de 1 nA. El empleo de dos células analíticas se debe a la diferencia de concentración entre la noradrenalina y los metabolitos de dopamina y serotonina. El cálculo de los tiempos de retención y de la cuantificación de la noradrenalina presente en la muestra se realiza mediante un programa informático (Millenium® software, Waters, Estados Unidos) siguiendo el método de estándar externo.

5.3 Condiciones cromatográficas

Para la separación de las catecolaminas se empleó un sistema desgasificador de bombeo HP Series 1200 (Hewlett-Packard, España) de programa isocrático con un flujo constante de 1 ml/minuto y una fase móvil que permite la detección de noradrenalina (aproximadamente a los 3 minutos) y la de metabolitos de dopamina ácido homovalínico (HVA, a los 3,5 minutos) y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC, a los 2,1 minutos) así como el metabolito de la serotonina el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA, a los 2,7 minutos) (Figura M5).

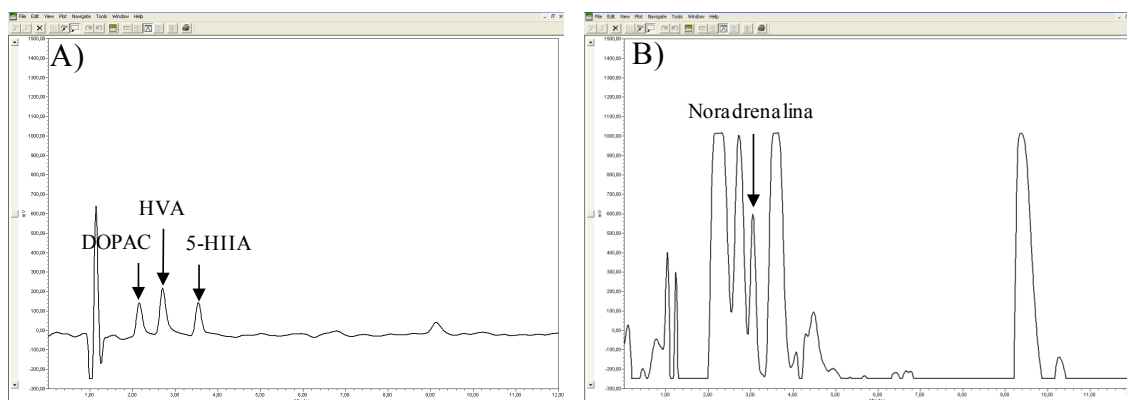


Figura M5. Ejemplo de cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto. A) Patrón de cromatograma obtenido de los metabolitos de dopamina DOPAC y HVA y de serotonina 5-HIAA (250 μ M). B) Patrón de cromatograma de noradrenalina (1 nM).

La fase móvil consiste en una solución 82/12 (Zanassi *et al.*, 1999) de tampón acetato-citrato 0,1 M y metanol grado HPLC 15 % (Scharlab S.L., España). El tampón se prepara disolviendo acetato sódico (Merck, Alemania) y ácido cítrico (Merck, Alemania) en agua ultrapura. A esta solución se añade sulfonato sódico (Scharlab S.L., España) 9 mM y ácido etilen-diamino-tetraacético EDTA (Sigma–Aldrich, Estados Unidos) 1 mM. Se ajusta el pH a 3,2 mediante la adición de HCl 1 N (Panreac Química S.A.U., España). Por último se filtra el tampón mediante (filtros GSWP4700, poro 0,22 µm, Merck Millipore, Alemania). Antes de su utilización, la fase móvil se introduce en un baño de sonicación durante 15 minutos para favorecer así su desgasificación. La fase móvil se mantiene recirculando en el sistema de HPLC durante aproximadamente un mes.

5.4 Calibración

La calibración se lleva a cabo con el fin de generar en el programa informático los valores de referencia del tiempo de retención, así como el factor de respuesta correspondiente a la noradrenalina y los metabolitos mencionados en el punto anterior. El tiempo de retención de una sustancia es el tiempo necesario para que dicha sustancia recorra completamente la columna de separación del cromatógrafo. El factor de respuesta de una sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esa sustancia con las áreas de los picos cromatográficos. Para llevar a cabo la calibración del cromatógrafo se inyectan diferentes concentraciones de noradrenalina (0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 nM) así como de los metabolitos HVA, DOPAC y 5-HIAA (25, 50, 100, 250 µM). El límite de detección de la noradrenalina es 0,15 nM.

5.5 Cálculo del coeficiente de variación

Para el calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 4 alícuotas de una solución de Noradrenalina (Sigma, Estados Unidos) 2,5 mM. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. Los coeficientes de variación (CV) para la noradrenalina y los metabolitos analizados se expresan en la siguiente tabla:

Tabla M2. Coeficiente de variación de noradrenalina empleando el método anteriormente descrito. n: tamaño de muestra; s: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

	N	Media (nM)	S	CV
Noradrenalina	4	2,62	0,12	11,61

5.6. Linealidad del análisis cromatográfico

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico utilizado se inyectaron soluciones patrón con concentraciones variables y conocidas de las catecolaminas a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de cada catecolamina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (nM) (eje de abscisas) se ajusta a una línea recta (Figura M6).

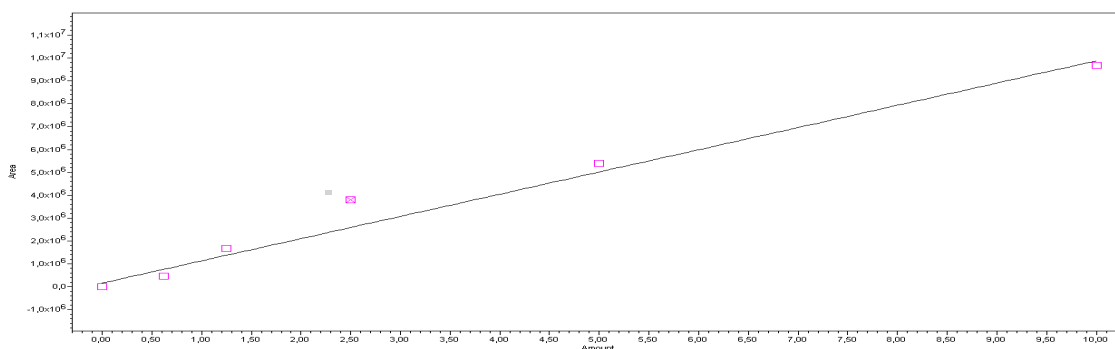


Figura M6. Curva de linealidad obtenida para noradrenalina bajo las condiciones cromatográficas

6. Inyecciones intracerebrales

Todas las inyecciones se llevaron a cabo mediante un sistema de cánulas de acero de 28 ga conectadas por medio de un polietileno (AngTho's AB, Suecia) a unas jeringas de Hamilton® de 10 µl (Hamilton-company, Bonaduz, Suiza). Mediante una micro-bomba de infusión (Harvard apparatus, Estados Unidos) a un flujo de perfusión de constante se inyectó un volumen prefijado de cada de las drogas seleccionadas para los experimentos realizados en la Tesis Doctoral. Las cánulas de inyección se mantuvieron 60 segundos adicionales para facilitar la difusión del la droga. Todas las drogas fueron preparadas y disueltas en LCRs entre 30 y 60 minutos antes de realizar las inyecciones. El LCRs en el que fueron disueltas las drogas también fue usado como vehículo.

Todos los animales fueron habituados durante al menos 3 días previos al experimento, durante 30-60 segundos y siempre por el mismo investigador que posteriormente realizó las inyecciones. Además el día anterior al experimento, se realiza en cada animal una simulación de inyección, sin que las cánulas de inyección sobrepasen las cánulas guía, limitando los posibles efectos ejercidos por el estrés durante el experimento. Tras la inyección los animales permanecieron 1 hora en sus jaulas.

6.1 Drogas

Para estudiar el efecto de una activación/inhibición farmacológica de la corteza infralímbica sobre la modulación del eje HHA y sobre la formación de memoria emocional se utilizaron el bloqueante de los receptores GABA_A picrotoxina en una dosis de 0,20 µg/lado (Sigma-Aldrich, España) y el agonista de los receptores GABA_A muscimol en una dosis de 0,25 µg/lado (Tocris Bioscience, Reino Unido). El volumen y el flujo de inyección fueron seleccionados para que las drogas no difundiesen a aéreas adyacentes. Las dosis que se emplearon en este estudio se eligieron en base a estudios previos en nuestro laboratorio (Garrido *et al.*, 2012b).

Para estudiar el efecto de la alteración funcional de la corteza prelímbica sobre la respuesta a estrés y la memoria aversiva en un modelo experimental de psicosis, se realizaron inyecciones bilaterales en la corteza prelímbica de un antagonista competitivo de NMDA Ácido 3-[[®]2-carboxypiperazin-4-yl]-propyl-1-phosphonico, CPP (Tocris Bioscience, Reino Unido) en unas dosis de 25 y 100 µg/lado. Las dosis empeladas en este estudio se eligieron en base a la no aparición de hiperactividad motora como los mostrados en un artículo previo (Del Arco & Mora, 2008; Del Arco *et al.*, 2011).

Para estudiar el efecto del bloqueo y la activación de los receptores α -adrenérgicos sobre las alteraciones conductuales en un modelo animal de exposición a estrés traumático se emplearon Propranolol (0,1 µg 0,5 µg y 1,5µg /lado) (Sigma-Aldich, España) antagonista no específico de receptores β -adrenérgico, Clenbuterol (30 ng/lado) (Sigma-Aldrich, España), agonista específico de los receptores α_2 -adrenérgico y noradrenalina (1 µg) (Sigma-Aldrich, España) agonista de los receptores adrenérgicos. Las dosis usadas se basaron en estudios previos (Introini-Collison *et al.*, 1995;

LaLumiere & McGaugh, 2005). En la siguiente tabla se detallan las principales características de las microinyecciones realizadas en la Tesis Doctoral:

Tabla M3. Resumen de las características de la inyección (área cerebral, profundidad respecto a la cánula guía, volumen y flujo) empleados en los experimentos de microinyecciones.

		Prof. cánula	Vol. (µl/lado)	Flujo (µl/min)
CPF	Prelímbica	1,5 mm	0,5	0,4
	Infralímbica	1mm	0,25	0,25
	Amígdala	2 mm	0,5	0,5

7. Histología.

Al finalizar los experimentos, los animales fueron inyectados con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) intraperitoneal y posteriormente perfundidos mediante un sistema intracardiaco que empleó una solución salina (NaCl 0,9 %) y heparina (LEOPharma, España) 2 %, seguida de una solución de paraformaldehído 4%. Justo antes de realizar la perfusión en los animales correspondientes a los Bloques Experimentales I y II, se inyectó un volumen de 0,25 µl/lado de una solución de azul de metileno (Sigma-Aldrich, España) para marcar el lugar de la inyección. Los cerebros fueron extraídos, mantenidos 24 horas en paraformaldehído y posteriormente seccionados (50 µm) empleando un criostato (Leica CM 1510 S, Alemania) para determinar la correcta localización de las cánulas de microdiálisis y de las cánulas de inyección ayudados de una lupa de aumento (Zeiss Stemi 2000, Alemania). (Figuras M7 y M8). Los cerebros del bloque experimental III tras ser mantenidos en paraformaldehído durante 24h, fueron sumergidos en sacarosa 25 % (peso/volumen) al menos 24 horas para favorecer su crioprotección. A continuación fueron seccionados en un criostato (50 µm) y teñidos mediante cresyl violeta (Merck, Alemania) y cubiertos. Esas secciones fueron examinadas bajo un microscopio de campo claro (Axioskop, Zeiss, Alemania) y se tomaron micrografías de alguno de los cortes más representativos. (Figuras M9 y M10).

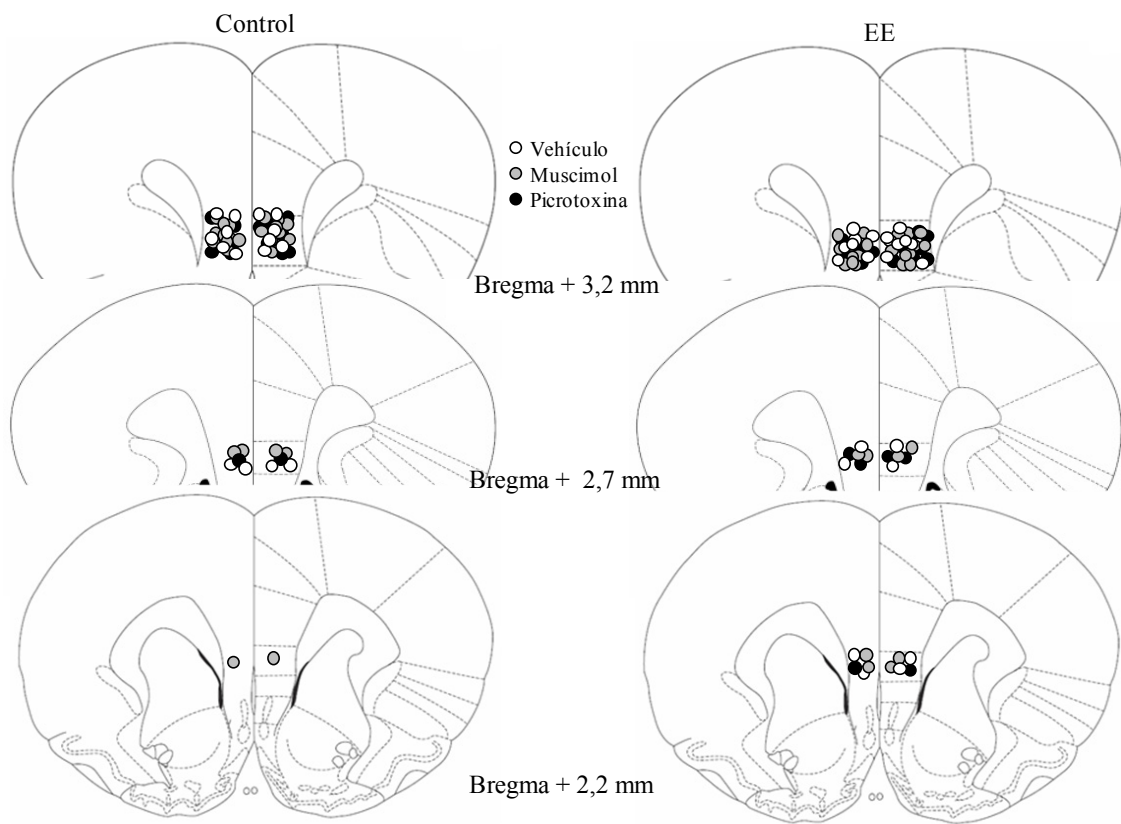


Figura M7. Análisis histológico de los experimentos correspondientes al bloque experimental I. La figura muestra la localización de las inyecciones en animales control y EA en la corteza infralímbica que se incluyeron en el este estudio.

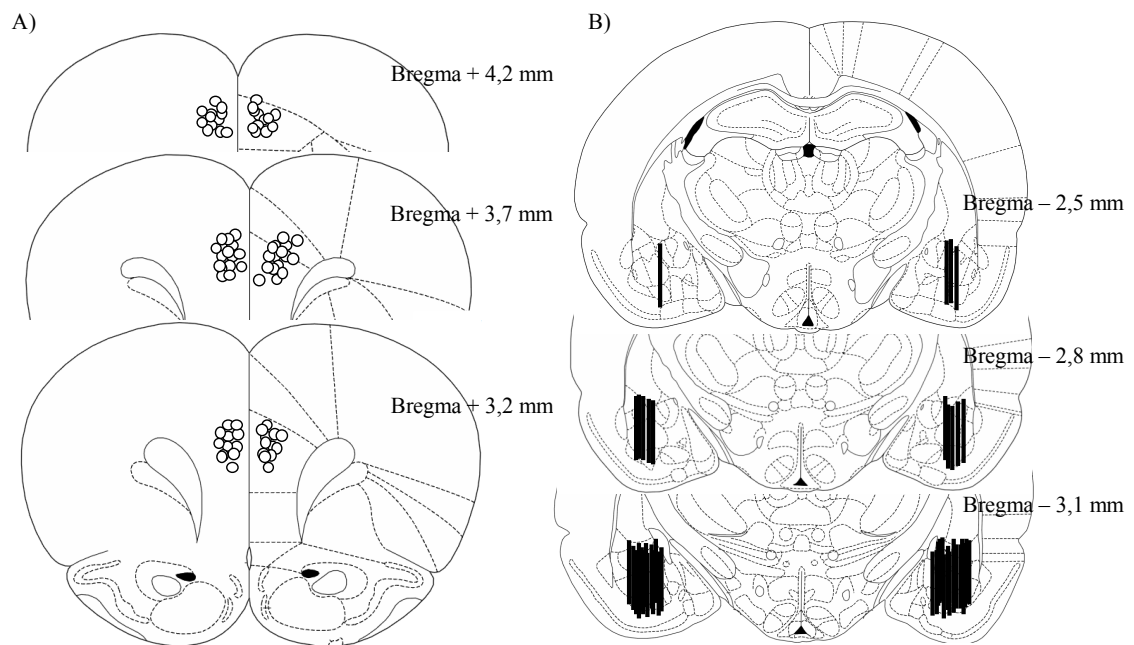


Figura M8. Análisis histológico de los experimentos correspondientes al bloque experimental II. La figura muestra la localización de las inyecciones en animales control y EA en la corteza prefrontal A) y la localización de la membrana de las cánulas de microdialisis B) de los animales incluidos en este estudio.

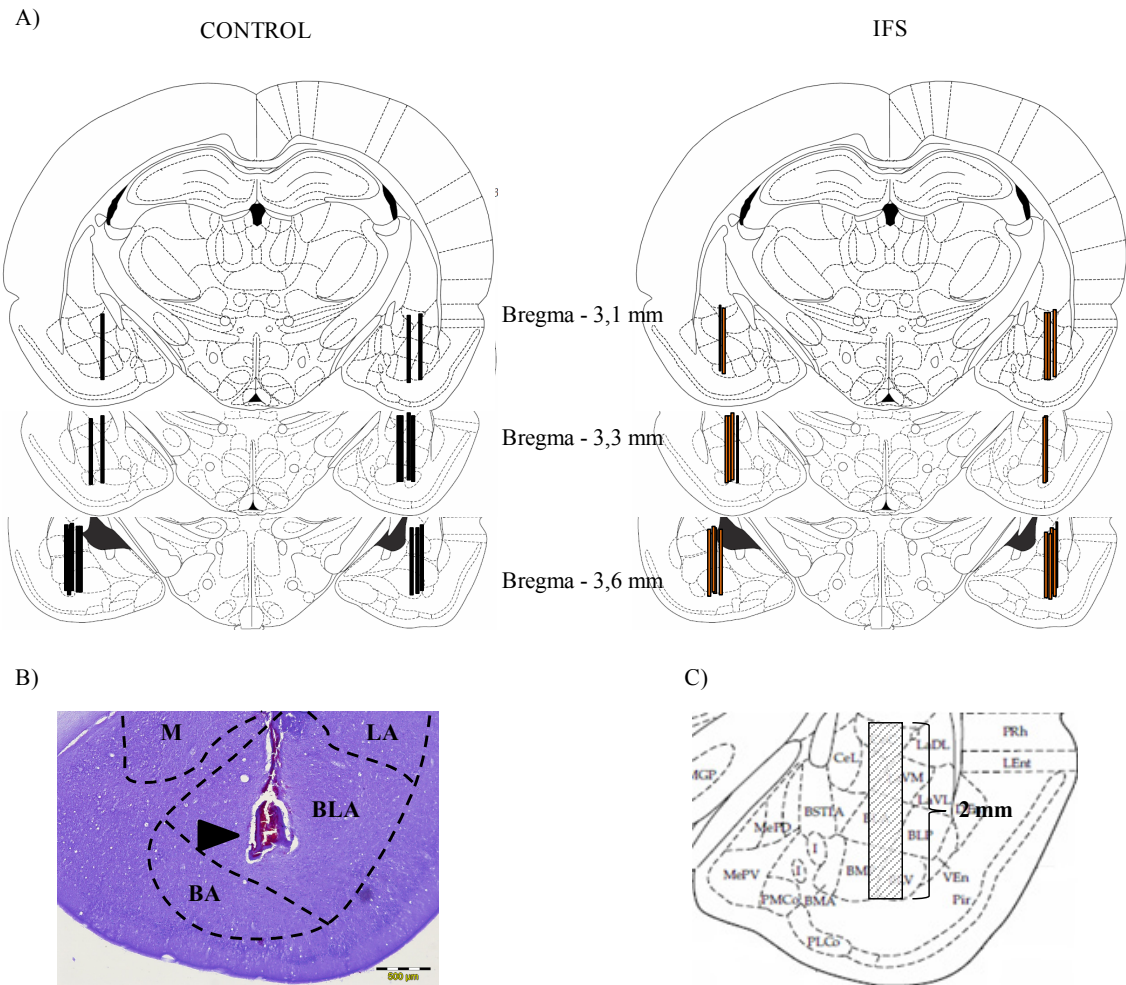


Figura M9. Análisis histológico de los experimentos de microdiálisis en amígdala, correspondiente al bloque experimental III. A) Localización de las cánulas de microdiálisis en las ratas incluidas en el estudio. B) Micrografía representativa de la localización de la cánula de microdiálisis en la amígdala (la flecha en negro marca el extremo de la cánula). C) Imagen de la amígdala en el que se representa la membrana de diálisis de 2 mm de longitud en la posición esperada en la amígdala (rectángulo con rayas). Abreviaturas: basal de la amígdala (**BA**), núcleo lateral de la amígdala (**LA**), núcleo medial (**M**); región basolateral (**BLA**).

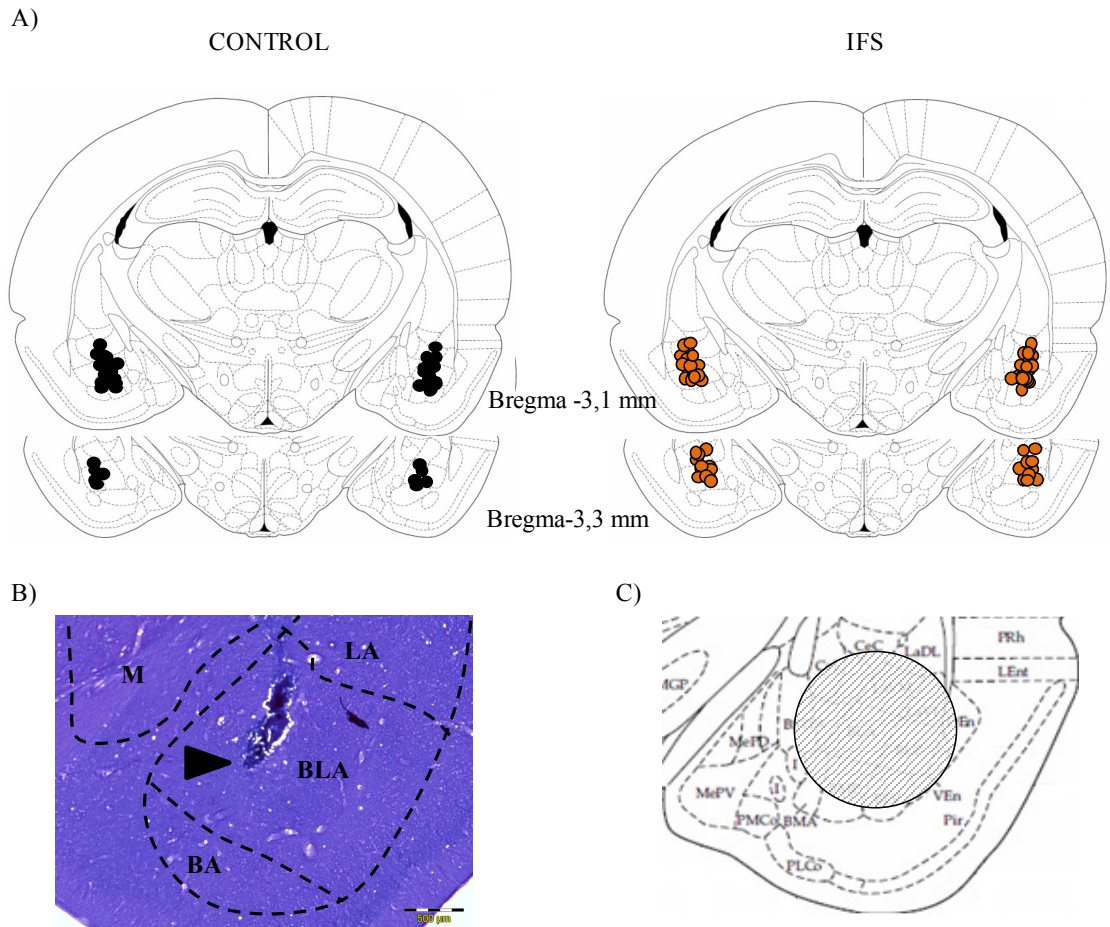


Figura M10. Análisis histológico de las inyecciones intra-cerebrales en amígdala correspondiente al bloque experimental III. A) Localización de las cánulas de inyección en las ratas incluidas en el estudio. B) Micrografía representativa de la localización de la cánula de inyección en la amígdala (la flecha en negro marca el extremo de la aguja de inyección). C) Imagen de la amígdala en el que se representa el volumen de difusión esperada de la droga y núcleos de la amígdala afectados (círculo con rayas). Abreviaturas: basal de la amígdala (**BA**), núcleo lateral de la amígdala (**LA**), núcleo medial (**M**); región basolateral (**BLA**).

8. Cuantificación de Corticosterona mediante radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica que se basa en la competición entre una hormona marcada con un radioisótopo (I^{125}) y la misma hormona natural presente en la muestra por un anticuerpo altamente específico contra la hormona correspondiente (en nuestro caso, la corticosterona). Como las cantidades de hormona y anticuerpo siempre son las mismas y lo que varía es la cantidad de hormona no marcada (aquella que corresponde a nuestras muestras), después de un proceso en el que se separen la hormona libre de la unida al anticuerpo, cuanto mayor sea la cantidad de hormona sin marcaje (hormona fría) menor será la fracción de hormona marcada unida al anticuerpo y, por tanto, menor la cantidad de radiactividad medida. De este modo, estableciendo una curva patrón con cantidades conocidas de hormona natural podemos deducir la cantidad de hormona fría existente en una muestra en función de la radiactividad unida al anticuerpo.

8.1 Obtención de las muestras de sangre y plasma

Para la obtención de las muestras de sangre, se procede a la sujeción firme pero confortable para el animal, y por medio de una incisión a unos 2 mm del final de la cola y se aplicó un masaje desde la base al extremo de la cola. Las muestras de sangre ($\approx 100 \mu\text{l}$) se recogen en viales previamente heparinizados ($10 \mu\text{l}$) con heparina al 5% (LEOPharma, España), mantenidos en hielo hasta su posterior procesamiento. Desde la sujeción del animal a la obtención de la muestra de sangre se realiza en menos de 2 minutos, ya que pasado ese tiempo, los niveles de corticosterona pueden verse afectados por efecto del propio procedimiento. Para la obtención de varias muestras de sangre a lo largo de un experimento (ejemplo: niveles basales, durante estrés o post-estrés) se repite el procedimiento de masaje sobre la cola, reabriendo la herida de manera cuidadosa para reducir las molestias al animal (ver diseño experimental en la sección de resultados).

8.2 Cuantificación de corticosterona plasmática

Los viales en donde se recoge las muestras de sangre se centrifugaron (10 minutos, 3000 r.p.m.) y la fase correspondiente al plasma fue transferida a un nuevo vial, que se

almacenó inmediatamente a -80 °C hasta su posterior análisis. Para el análisis, se empleó un kit comercial (MP Biomedicals, Estados Unidos).

Para evaluar la concentración de corticosterona plasmática total de las muestras de sangre se siguieron los pasos que indica el protocolo del kit comercial. Las muestras se diluyeron 1/200 en un diluyente esteroide. Las muestras, transferidas a tubos de fondo redondo (Daslab, España) para su posterior lectura en un contador Gamma (Wallac 1470 Wizard, Perkin Elmer, Estados Unidos) se le añadieron 200 µl de corticosterona I¹²⁵ y, a continuación, 300 µl de anti-corticosterona, agitándose en un vortex (Labnet, Edison, NJ, Estados Unidos) durante 5 segundos. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas, al final de las cuales se añadieron 500 µl de solución precipitante. Los tubos se agitaron en vortex y se centrifugaron a 4 °C durante 15 minutos a 1000 g. Finalmente se aspiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur acoplado a una bomba de vacío y un depósito protegido para residuos radioactivos. Junto con las muestras, se preparó una curva de calibración mediante patrones de corticosterona proporcionados por el kit (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/ml; ver figura M11A) Todas las muestras se miden en el contador gamma. El contador mide la cantidad de hormona marcada que se haya unido al anticuerpo al competir con la corticosterona libre presente en las muestras. El software del sistema de cuantificación proporciona la curva estándar en la que representa en el eje de ordenadas el cociente B/B0 (se define a continuación) y en el eje de abscisas las concentraciones de los distintos patrones empleados. El cociente B/B0 se obtiene del siguiente modo:

$$\frac{B}{B0} = \frac{cpm (patrón n) - cpm (NSB)}{cpm (patrón 0) - cpm (NSB)}$$

En donde:

- cpm (patrón n): las cuentas por minuto del patrón n.
- cpm NSB: las cuentas por minuto de un tubo que mide la unión inespecífica (solo se ha añadido al mismo diluyente esteroide y la hormona marcada).
- cpm (patrón 0): cuentas por minuto de un tubo al que no se añade muestra o patrón alguno, pero sí el resto de reactivos (mide la unión inespecífica en presencia del anticuerpo no marcado).

El software del sistema calcula la concentración de cada uno de los patrones de la curva en base a la pendiente de la curva y la varianza de los duplicados de cada muestra.

Asimismo, si alguna de las muestras se aleja demasiado de su duplicado, el software lo elimina de la representación. Las muestras son calculadas interpolando el valor de cuentas por minuto de cada una de ellas en la curva estándar (Figura M11A).

8.3 Cuantificación de corticosterona libre en muestras de microdiálisis

Dado que la corticosterona presente en el cerebro deriva del 5-10% de la corticosterona plasmática que se encuentra en forma libre (Rosner, 1990) su concentración es mucho más reducida que la plasmática. Además, no toda la corticosterona presente en el espacio extracelular atraviesa la membrana de la cánula de microdiálisis, por lo que la concentración de corticosterona libre de los dializados es sensiblemente menor que la presente en muestras de plasma. Por ello, para incrementar la sensibilidad del kit comercial, se redujo $\frac{1}{4}$ el volumen de hormona marcada y las muestras no se diluyeron. Con ello se facilitó la competitividad de la hormona fría. Además en la curva estándar se añadieron algunos puntos de menor concentración de corticosterona (6,25 y 12,5ng/ml mediante diluciones del patrón original de 25 ng/ml) y se retiraron los de mayor concentración (500 y 1000 ng/ml). Los resultados obtenidos se corrigieron multiplicándolos por 200, dado que estas muestras no se diluyen, al contrario de lo que se hace con las muestras de plasma. Los niveles basales de CORT libre fueron bajos pero se encontraron por encima del nivel de detección. La figura M11B muestra un ejemplo de curva estándar realizada para cuantificar muestras de dializados de microdiálisis.

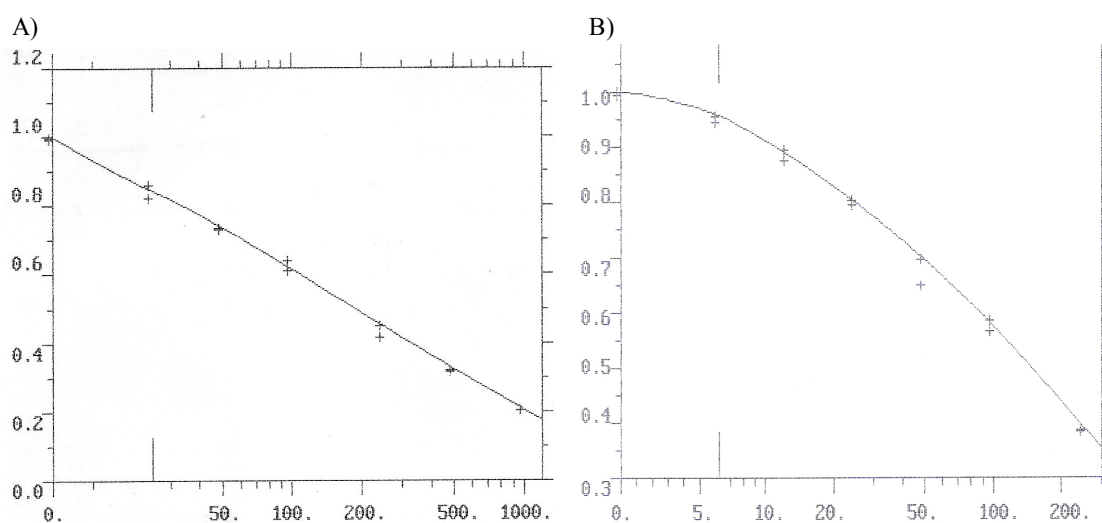


Figura M11. Ejemplo de curva estándar para cuantificar corticosterona en plasma A). Y ejemplo de curva estándar para cuantificar corticosterona en muestras de dializado de microdiálisis B).

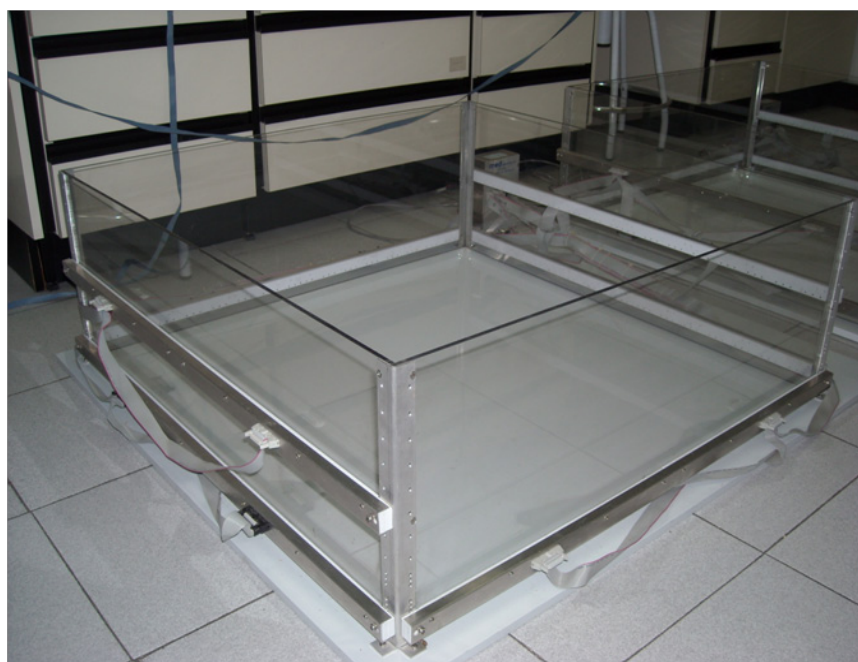
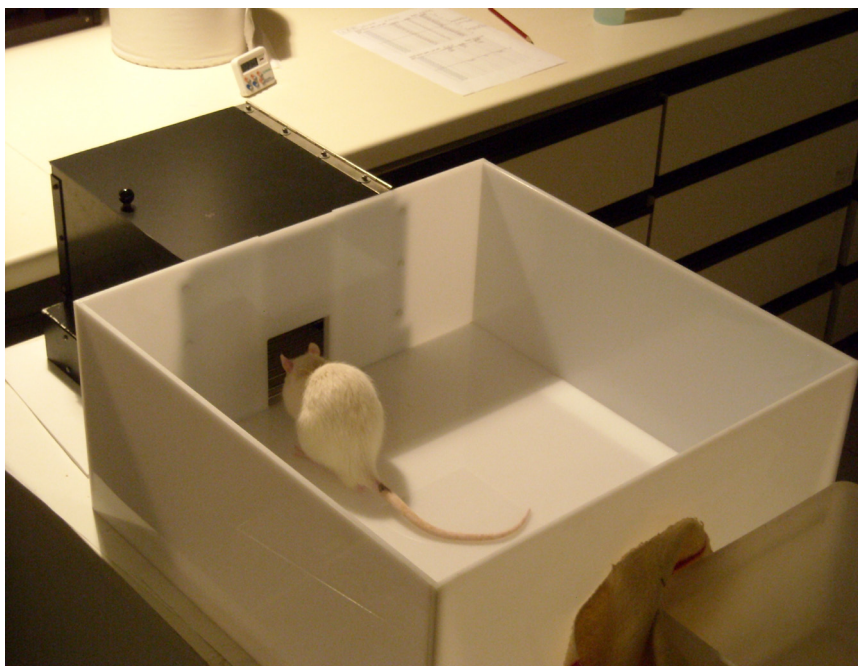
9. Test de evitación pasiva.

Para la evaluación de la memoria emocional se empleó un aparato de evitación pasiva que consiste en una caja dividida en dos compartimentos separados mediante una compuerta deslizante. El compartimento de inicio (iluminado) construido en plástico de color blanco (50 x 50 x 20 cm) sin tapa e iluminado mediante una bombilla de 60 W a unos 50 cm del suelo del aparato. El otro compartimento (compartimento oscuro) está construido en plástico negro (25 x 25 x 20 cm), posee una tapa extraíble y además en el suelo una rejilla que se conecta a un estimulador eléctrico, y es donde reciben el shock eléctrico los animales (Figura M12). El test de evitación pasiva se realizó de la siguiente manera. Durante el día de entrenamiento, los animales fueron colocados en el compartimento iluminado y se les permitió explorar todo el aparato (incluido el compartimento del shock) durante 300 segundos. Pasadas 5 horas desde la habituación, los animales fueron re-expuestos al aparato, permitiéndoles la exploración, pero cerrando la puerta deslizante tras entrar en el compartimento del shock. El tiempo que cada animal tarda en entrar en este compartimento oscuro desde el inicio de la prueba es lo que se anota como latencia de entrenamiento. Inmediatamente después, los animales recibieron un shock eléctrico en las patas (ver apartado 2.1) y tras esperar unos segundos, el animal fue retirado del test. 24 horas más tarde, los animales fueron re-expuestos al test, y colocados en el compartimento iluminado, midiendo el tiempo que tardaron en pasar al compartimento donde recibieron el shock (se contabiliza como entrada cuando las 4 patas están en el compartimento del shock y pasan más de 10 segundos sin salir). Este tiempo se anota como latencia del Test 24 horas, fijándose un límite de 600 segundos para la entrada. Cuando el animal no entró en ese periodo de tiempo, el investigador retiró al animal del aparato y se contabilizaron 600 segundos como latencia del Test 24 horas. El protocolo de IFS se desarrolla también en este aparato de evitación pasiva (ver apartado 2.2).

10. Evaluación de la actividad motora espontánea en un ambiente novedoso

Se emplea para ello dos aparatos de campo abierto (MED Associates INC., St. Albans, Estados Unidos). Cada campo abierto consiste en una caja cuadrada de Plexiglás (80 x 80 x 30 cm) equipada con dos hileras de ocho células fotoeléctricas cada una situada a 5 y 15 cm de altura respectivamente, que registran la actividad horizontal y vertical del

animal (Figura M13). Los animales fueron colocados una sola vez en el centro del campo abierto y exploraron libremente durante 60 minutos, en los que se registran las interrupciones de las células fotoeléctricas gracias a un programa informático (MED Associates INC., St Albans, Estados Unidos). El campo abierto se limpió cuidadosamente con etanol 70 % antes de colocar cada uno de los animales.



Figuras M12 y M13. Fotografías de un aparato de evitación pasiva (imagen superior) y de un campo abierto (imagen inferior) empleados en la Tesis Doctoral.

11. Cuantificación de la expresión de ARN mensajeros específicos

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación y los cerebros rápidamente extraídos y congelados en hielo seco e isopentano (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y almacenados a -80 °C hasta su posterior disección.

Mediante un criostato (Leica 1510S, Alemania) a -20 °C, se realizaron cortes de 300 µm de los cerebros y las áreas de cerebro seleccionadas para el estudio en cada Bloque Experimental, se diseccionaron empleando un bisturí (Braun Aesculap®, Alemania) sobre una placa enfriada con hielo seco y ayudados por el atlas anatómico del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 1998). Las muestras se almacenan inmediatamente en viales de 1,5 ml a -80 °C.

11.1 Extracción del ARN

La extracción de ARN de las muestras se realizó mediante el siguiente protocolo: En primer lugar las muestras de tejido se homogenizan en 500 µl de TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) mediante varios pasos a través de una jeringuilla con una aguja de 25 ga. Para asegurar la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos, se mantienen las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añaden 0,1 ml de cloroformo sin aditivos (Merck, Alemania) por cada 0,5 ml de TRI utilizado. La mezcla, se agita en vortex vigorosamente durante 15 segundos y se mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos, pasados los cuales se centrifuga la mezcla a 12000x g durante 15 minutos a 4 °C (5804 R, Eppendorf, Alemania). Tras la centrifugación, la mezcla se separa en 3 fases, la inferior orgánica (principalmente proteínas), una interfase (ADN) y una fase superior o sobrenadante, acuosa e incolora (ARN). De esta fase acuosa superior, se transfieren 250 µl a otro tubo nuevo, con cuidado de no arrastrar restos de la interfase, ya que contaminaría el RNA con DNA y se añaden 250 µl de isopropanol (Scharlab S.L., España) por cada 250 µl de TRI usado. Se agita por inversión y se mantienen las muestras durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugan a 12000x g durante 10 minutos a 4 °C, de manera que el ARN precipita y forma un pellet de color blanquecino en el fondo del tubo.

El sobrenadante generado de la anterior centrifugación se elimina por decantado (con cuidado puesto que el pellet puede separarse del fondo del tubo y ser arrastrado durante este proceso) y se procede al lavado con 500 μ l de etanol 75 % (preparado a partir de etanol absoluto, Panreac Química S.A.U., España y agua ultrapura) por cada 500 μ l de TRI utilizado. Se agita en vortex y las muestras son posteriormente centrifugadas a 12000x g durante 10 minutos a 4 °C. De nuevo el sobrenadante generado se elimina por decantación y se deja secar el pellet durante algunos minutos (no completamente, pues dificultaría su posterior re-suspensión). Se añaden 20 μ l de agua DEPC dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se introducen las muestras en un termo-bloque (Labnet, Edison, NJ, Estados Unidos) entre 55-60 °C durante 15 minutos para favorecer la disolución del sedimento de ARN. Las muestras se almacenan a -80 °C hasta su posterior análisis. Todo el material empleado en estos pasos debe estar previamente autoclavado.

11.2 Cuantificación de ARN

Para cuantificar la concentración y la calidad del ARN extraído de las muestras para su posterior cuantificación, se emplea un sistema de electroforesis automatizado Experion™ (BioRad, Estados Unidos). Este sistema permite realizar una electroforesis de muestras en un chip (Experion™ StdSens). El chip contiene un conjunto de pocillos y micro-canales conectados entre sí. De cada muestra, 2 μ l de ARN se transfieren a un nuevo tubo, que posteriormente es calentado a 70 °C durante 5 minutos para desnaturalizarlo y favorecer la unión a un fluoróforo que se añade. Además en cada pocillo de análisis se añaden 5 μ l de tampón (cuya composición no fue facilitada por la casa comercial) y 1 μ l de muestra. Para compensar las pequeñas variaciones de pH y concentración de sal, se usa un marcador interno (fragmento de 50 pares de bases, presente en el tampón añadido a cada pocillo) que normaliza los tiempos de migración entre muestras, lo que asegura que el programa informático de análisis identifique apropiadamente los picos. En otro pocillo se añade un patrón de escalera o *ladder* que contiene 8 fragmentos de RN de diferentes tamaños (desde 200 hasta 6000 nucleótidos) (Figura M14)

Una vez introducido el chip en el aparato, el movimiento de la muestra es controlado por los electrodos que están en contacto con la solución en los pocillos. Se aplica un voltaje a los pocillos de manera secuencial (uno a uno) provocando que los fragmentos de ARN (con carga eléctrica) migren en el canal de separación. En este canal de separación la matriz de polímero que actúa como un tamiz da lugar a la separación de los fragmentos de ARN en función de su tamaño. Pero, además, durante la migración se intercala un fluoróforo de forma específica entre las bases de ARN. A medida que los fragmentos migran hacia el final del canal de separación, una célula láser excita al fluoróforo, que emite fluorescencia cuando está unido a los fragmentos de ARN.

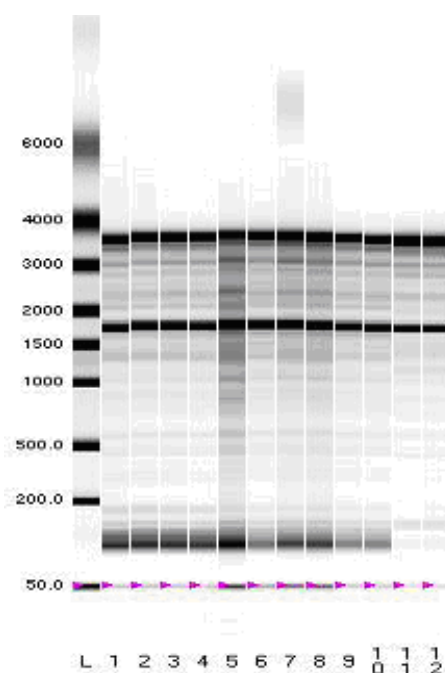


Figura M14. Electroforesis virtual generada a partir de los electroferogramas obtenidos para diversas muestras. La primera columna se corresponde con la muestra de ARN escalera *Ladder*.

La fluorescencia es detectada mediante un fotodiodo y el programa informático del sistema representa la intensidad de fluorescencia frente al tiempo para producir un electroferograma (Figura M15). Para cuantificar la concentración de ARN total de las muestras, el software de sistema emplea el cociente del área del ARN de la muestra frente al área total del ARN escalera/patrón. El programa informático del sistema proporciona el indicador de calidad del ARN (RQI), que permite estimar el nivel de degradación de una muestra de ARN total eucariota. Este algoritmo mide la integridad del ARN comparando el electroferograma de las muestras con una serie de muestras de ARN degradadas estandarizadas. El RQI es un valor entre 1 (ARN muy degradado) y 10 (ARN intacto). En el presente trabajo, el valor a partir del cual aceptamos que el ARN estaba en buenas condiciones fue de 8. Por último, el software presenta una representación virtual de una electroforesis creada a partir de los datos obtenidos en los distintos electroferogramas (Figura M16).

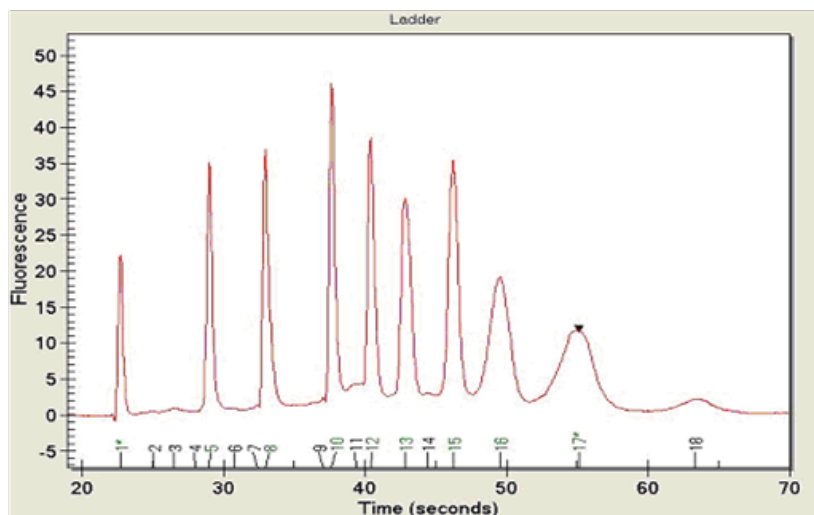


Figura M15. Electroferograma de ARN escalera. El primer pico corresponde a un fragmento de 50 pares de bases (marcador interno) añadido en todas las muestras con el fin de alinearlas. El resto de picos corresponden a fragmentos de ARN de diversa longitud (200-6000 nucleótidos).

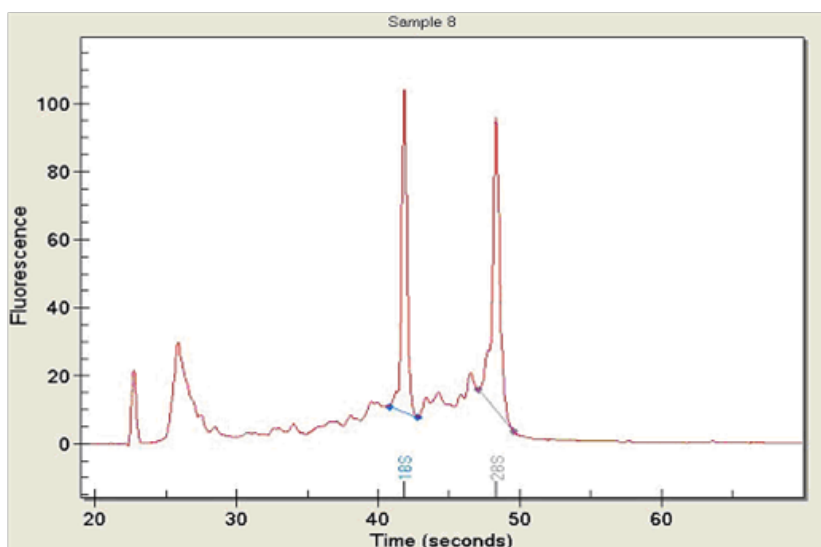


Figura M16. Electroferograma de una muestra de tejido. El software cuantifica automáticamente el área de los picos correspondientes a los fragmentos de ARN ribosómico 18S y 28S. El primer pico que se observa corresponde a un fragmento de 50 pares de bases (marcador interno) que sirve para alinear todas las muestras analizadas.

11.3 Síntesis de ADNc

A partir de 1 μg del ARN extraído (y previamente cuantificado en función de la concentración de ARN calculada en cada una de nuestras muestras por el Experion™), se obtiene un ADN complementario (ADNc) mediante el método de la retro-transcripción. Para ello se emplean unas polimerasa denominadas retro-transcriptasas, presentes en algunos virus que contienen ARN como material genético en lugar de ADN. La enzima empleada en este trabajo es la MLV-RT (retrotranscriptasa inversa del

virus de la leucemia murina de Moloney) (Promega, Estados Unidos). La mezcla de reacción consiste en 15 μl por muestra de los siguientes componentes: Transcriptasa inversa (MLV-RT) 1 μl ; tampón 5x 4 μl ; MgCl_2 4 μl ; PCR *nucleotide mix* 1 μl ; RNAsin 0,5 μl y agua DEPC 4,5 μl (kit comercial Promega, Estados Unidos).

El PCR *nucleotide mix* es la mezcla de nucleótidos que permite la síntesis de ADNc. El RNAsin es un inhibidor de las ARNasas que impide la degradación del ARN. Se añade en un vial nuevo la cantidad de muestra necesaria para tener 1 μg de RNA y se complementa con agua DEPC hasta 4 μl . Posteriormente se añade 1 μl de secuencias aleatorias de nucleótidos *random primers* (Promega, Estados Unidos), que se unen a las hebras sencillas de ARN y permiten que la transcriptasa inversa comience a sintetizar el ADNc. Se calienta la muestra con los *random primers* a 70 °C durante 5 minutos para facilitar su acoplamiento. Inmediatamente después se mantienen las muestras en hielo durante otros 5 minutos como mínimo. Se añaden 15 μl de la mezcla de reacción a cada una de las muestras, mantenidas siempre en hielo, y se calientan a 25 °C durante 5 minutos. Pasado este tiempo las muestras se incuban a 42 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación se inactiva la enzima calentando las muestras a 70 °C durante 15 minutos y, a continuación se diluyen añadiendo agua DEPC hasta un volumen final de 150 μl . Las muestras se pueden almacenar a -80 °C.

11.4 Amplificación del ADNc

La amplificación del ADNc tiene lugar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1986; Mullis, 1990). Este método permite amplificar secuencias de ADN de forma selectiva. Está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN a partir de una cadena simple utilizada como molde. La PCR emplea dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis, que se unen de forma específica a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN. El proceso básico de la PCR se desarrolla en tres fases que se repiten un número determinado de veces en función del gen que se desea amplificar:

- Desnaturalización: consiste en la separación de las cadenas complementarias de ADN.

- Unión o *annealing*: consiste en la unión de los oligonucleótidos específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de oligonucleótidos.
- Extensión: durante esta fase tiene lugar la síntesis de la hebra complementaria a partir del respectivo oligonucleótido.

La repetición de este ciclo un número determinado de veces da lugar a un incremento exponencial del fragmento diana del ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el número de ciclos), hasta que se alcanza un punto en el que disminuye la eficacia de la enzima y la reacción deja de ser exponencial. La PCRq-RT o PCR semi-cuantitativa a tiempo real, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, gracias al uso de sustancias con propiedades fluorescentes que únicamente emiten fluorescencia cuando el ADN se encuentra en forma de doble hebra (Kubista *et al.*, 2006).

El valor que se obtiene mediante la PCRq-RT no es la fluorescencia, sino el número de ciclos necesarios para que la amplificación sea exponencial, y se denomina ciclo umbral (Ct). Cuanto mayor sea la cantidad de ADNc de partida, menor será el valor de Ct, ya que harán falta menos ciclos para que la amplificación sea exponencial. Este método se denomina también PCR semi-cuantitativa, ya que permite conocer la expresión relativa de un gen concreto con respecto a la expresión de otro gen constitutivo que no varía con las diferentes condiciones experimentales del estudio. En nuestro caso, la sustancia fluorescente utilizada fue el *EvaGreen Supermix* (BioRad, Estados Unidos), y el gen constitutivo utilizado fue el ARNrribosómico 18S (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). El *EvaGreen supermix* contiene el tampón de reacción, la mezcla de nucleótidos y la polimerasa necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación, así como el fluoróforo que permite la detección del producto de la reacción. Para llevar a cabo la amplificación se utilizan placas de 96 pocillos, y cubiertas ópticas de adhesivo térmico para dichas placas (BioRad, Estados Unidos).

Para la amplificación se utiliza una mezcla de reacción que debe tener una concentración final de 500 nM de los oligonucleótidos que se van a utilizar como cebadores (Tabla M4). Así mismo, un 50 % de la mezcla debe ser *EvaGreen Supermix* (BioRad, Estados Unidos), y el otro 50 % debe ser una mezcla de los oligonucleótidos y

agua DEPC. En cada pocillo se cargan 2 μl de muestra y 8 μl de la mezcla de reacción, que contiene: *EvaGreen supermix* (5,0 μl); oligonucleótidos (0,5 μl) y agua DEPC (3,5 μl). Si el gen a estudiar se expresa abundantemente, como es el caso del ARN ribosómico 18 S que se utiliza como gen de referencia, es necesario hacer diluciones de las muestras (1/100). Una vez cargada la placa, se cubre la placa con una cubierta adhesiva óptica para evitar que las muestras se evaporen durante el proceso. Finalmente, se introduce la placa en el termociclador cuantitativo iQ5 (BioRad, Estados Unidos).

La expresión matemática que permite la cuantificación de la expresión de genes de cada muestra es mediante $2^{-\Delta\text{Ct}}$; siendo (Livak & Schmittgen, 2001):

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct gen de estudio} - \text{Ct gen de referencia}$$

Para emplear esta fórmula debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen de estudio sea similar al del gen de referencia. Esta comprobación se llevó a cabo mediante el análisis de un conjunto de muestras diluidas (1/10, 1/100, 1/1000) para comprobar que la curva estándar fuera lineal con una pendiente cercana a 3,4 y una $r = 0,99$, condiciones en las que la eficiencia de la amplificación está cercana al 100 %. Esto supone que durante la fase exponencial de la reacción, el aumento de un ciclo de amplificación daría lugar exactamente a la duplicación del material amplificado.

Para realizar el análisis de los datos se calcula un nuevo $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$, que permite considerar como valor de referencia 1 a uno de los grupos experimentales (por ejemplo grupo control). Para ello se suma o resta una cantidad a la expresión $2^{-\Delta\text{Ct}}$ de cada una de las muestras de modo que el promedio de la expresión $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ del grupo experimental correspondiente fuese igual a 1. A continuación, se suma o resta esa misma cantidad a los ΔCt de las muestras del otro grupo experimental con el que se compara y se calcula el promedio, que se compara con el valor de referencia 1 del otro grupo (las unidades de estos datos son arbitrarias).

12. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados de la presente Tesis Doctoral se empleó el programa informático Statistica, *Kernel release 5.5; '99 edition*. Los análisis realizados se detallan de manera específica en cada uno de los bloques experimentales de la sección de resultados.

Tabla M4. Secuencias de oligonucleótidos empleados para amplificar los receptores estudiados en la presente Tesis doctoral.

Oligonucleótidos		Secuencia 5'-3'
18 S	Sentido	CCAGTAAGTGCGGGTCATAAGC
	Antisentido	CCTCACTAAACCATCCAATCGG
c-fos	Sentido	TCCAGCACCAGGTTAATTCC
	Antisentido	AGGTCGTGGTCCAATTAAGGT
GABA _A α1	Sentido	AAAATCCTCGTGAAGAGTGG
	Antisentido	GGTCTCTCGACTATCTTTGGG
GABA _A β2	Sentido	ACTCCGAGGTCGTGTAAGCA
	Antisentido	GCTCACTCATGCCCACTGAAA
GR	Sentido	AAAGCCTCCCTCTGCTAACC
	Antisentido	CACCCATGATCCTGTCAGTG
MR	Sentido	ATCCACGTCTCATGGCTTTC
	Antisentido	TAAGTTTCCCCACGTGGTTC
ADRβ1	Sentido	GCAGAACCAGTCTCACAGCTAA
	Antisentido	CGCCTTTCTACCTCTAGTGCAT
ADRβ2	Sentido	CTCCTTAACTGGTTGGGCTATG
	Antisentido	TCCCATAGGTTTTCGAAGAAGA
CB1	Sentido	AAGGACCTGAGACATGCTTTC
	Antisentido	CAGTCTGAGTCCCCCATGCT

RESULTADOS

BLOQUE EXPERIMENTAL I

Actividad de la corteza infralímbica y modulación de la respuesta a estrés: estudio del eje HHA y la memoria aversiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.

I. Introducción

La CPF juega un papel esencial en la regulación del eje HHA y por tanto en la liberación de corticosterona (cortisol en humanos) en respuesta a estrés (Diorio *et al.*, 1993; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Estudios previos en roedores sugieren que la región dorsal (prelímbica) y la región ventral (infralímbica) de la CPF medial ejercen un control opuesto sobre la actividad del eje HHA y sobre los niveles de corticosterona plasmática en respuesta a estrés (Radley *et al.*, 2006; McKlveen *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de estos estudios, farmacológicos y de lesiones, se centran en el papel de la región dorsal de la CPF o no distinguen entre ambas regiones de la corteza (Sullivan & Gratton, 1999; Weinberg *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2012b), y por tanto, no se conoce con certeza el papel de la corteza infralímbica sobre la regulación del eje HHA en respuesta a estrés. La alteración en la función de corteza infralímbica (CPF medial ventral en humanos) se ha relacionado con respuestas maladaptativas a estrés y patologías psiquiátricas como la esquizofrenia y el TEPT (Yehuda, 2009; Lehmann & Herkenham, 2011; McKlveen *et al.*, 2015)

La corteza infralímbica también contribuye a la adaptación a estrés, modulando el aprendizaje y la memoria emocional (Jinks & McGregor, 1997; Quirk & Mueller, 2008). Numerosos estudios han descrito el papel de la corteza infralímbica en el proceso de extinción de la memoria de condicionamiento a miedo (Milad & Quirk, 2002; Mueller *et al.*, 2008), sin embargo, pocos estudios han investigado el papel de esta región cerebral en la adquisición de memorias aversivas; y los existentes describen resultados controvertidos (Morgan & LeDoux, 1995; Jinks & McGregor, 1997).

Estudios experimentales han mostrado que animales mantenidos en condiciones de EA muestran una menor reactividad a estrés (Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001; Segovia *et al.*, 2008b; Sztainberg *et al.*, 2010) y que estos efectos están

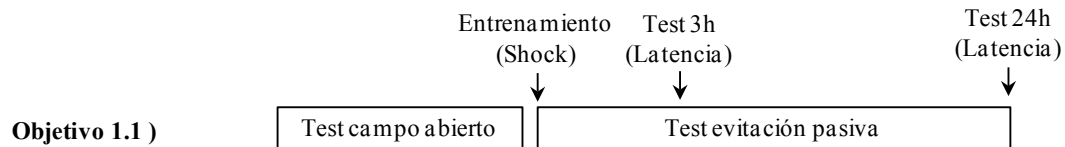
mediados, en parte, por cambios en la actividad del eje HHA y por tanto, en la liberación de corticosterona (Moncek *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2013). Estudios realizados en nuestro laboratorio y por otros investigadores sugieren que los cambios en la actividad de la CPF, presumiblemente de la corteza infralímbica están implicados en la mejor adaptación a estrés de los animales mantenidos en condiciones de EA (Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Lehmann & Herkenham, 2011).

El presente bloque experimental estudia los efectos de la estimulación y la inhibición de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática basal y estimulada por estrés de corticosterona y sobre la adquisición de memoria aversiva en un test de evitación pasiva. Además, estudia si el mantenimiento de los animales en condiciones de EA cambia la función de la corteza infralímbica sobre los parámetros anteriormente citados. Con este objetivo, se llevan a cabo inyecciones locales de picrotoxina, antagonista GABA_A, y de muscimol, agonista GABA_A, para estimular e inhibir, respectivamente, la actividad de la corteza infralímbica. Los objetivos concretos del bloque experimental I son:

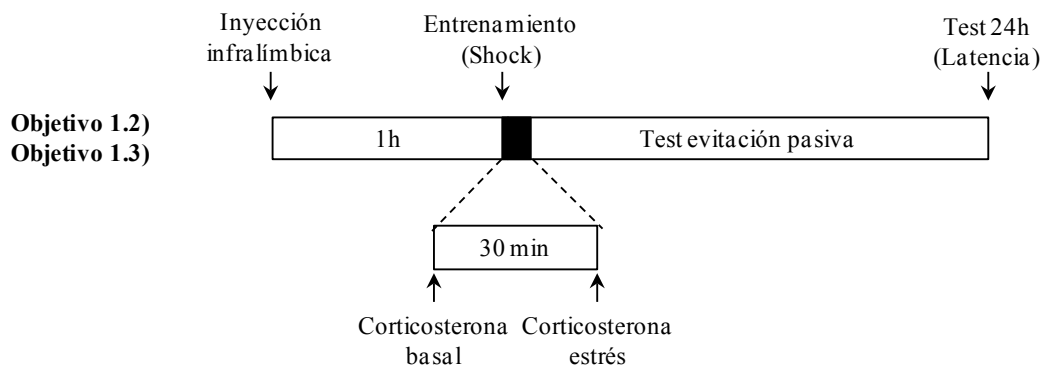
- 1.1 Análisis de la actividad motora espontánea en un campo abierto y de la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.
- 1.2 Estudio del efecto de la inhibición de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.
- 1.3 Estudio del efecto de la estimulación de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales mantenidos en condiciones control y de EA.
- 1.4 Análisis de la expresión de ARNm del gen de activación celular c-fos y del receptor GABA_A en la corteza infralímbica en animales mantenidos en condiciones control y de EA.

II. Diseño experimental

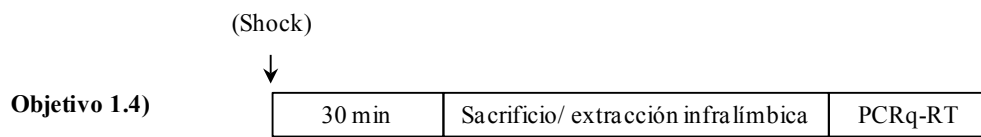
Todos los animales utilizados en este bloque experimental fueron divididos inicialmente en dos grupos experimentales: control y EA (ver apartado 1 de material y métodos) y se mantuvieron en estas condiciones durante 2 meses. A continuación se llevaron a cabo los experimentos en función de los objetivos concretos, como se muestra en la siguiente Figura R1.



- El Test 3h y Test 24h emplearon dos grupos de animales distintos.
- Shock: Test 3h (0,3 mA, 2s); Test 24h (0,6 mA, 2s)
- Los animales del Test 24h se re-expusieron a los 7 días.



- Inyección (0,25 μ l/minuto): muscimol (0,25 μ g), picrotoxina (0,20 μ g)
- Shock: (0,6 mA, 2s).



- Shock (0,6 mA, 2s)

III. Análisis estadístico

Los datos de actividad motora espontánea en campo abierto se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías con dos factores (Grupo x Tiempo) con medidas repetidas y un análisis de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Los efectos de las inyecciones locales en la corteza infralímbica de muscimol y picrotoxina sobre la concentración plasmática de corticosterona basal y estimulada por estrés se analizaron mediante un ANOVA de tres vías con tres factores (Grupo x Tratamiento x Tiempo) con medidas repetidas y un análisis de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Los efectos del muscimol y picrotoxina se analizaron por separado, siendo el grupo de vehículo igual el mismo grupo en ambos casos. Los datos de la latencia de entrada durante el entrenamiento y a las 3h y 24 h se analizaron mediante un análisis no paramétrico *U* de Mann-Whitney. Los efectos de las inyecciones locales en la corteza infralímbica de muscimol y picrotoxina sobre la latencia de entrada durante el entrenamiento y a las 24 h se analizaron mediante un análisis no paramétrico *U* de Mann-Whitney (analizando los efectos del muscimol picrotoxina por separado). Los datos de expresión de ARNm en la corteza infralímbica se analizaron mediante un test *t* de Student.

IV. Resultados

1.1 Actividad motora espontánea en un campo abierto y de la latencia de entrada en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.

Actividad motora

La Figura R2 muestra el perfil temporal de la actividad motora horizontal (A), y la actividad motora vertical (B) en animales control y mantenidos en EA.

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad horizontal mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,93}= 48,70$; $p < 0,001$) y del factor Tiempo ($F_{1,1023}=147,59$; $p < 0,001$), así como una interacción entre ambos factores ($F_{1,1023}= 12,55$; $p < 0,001$). El análisis de comparaciones planeadas mostró un incremento significativo de la actividad durante los 5 primeros minutos del test ($F_{1,93}= 10,51$; $p= 0,002$) comparado con el grupo control (Figura R2A)

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad vertical mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,92}= 11,95$; $p < 0,001$) y del factor Tiempo ($F_{11,1012}= 107,43$; $p < 0,001$), así como una interacción entre ambos factores ($F_{11,1012}= 5,13$; $p < 0,001$). El análisis de comparaciones planeadas mostró un incremento significativo de la actividad motora vertical durante los 5 primeros minutos del test ($F_{1,92}=5,62$; $p= 0,019$) comparado con el grupo control. (Figura R2B)

Test de evitación pasiva

La figura R4 muestra la latencia durante la fase de entrenamiento, a las 3 horas (A) y a las 24 horas (B) en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.

El test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas en la latencia durante el entrenamiento ($Z= 1,68$; $p= 0,092$) entre animales control y mantenidos en EA. El entrenamiento (shock eléctrico en las patas; 0,3 mA, 2 s) produjo un incremento significativo de la latencia durante el Test 3 h en animales control ($Z= -3,70$; $p < 0,001$)

y mantenidos en EA ($Z = -2,49$; $p = 0,013$) que no fue diferente entre ambos grupos ($Z = 0,92$; $p = 0,361$) (Figura R4A).

El test de Man-Whitney no mostró diferencias significativas en la latencia durante el entrenamiento ($Z = 0,28$; $p = 0,782$) entre animales control y mantenidos en EA. El entrenamiento (shock eléctrico en las patas; 0,6 mA, 2s) produjo un incremento significativo de la latencia durante el Test 24 h en animales control ($Z = -3,60$; $p < 0,001$) y mantenidos en EA ($Z = -3,35$; $p < 0,001$) que no fue diferente entre ambos ($Z = 0,12$; $p = 0,902$). Añadido a ello, el test mostró una reducción (no significativa) de la latencia durante la re-exposición en el Test a los 7 días en los animales mantenidos en EA ($Z = 1,89$; $p = 0,058$) que no fue diferente entre ambos grupos de animales ($Z = -1,54$; $p = 0,124$) (Figura R4B).

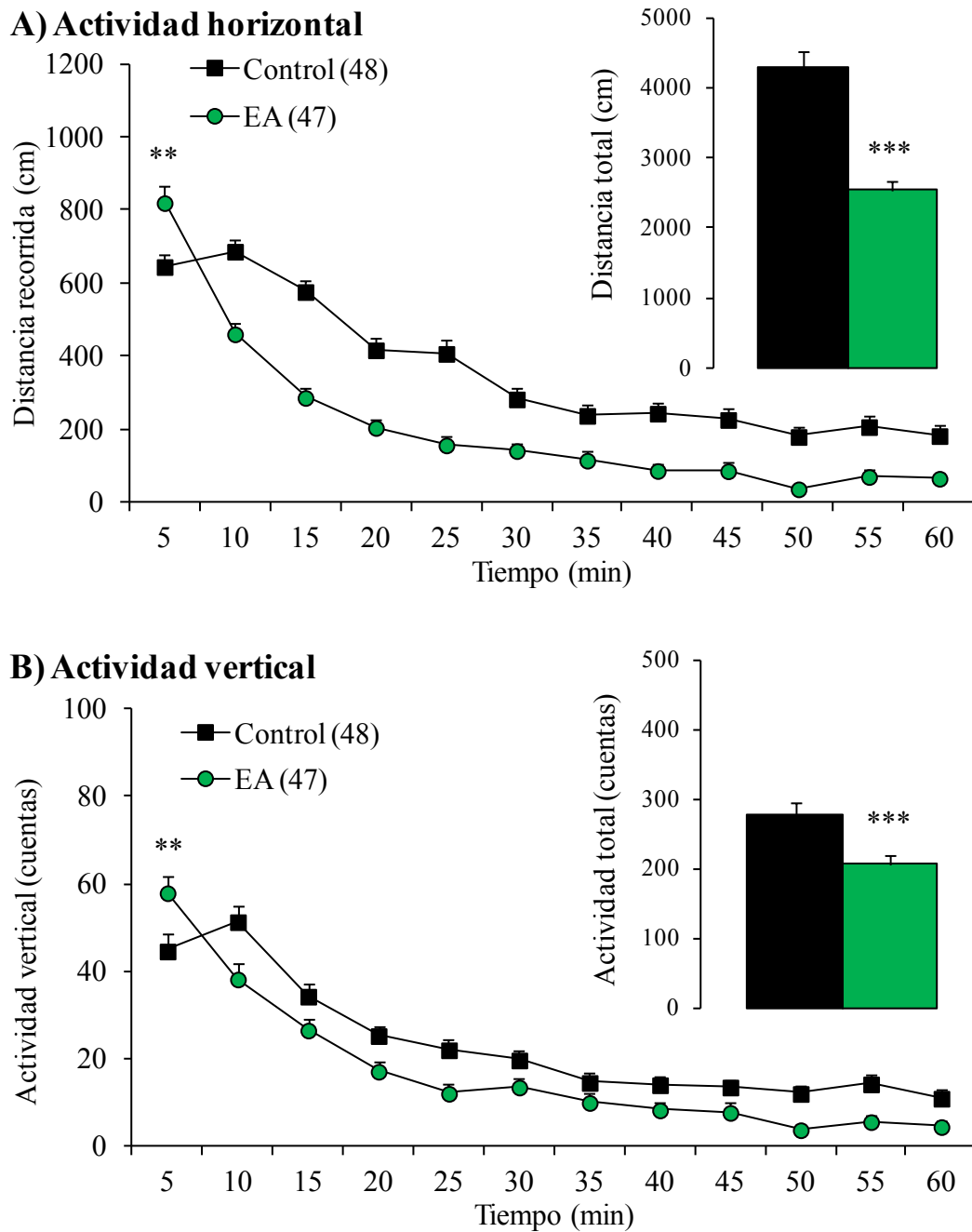


Figura R2. Actividad motora espontánea en animales control y mantenidos en EA. Perfil temporal de la actividad horizontal, y agregado la actividad horizontal total durante los 60 minutos del test (barras) (A). Perfil temporal de la actividad vertical y agregado la actividad vertical total durante los 60 minutos del test (barras) (B). Los datos (media \pm EEM) se muestran como distancia recorrida en centímetros (cm) (A) y número de cuentas (B). El número de animales se muestran en paréntesis. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control.

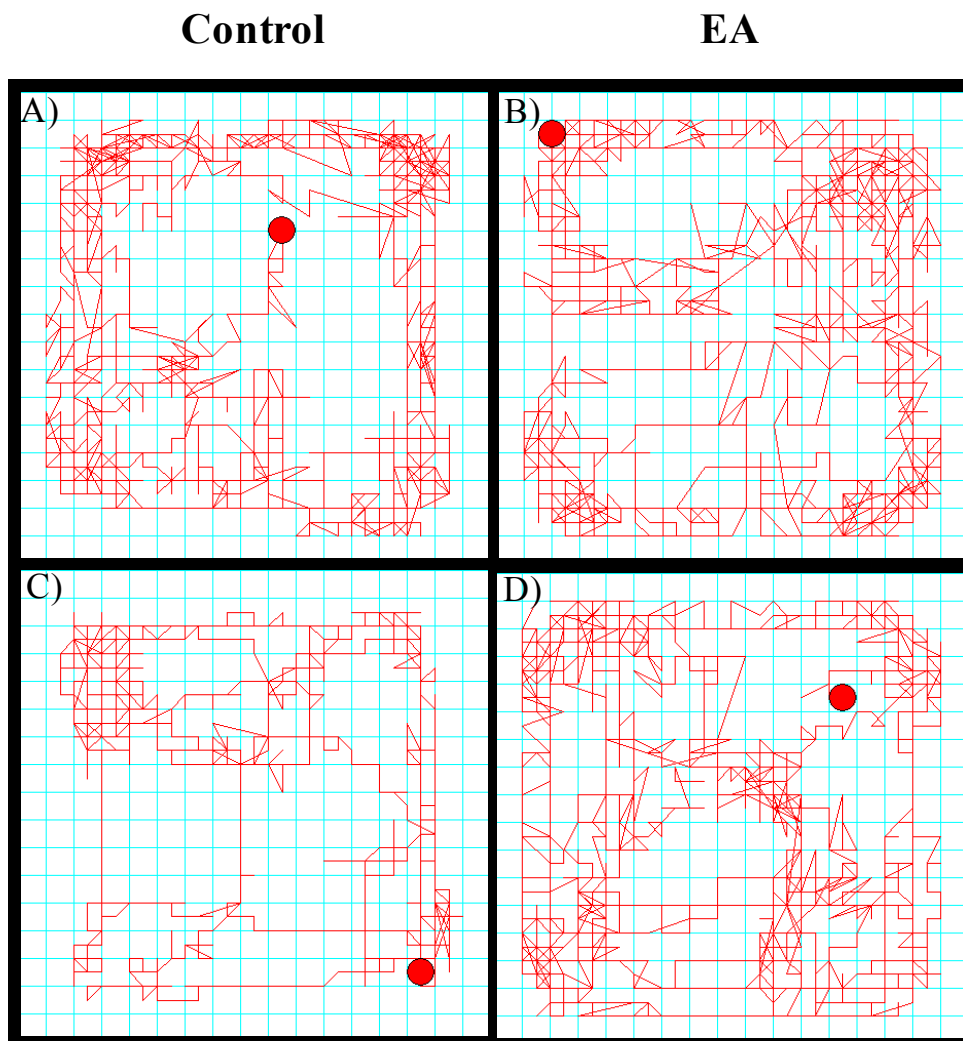
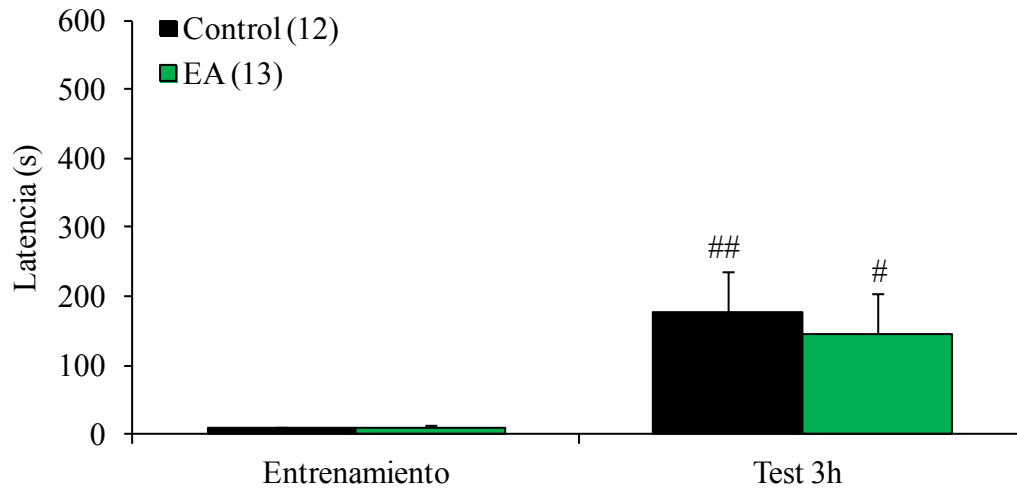


Figura R3. Ejemplos representativos de la actividad motora durante los 5 primeros minutos en el campo abierto de animales correspondientes al grupo control (A y C) y al grupo de EA (B y D).

A) Test de evitación pasiva (a corto plazo)



B) Test de evitación pasiva (a largo plazo)

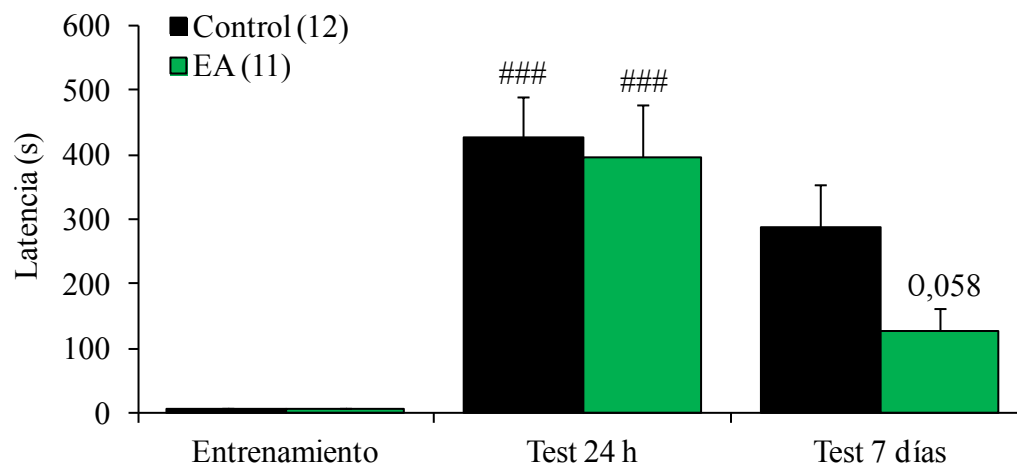


Figura R4. Test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA. Latencia de entrada durante entrenamiento y Test 3 h (A) y latencia de entrada durante entrenamiento y durante Test 24 h y 7 días (B). Los datos (media \pm EEM) se muestran como latencia en segundos (s). El número de animales se muestra en paréntesis. [#]p < 0,05; ^{##}p < 0,01 y ^{###}p < 0,001 comparado con la latencia en la fase de entrenamiento.

1.2 Efecto de la inhibición de la actividad de la corteza infralímbica sobre la concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.

Las Figuras R5 y R6 muestran los efectos de la inhibición de la actividad de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de muscimol, agonista de receptores GABA_A, sobre la concentración basal y estimulada por estrés de corticosterona (Figura R5) y sobre la latencia en un test de evitación pasiva (Figura R6) en animales control y mantenidos en EA.

Corticosterona

El ANOVA de tres vías para el análisis del efecto de la inyección de muscimol mostró un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{1,40}= 4,12$; $p= 0,049$) y del factor Tiempo ($F_{1,40}=8,12$; $p= 0,006$), pero no del factor Grupo ($F_{1,40}= 0,29$; $p=0,593$). Además mostró una tendencia de interacción no significativa entre el factor Tratamiento y el factor Grupo ($F_{1,40}= 3,58$; $p= 0,066$).

Respecto a los efectos del estrés en los animales tratados con vehículo, el análisis más detallado de comparaciones mostró un incremento significativo de los niveles de corticosterona tanto en el grupo control ($F_{1,40}= 8,03$; $p=0,007$) como en el grupo EA ($F_{1,40}= 6,25$; $p= 0,016$) no observándose diferencias entre ambos grupos de animales ($F_{1,40}= 0,285$; $p= 0,597$). Por otra parte, el análisis no mostró diferencias significativas en los niveles basales de corticosterona plasmática en animales control y mantenidos en EA ($F_{1,40}= 0,30$; $p= 0,587$).

Respecto a los efectos del tratamiento, el análisis de comparaciones planeadas de los efectos del muscimol no mostró diferencias significativas en los niveles basales de corticosterona en animales control ($F_{1,40}= 0,12$; $0,729$) ni mantenidos en EA ($F_{1,40}= 1,10$; $p= 0,302$), comparado con los grupos tratados con vehículo. Sin embargo, la inyección de muscimol redujo significativamente la concentración de corticosterona estimulada por estrés en el grupo de animales control ($F_{1,40}= 4,25$; $p= 0,048$) pero no en el grupo mantenidos en EA ($F_{1,40}= 0,32$; $p= 0,576$) (Figura R5).

Test de evitación pasiva

El test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas en la latencia durante la fase de entrenamiento entre animales control y mantenidos en EA ($Z = -0,21$; $p = 0,836$). El entrenamiento (shock eléctrico en las patas) produjo un incremento significativo de la latencia durante el test 24h en animales control ($Z = -2,63$; $p = 0,009$) y mantenidos en EA ($Z = -3,78$; $p < 0,001$) que no fue diferente entre ambos grupos de animales ($Z = 1,15$; $p = 0,248$).

El test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas del efecto de la inyección local de muscimol en la corteza infralímbica sobre la latencia durante la fase de entrenamiento en animales control ($Z = 0,73$; $P = 0,464$) y mantenidos en EA ($Z = 0,15$; $p = 0,877$) comparado con sus respectivos grupos tratados con vehículo. La inyección local de muscimol redujo significativamente la latencia en el Test 24h en el grupo mantenido en EA ($Z = 2,11$; $p = 0,034$), pero no se observaron diferencias significativas en la latencia en el Test 24h entre ambos grupos de animales ($Z = -0,27$; $p = 0,786$) (Figura R6).

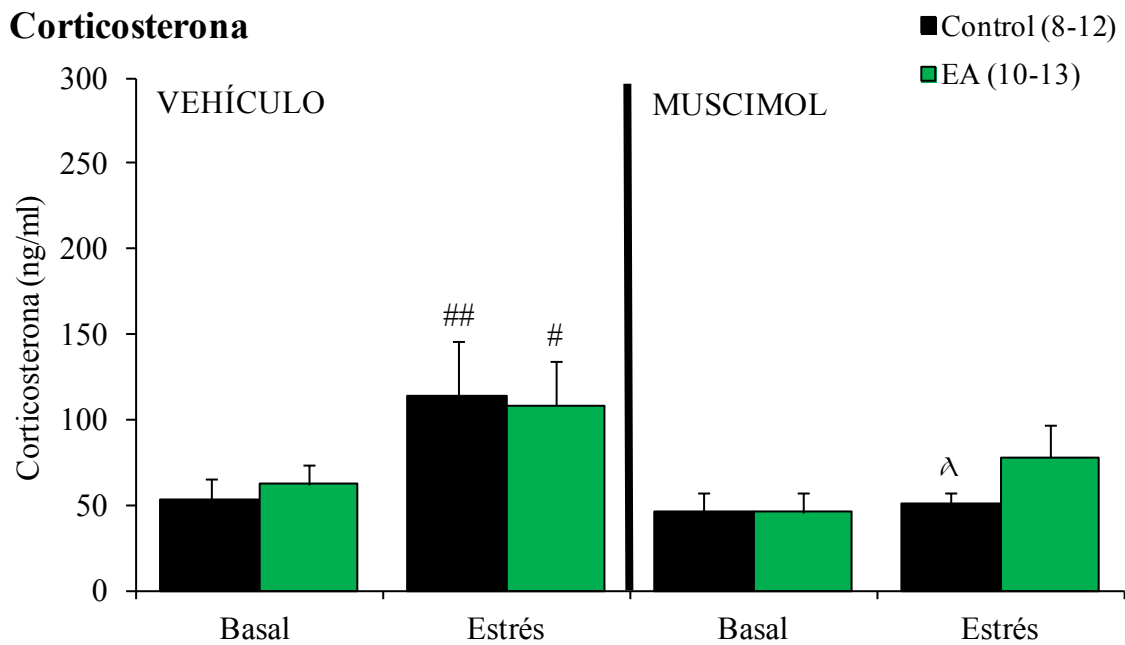


Figura R5. Efecto de la inyección de muscimol en la corteza infralímbica de animales control y mantenidos en EA sobre la concentración plasmática basal y estimulada por estrés de corticosterona. Los datos (media \pm EEM) se muestran en ng/ml. El número de animales se muestra en paréntesis. [#]p < 0,05; ^{##}p < 0,01 comparado con concentración basal y [^]p < 0,05 comparado con vehículo.

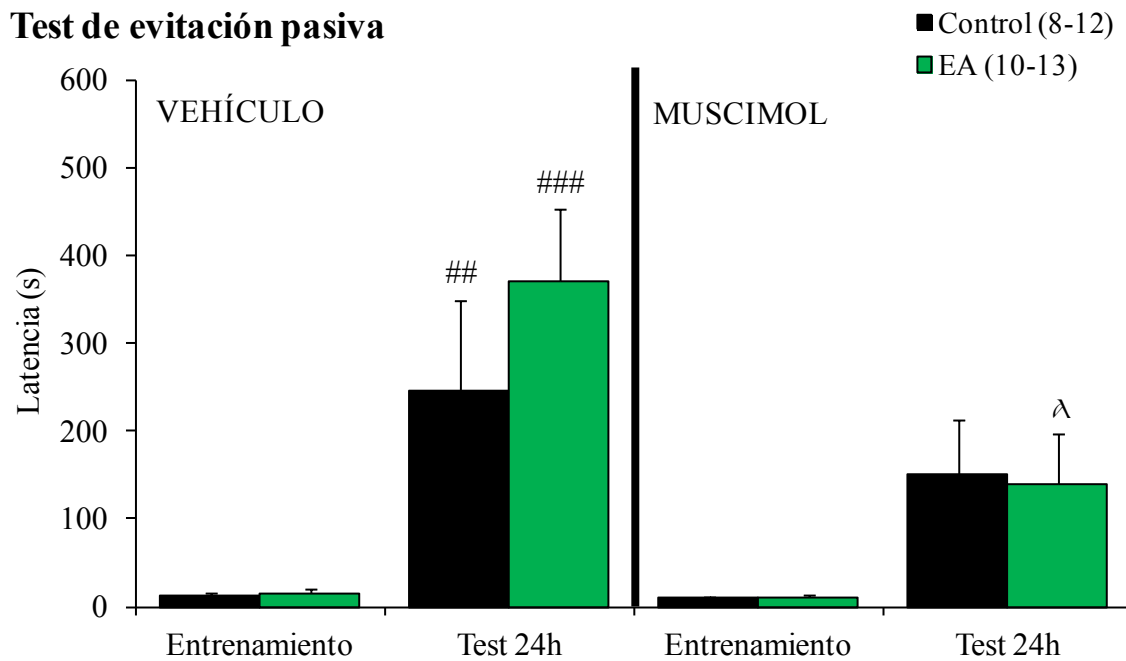


Figura R6. Efecto de la inyección de muscimol en la corteza infralímbica de animales control y mantenidos en EA sobre la latencia de entrada en un test de evitación pasiva. Los datos (media \pm EEM) muestran la latencia en segundos (s). El número de animales se muestra en paréntesis. ^{##} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$ comparado con la latencia de entrenamiento y [^] $p < 0,05$ comparado con la latencia del Test 24 h del vehículo.

1.3 Efecto de la estimulación de la actividad de la corteza infralímbica sobre concentración plasmática de corticosterona y la memoria aversiva en un test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA.

Las Figuras R7 y R8 muestran los efectos de la estimulación de la actividad de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de picrotoxina, antagonista de receptores GABA_A, sobre la concentración basal y estimulada por estrés de corticosterona (Figura R7) y sobre la latencia en un test de evitación pasiva (Figura R8), en animales control y mantenidos en EA.

Corticosterona

El ANOVA de 3 vías para el análisis del efecto de la inyección de picrotoxina mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,35} = 7,53$; $p = 0,010$) y del factor Tratamiento ($F_{1,35} = 9,79$; $p = 0,004$), pero no del factor Tiempo ($F_{1,35} = 0,01$; $p = 0,928$). Además, mostró una interacción significativa entre los factores Grupo y Tratamiento ($F_{1,35} = 7,01$; $p = 0,013$) y entre los factores Tratamiento y Tiempo ($F_{1,35} = 6,98$; $p = 0,012$).

Respecto al efecto del tratamiento, el análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró que la picrotoxina produjo un incremento significativo de los niveles basales ($F_{1,35} = 7,38$; $p = 0,010$) y estimulados por estrés ($F_{1,35} = 9,80$; $p = 0,004$) de corticosterona en animales mantenidos en EA, comparado con el grupo de animales control. Además, el análisis no mostró diferencias significativas en los niveles basales de corticosterona en animales control ($F_{1,35} = 1,96$; $p = 0,171$) pero si mostró un incremento significativo en animales mantenidos en EA ($F_{1,35} = 16,70$; $p < 0,001$); comparados con sus respectivos grupos tratados con vehículo. La inyección local de picrotoxina en la corteza infralímbica no modificó los niveles de corticosterona plasmática estimulada por estrés en animales control ($F_{1,35} = 3,60$; $p = 0,066$) ni mantenidos en EA ($F_{1,35} = 3,38$; $p = 0,074$), comparados con sus respectivos grupos tratados con vehículo.

Test de evitación pasiva

El test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas del efecto de la inyección local de picrotoxina en la corteza infralímbica sobre la latencia durante la fase de entrenamiento en animales control ($Z= 0,62$; $p= 0,534$) ni mantenidos en EA ($Z= 0,46$; $p= 0,647$) comparado con sus respectivos grupos tratados con vehículo. La inyección de picrotoxina no modificó la latencia durante el Test 24h en animales control ($Z= -0,89$; $p= 0,374$) ni mantenidos en EA ($Z= -0,35$; $p= 0,725$) comparado con sus respectivos grupos tratados con vehículo. El enriquecimiento no modificó los efectos de la picrotoxina sobre la latencia del Test 24h ($Z= 1,17$; $p= 0,239$) comparado con animales control.

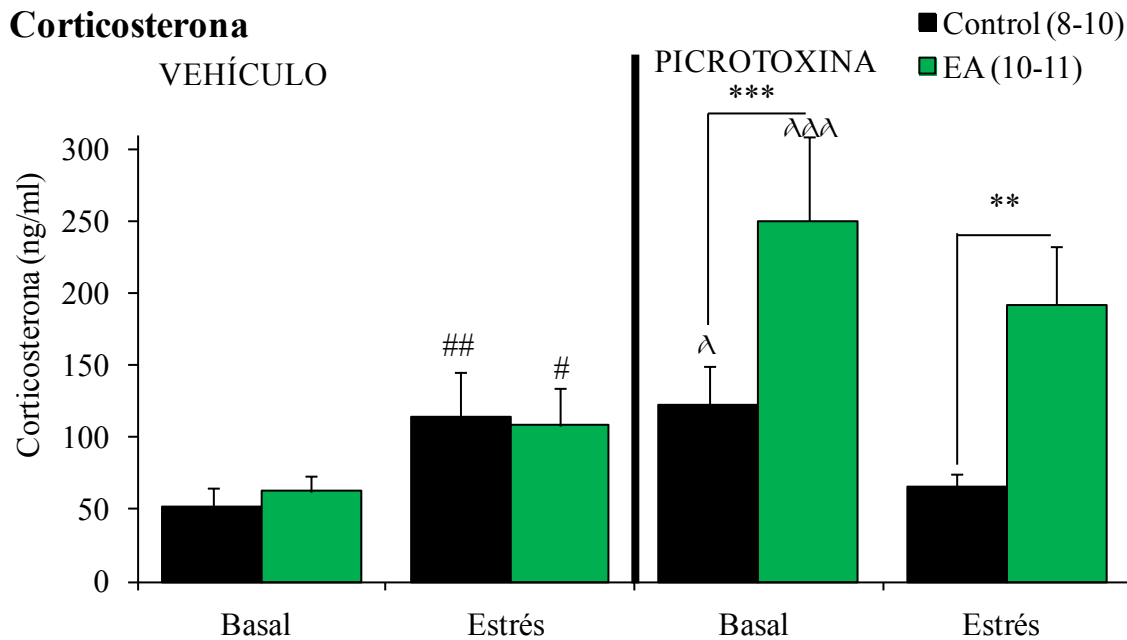


Figura R7. Efecto de la inyección de picROTOXINA en la corteza infralímbica de animales control y mantenidos en EA sobre la concentración plasmática basal y estimulada por estrés de corticosterona. Los datos (media \pm EEM) se muestran en ng/ml. El número de animales se muestra en paréntesis. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ comparado con concentración basal; ^ $p < 0,05$; ^^^ $p < 0,001$ comparado con vehículo basal; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control.

Test de evitación pasiva

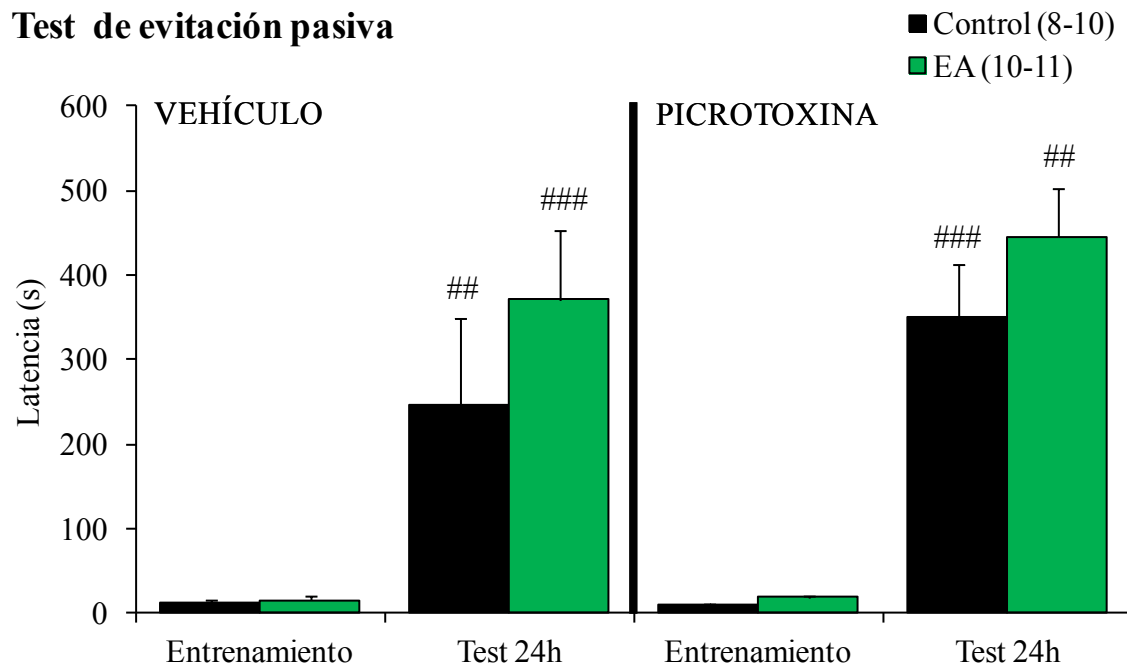


Figura R8. Efecto de la inyección de picrotoxina en la corteza infralímbica de animales control y mantenidos en EA sobre la latencia de entrada en un test de evitación pasiva. Los datos (media \pm EEM) muestran la latencia en segundos (s). El número de animales se muestra en paréntesis. [#]p < 0,05; ^{##}p < 0,01; ^{###}p < 0,001 comparado con latencias de entrenamiento.

1.4 Expresión de ARNm del gen de activación celular c-fos y del receptor GABA_A en la corteza infralímbica en animales mantenidos control y mantenidos en EA.

La Tabla R1 muestra los datos de PCRq-RT de los cambios producidos por un estrés agudo en los niveles de ARNm de c-fos y de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ del receptor GABA_A en la corteza infralímbica de animales control y mantenidos en EA.

El test *t* de Student no mostró diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles de ARNm de c-fos ($t_{1,9} = -0,63$; $p = 0,54$); GABA_A $\alpha 1$ ($t_{1,8} = 0,31$; $p = 0,76$) y GABA_A $\beta 2$ ($t_{1,8} = 0,83$; $p = 0,43$).

Tabla R1. Expresión de ARNm del gen de activación celular c-fos y de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ del receptor de GABA_A en la corteza infralímbica de animales controles y mantenidos en EA, 30 minutos tras recibir un shock eléctrico (0,6 mA, 2s). Los datos (media \pm EEM) se muestran en unidades arbitrarias (ua). El número de animales se muestra en paréntesis.

	c-fos	$\alpha 1$	$\beta 2$
CONTROL (5-6)	1,00 \pm 0,46 ua	1,00 \pm 0,25 ua	1,00 \pm 0,30 ua
EA (5-6)	1,47 \pm 0,54 ua	0,86 \pm 0,29 ua	0,69 \pm 0,22 ua

V. Discusión

Los resultados más relevantes obtenidos en el bloque experimental I fueron los siguientes:

- 1) El EA redujo la actividad motora espontánea en el test de campo abierto, aunque no modificó la adquisición de la memoria aversiva a las 3 y las 24 horas tras recibir un shock eléctrico durante el entrenamiento en un test de evitación pasiva.
- 2) La inhibición de la corteza infralímbica redujo el incremento de corticosterona estimulado por estrés y de memoria aversiva en el test de evitación pasiva.
- 3) La estimulación de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de picrotoxina incrementó la concentración plasmática basal de corticosterona. El EA potenció el incremento de los niveles basales de corticosterona inducidos por la inyección de picrotoxina.

Estos resultados sugieren que la corteza infralímbica es necesaria para la activación del eje HHA en respuesta a un estrés agudo moderado y para la formación de memorias aversivas y que el EA potencia el control ejercido por la corteza infralímbica sobre el eje HHA.

Actividad motora y memoria aversiva: efectos del EA.

Como se muestra en la sección de resultados el EA redujo la actividad motora espontánea en el campo abierto. Este resultado confirma estudios previos de este laboratorio y otros que sugieren una habituación más rápida de los animales mantenidos en condiciones de EA frente ambientes novedosos (Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Elliott & Grunberg, 2005; Del Arco *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2008a, 2008b; Garrido *et al.*, 2013). Esta habituación más rápida ha sido relacionada con un incremento en la eficacia exploratoria en estos animales debido a la posibilidad de explorar ambientes novedosos de forma habitual, dado las condiciones ambientales en las que son mantenidos (Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002). El incremento en la actividad motora horizontal y vertical observada en los 5 primeros minutos del test de campo abierto en los animales mantenidos en EA fuerzan el apoyo a esta hipótesis y concuerdan con resultados previos mostrados en estudios de nuestro

laboratorio y otros empleando diversos test de conducta (Zimmermann *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2013) y que sugieren además, un aprendizaje más efectivo.

Papel de la corteza infralímbica en la regulación eje HHA.

Estudios previos han mostrado resultados inconsistentes respecto al papel de la CPF medial en la regulación de los niveles de corticosterona en condiciones basales (Sullivan & Gratton, 1999; Weinberg *et al.*, 2010), probablemente debido al hecho de que en estos estudios no hay una clara diferenciación entre las regiones prelímbica e infralímbica de la CPF medial. Como se muestra en la sección de resultados, la estimulación de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de picrotoxina incrementó la concentración basal de corticosterona en ambos grupos de animales, control y EA. Teniendo en cuenta que la picrotoxina incrementa la actividad de neuronas corticales en la CPF (Weinberg *et al.*, 2010), nuestros resultados sugieren que la corteza infralímbica ejerce una regulación positiva sobre el eje HHA a través de la activación de proyecciones corticales indirectas sobre el núcleo paraventricular del hipotálamo (Radley *et al.*, 2006, 2009). A diferencia de la picrotoxina, la inhibición de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de muscimol no modificó la concentración basal de corticosterona, lo cual indica que la corteza infralímbica no regula tónicamente el eje HHA. Dado el potente efecto que la picrotoxina tiene sobre las concentraciones basales de corticosterona (pre-estrés), es difícil obtener una conclusión respecto al papel de la estimulación de la corteza infralímbica durante el periodo de estrés. Sin embargo, la inhibición de la corteza infralímbica mediante inyecciones locales de muscimol redujo el incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona inducidos por estrés en animales control y mantenidos en EA. Por tanto, los resultados indican que la corteza infralímbica tiene un papel facilitador de la actividad del eje HHA, potenciando la liberación de corticosterona mediada por un estrés agudo.

Los resultados descritos están en consonancia con estudios previos en los que se muestran que la lesión de la corteza infralímbica atenúa los niveles de corticosterona inducidos por estrés (Radley *et al.*, 2006) Es interesante destacar que un estudio previo de nuestro laboratorio usando el mismo protocolo experimental ha mostrado que la estimulación de la corteza prelímbica reduce los niveles de corticosterona en respuesta a estrés agudo (Garrido *et al.*, 2012b). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de

que la cortezas prelímbica e infralímbica tienen un papel contrapuesto en la regulación del eje HHA en respuesta a estrés (Radley *et al.*, 2006; Ulrich-Lai & Herman, 2009; McKlveen *et al.*, 2015) a través de proyecciones indirectas y diferenciadas desde las cortezas prelímbica e infralímbica sobre el núcleo paraventricular del hipotálamo (Radley *et al.*, 2006, 2009).

El mantenimiento de los animales en condiciones de EA potenció el efecto de la picrotoxina sobre las concentraciones basales de corticosterona. Estos resultados sugieren que el EA incrementa la capacidad de la corteza infralímbica de controlar el eje HHA y liberar corticosterona. Sin embargo, este resultado no se debe a la modificación de la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ del receptor GABA_A, que componen la combinación más abundante del receptor GABA_A en el cerebro de la rata (McKernan & Whiting, 1996; Farrar *et al.*, 1999). Alternativamente, un aumento en la excitabilidad cortical podría explicar la mayor activación de la corteza infralímbica en animales mantenidos en EA. De hecho, estudios previos han mostrado una correlación positiva entre la excitabilidad cortical y la activación de la CPF (Mueller *et al.*, 2008; Kaczorowski *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2012).

Recientemente, nuestro laboratorio y otros han mostrado que los animales mantenidos en EA son menos reactivos frente a estrés (Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2013; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006). Los resultados del presente trabajo de investigación, sugieren que el incremento en la capacidad de la corteza infralímbica de estimular al eje HHA es un posible mecanismo implicado en la mejor adaptación a estrés de los animales enriquecidos. En apoyo de esta posibilidad, se ha mostrado que una menor reactividad conductual a estrés está relacionada con una mayor actividad de la CPF en un modelo de estrés controlado frente a estrés no controlado (Amat *et al.*, 2005; Baratta *et al.*, 2007). Además, un estudio reciente ha mostrado que el EA incrementa la resistencia de los animales frente a estrés social mediante el incremento de la actividad de proyecciones eferentes desde la corteza infralímbica hacia otras áreas límbicas (Lehmann & Herkenham, 2011). En línea con estos resultados, se ha mostrado que un incremento en la excitabilidad de la CPF está asociada con un incremento en la facilitación del proceso de extinción de la memoria (Mueller *et al.*, 2008; Kaczorowski *et al.*, 2012), lo cual encajaría con los resultados que muestran una menor latencia de entrada en el test de evitación pasiva tras la re-

exposición 7 días después del entrenamiento en los animales mantenidos en EA (Figura R4B).

Modulación de la memoria emocional por la corteza infralímbica

La inyección de muscimol en la corteza infralímbica redujo la latencia de entrada 24 horas después del entrenamiento (shock eléctrico) en el test de evitación pasiva en animales control y mantenidos en EA, lo cual indica que la corteza infralímbica facilita la adquisición de la memoria aversiva. La estimulación de la corteza infralímbica con picrotoxina no incrementó la latencia a las 24 horas tras el shock, sugiriendo un posible efecto techo en el efecto facilitador de la corteza infralímbica en las condiciones experimentales del estudio. Estos resultados, junto a estudios previos de nuestro laboratorio mostrando que la corteza prelímbica inhibe la adquisición de la memoria aversiva (Garrido *et al.*, 2012b) apoyan la idea de un papel complementario de las regiones pre- e infralímbica en el procesamiento de la memoria emocional (Quirk & Mueller, 2008). Nuestros resultados están en concordancia con otros estudios de lesiones en la región infralímbica que muestran una reducción en la latencia de entrada usando el mismo test para evaluar la memoria aversiva (Jinks & McGregor, 1997). Es interesante destacar que las inyecciones de muscimol en la corteza infralímbica redujeron tanto la concentración plasmática de corticosterona incrementada por estrés como la latencia de entrada en el test de evitación pasiva lo cual sugiere que ambos efectos podrían estar relacionados (ver Garrido *et al.*, 2012b). Diversos estudios han mostrado una correlación positiva entre la concentración de corticosterona y la formación de memoria aversiva (Roosendaal *et al.*, 2009a). De acuerdo a estos estudios, la corteza infralímbica facilitaría la formación de la memoria aversiva, en parte, estimulando el incremento de la concentración de corticosterona.

El EA no modificó significativamente la adquisición de la memoria aversiva a corto y largo plazo (3 y 24 horas respectivamente), ni tras la inyección de picrotoxina o muscimol. Estos resultados encajan con los resultados obtenidos del análisis de la expresión de c-fos (marcador de actividad neuronal). Como se muestra en la tabla 1, el EA no modificó la expresión de este marcador en la corteza infralímbica 30 minutos tras recibir un shock eléctrico. Sin embargo, los resultados obtenidos contrastan con estudios previos que muestran un incremento de esta memoria emocional en ratones

mantenidos en condiciones de EA (Leger *et al.*, 2012a; Kazlauckas *et al.*, 2011). Sin embargo este último estudio sólo encuentra diferencias cuando los animales mantenidos en EA fueron agrupados en función de su respuesta baja o alta frente a estrés; por tanto sería interesante realizar futuros experimentos para comprobar los efectos del EA sobre la memoria aversiva en función de la variabilidad de la respuesta a estrés en los animales mantenidos en estas condiciones.

Consideraciones finales

El presente bloque experimental constituye el primer estudio que muestra concretamente que la estimulación/inhibición de la corteza infralímbica modula los niveles basales y en respuesta a estrés de corticosterona plasmática y también en la formación de memoria aversiva. Estudios en humanos y animales de experimentación han relacionado la reducción de la actividad de la corteza infralímbica (CPF ventral-medial en humanos) con una respuesta mal-adaptativa a estrés (Pitman *et al.*, 2012; Likhtik & Paz, 2015). En este contexto, los resultados presentados en este bloque experimental apoyan la hipótesis de que la región ventral de la CPF contribuye en la susceptibilidad a estrés mediante alteraciones en la regulación del eje HHA y en el procesamiento emocional de la memoria.

BLOQUE EXPERIMENTAL II

Disfunción de la CPF medial y modulación de la respuesta a estrés: efecto del bloqueo de receptores NMDA en la CPF sobre la liberación de noradrenalina y corticosterona en amígdala y sobre la memoria aversiva.

I. Introducción

Dado el papel de CPF medial en la regulación de la respuesta a estrés (Amat *et al.*, 2005; Ulrich-Lai & Herman, 2009), se ha propuesto que la alteración en la función de la CPF puede ser la base de una respuesta mal-adaptativa a estrés (Moghaddam, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Van Os *et al.*, 2010; Fusar-Poli *et al.*, 2011). Estudios clínicos han descrito una reactividad exacerbada en respuesta a estrés en pacientes diagnosticados con esquizofrenia y en individuos denominados de alto riesgo (Soliman *et al.*, 2008; Van Winkel *et al.*, 2008; Brunelin *et al.*, 2010; Mizrahi *et al.*, 2012; Devylder *et al.*, 2013); y se ha sugerido una relación entre la función alterada de la CPF y una mayor sensibilidad frente al estrés que pueden facilitar el desarrollo de psicosis (Corcoran *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Van Os *et al.*, 2010; Moghaddam, 2013).

La respuesta a estrés implica la activación de circuitos cortico-límbicos en los que se incluyen la CPF y la amígdala. De hecho, se ha descrito que la manipulación farmacológica de la CPF modula tanto la actividad neuronal de la amígdala como la activación del eje HHA en respuesta a estrés (Weinberg *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2012b). Además, la amígdala recibe proyecciones noradrenérgicas que proceden mayoritariamente del locus coeruleus y que incrementan la liberación de este neurotransmisor en la amígdala en respuesta a estrés (Galvez *et al.*, 1996; Pérez de la Mora *et al.*, 1997; McIntyre *et al.*, 2002; Morilak *et al.*, 2005; Chang & Grace, 2013). Además, la noradrenalina interactúa en la amígdala con otros moduladores como la corticosterona, promoviendo la adquisición y consolidación de memorias relacionadas con estímulos aversivos (Rooszendaal *et al.*, 2006a; Joëls *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2013). La CPF modula la formación y la expresión de memorias aversivas (Izquierdo *et al.*, 2007; Barsegyan *et al.*, 2010; Sotres-Bayon & Quirk, 2010), lo cual sugiere que la interacción entre la CPF y la amígdala regula el procesamiento de la memoria emocional a largo plazo.

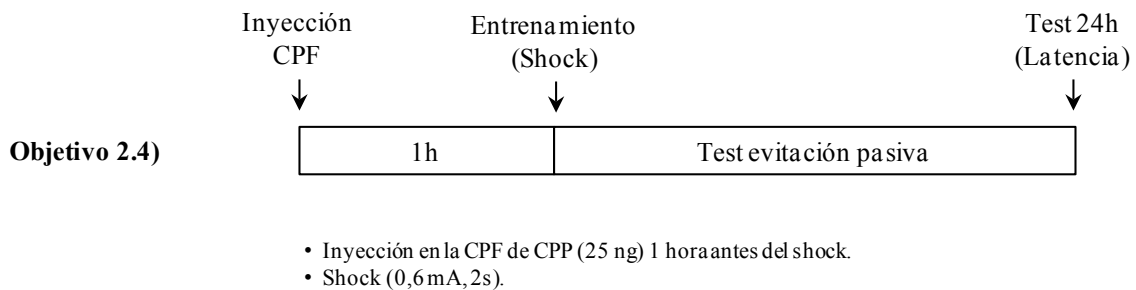
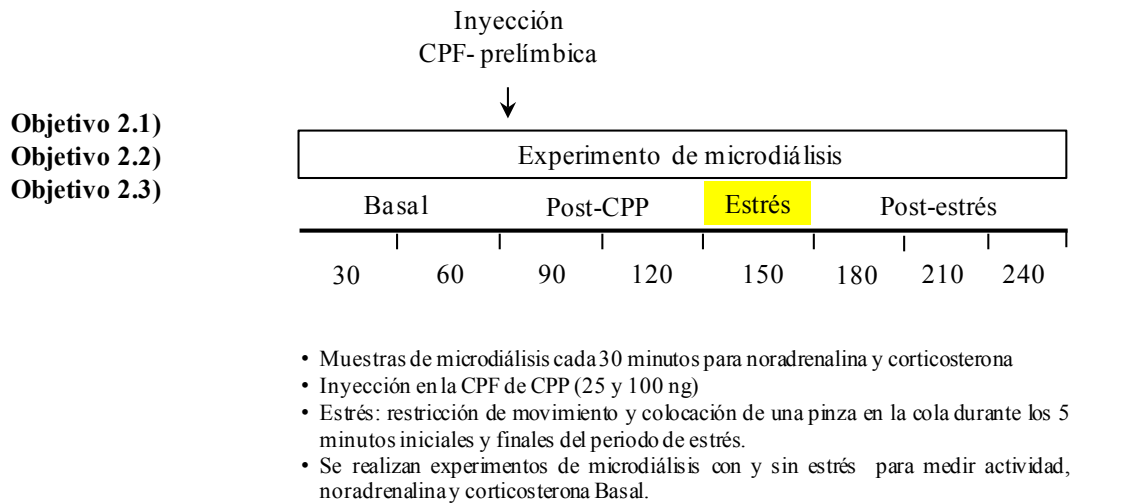
La hipofunción de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA es un modelo experimental utilizado para investigar las alteraciones neurofisiológicas y conductuales asociadas a la psicosis (Javitt & Zukin, 1991; Jentsch & Roth, 1999; Lahti *et al.*, 2001; Belforte *et al.*, 2010). Estudios previos publicados en nuestro laboratorio mostraron que la inyección de un antagonista de NMDA en la CPF medial incrementa la liberación de dopamina en la amígdala y el núcleo accumbens, así como una hiperactividad motora en animales de laboratorio. Este incremento se debe, al menos en parte, a la activación de proyecciones eferentes de la CPF (Del Arco *et al.*, 2008, 2011). Además la inyección de antagonistas NMDA incrementó la concentración extracelular de corticosterona en el hipocampo, lo que indica que los receptores NMDA prefrontales están involucrados en la regulación del eje HHA (Del Arco *et al.*, 2011).

El presente bloque experimental estudia si la alteración de la actividad de la región prelímbica de la CPF inducida por la hipofunción de los receptores NMDA, mediante inyecciones locales del antagonista NMDA, CPP, cambia los niveles de noradrenalina y corticosterona en la amígdala en respuesta a estrés y la adquisición de la memoria aversiva en un test de evitación pasiva. Los objetivos concretos del bloque experimental II son:

- 2.1 Estudio del efecto de la inyección del antagonista de NMDA CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la actividad motora espontánea.
- 2.2 Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala.
- 2.3 Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de corticosterona en la amígdala.
- 2.4 Estudio del efecto de la inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF sobre la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.

II. Diseño experimental

Los experimentos correspondientes al Bloque experimental II se llevaron a cabo siguiendo el protocolo experimental que se muestra en la siguiente Figura R9.



III. Análisis estadístico

Los datos de actividad motora y las concentraciones extracelulares de noradrenalina y corticosterona en amígdala, se analizaron mediante un ANOVA de dos vías con dos factores (Tratamiento x Tiempo) con medidas repetidas, analizando por separado los efectos en condiciones basales (en ausencia del estímulo estresante) y durante estrés; y un análisis de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Los datos analizados fueron la actividad motora en valores absolutos (basal y post-inyección) y los incrementos absolutos de las concentraciones de noradrenalina y corticosterona que se obtuvieron tras restar la concentración de los niveles basales (media de las 2 muestras previas a la inyección en la CPF) a cada una de las muestras post-inyección. Los datos correspondientes a los niveles basales de noradrenalina y corticosterona se analizaron en valores absolutos. Los datos de la latencia de entrada durante el entrenamiento y durante el Test 24 h en el test de evitación pasiva se analizaron mediante un análisis no paramétrico test *U* de Mann-Whitney.

IV. Resultados

2.1 Efecto de la inyección del antagonista de NMDA CPP en la CPF sobre la actividad motora espontánea.

La figura R10 muestra los efectos de la inyección de CPP (25 y 100 ng) sobre la actividad motora espontánea en condiciones basales (sin estrés) (A) y durante estrés (B). La actividad motora se mide en las cajas de actividad donde se llevan a cabo los experimentos de microdiálisis.

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad motora basal mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{6,90} = 4,60$; $p < 0,001$) pero no del factor Tratamiento ($F_{2,15} = 1,96$; $p = 0,176$) ni una interacción entre ambos factores ($F_{12,90} = 1,51$; $p = 0,135$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas no mostró diferencias significativas en los niveles basales (pre-inyección) de actividad motora de los grupos experimentales (Vehículo - CPP 25ng: $F_{1,15} = 0,46$; $p = 0,509$; Vehículo - CPP 100ng: $F_{1,15} = 1,05$; $p = 0,321$). El análisis mostró un incremento significativo de la actividad motora tras la inyección de CPP 100 ng ($F_{1,15} = 5,64$; $p = 0,031$) respecto a la actividad basal (pre-inyección), sin embargo no hubo diferencias significativas respecto al grupo tratado con vehículo ($F_{1,15} = 0,75$; $p = 0,401$) y al grupo tratado con CPP 25 ng ($F_{1,15} = 3,90$; $p = 0,067$).

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad motora durante estrés mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{2,20} = 4,06$; $p = 0,033$) y del factor Tiempo ($F_{5,100} = 4,57$; $p < 0,001$), pero no mostró una interacción entre ambos factores ($F_{8,80} = 0,94$; $p = 0,487$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas no mostró diferencias significativas en los niveles basales (pre-inyección) de actividad motora en los grupos experimentales (vehículo-CPP 25ng: $F_{1,20} = 0,06$; $p = 0,804$; Vehículo-CPP 100ng: $F_{1,20} = 1,57$; $p = 0,225$). El análisis mostró un incremento significativo de la actividad motora tras la inyección local de CPP 100 ng ($F_{1,20} = 8,60$; $p = 0,008$) respecto a la actividad basal (pre-inyección) así como un incremento significativo de la actividad motora tras la inyección de CPP (100 ng) ($F_{1,20} = 7,62$; $p = 0,012$) pero no del grupo tratado con CPP (25 ng) ($F_{1,20} = 0,27$; $p = 0,609$) comparados con el grupo tratado con vehículo.

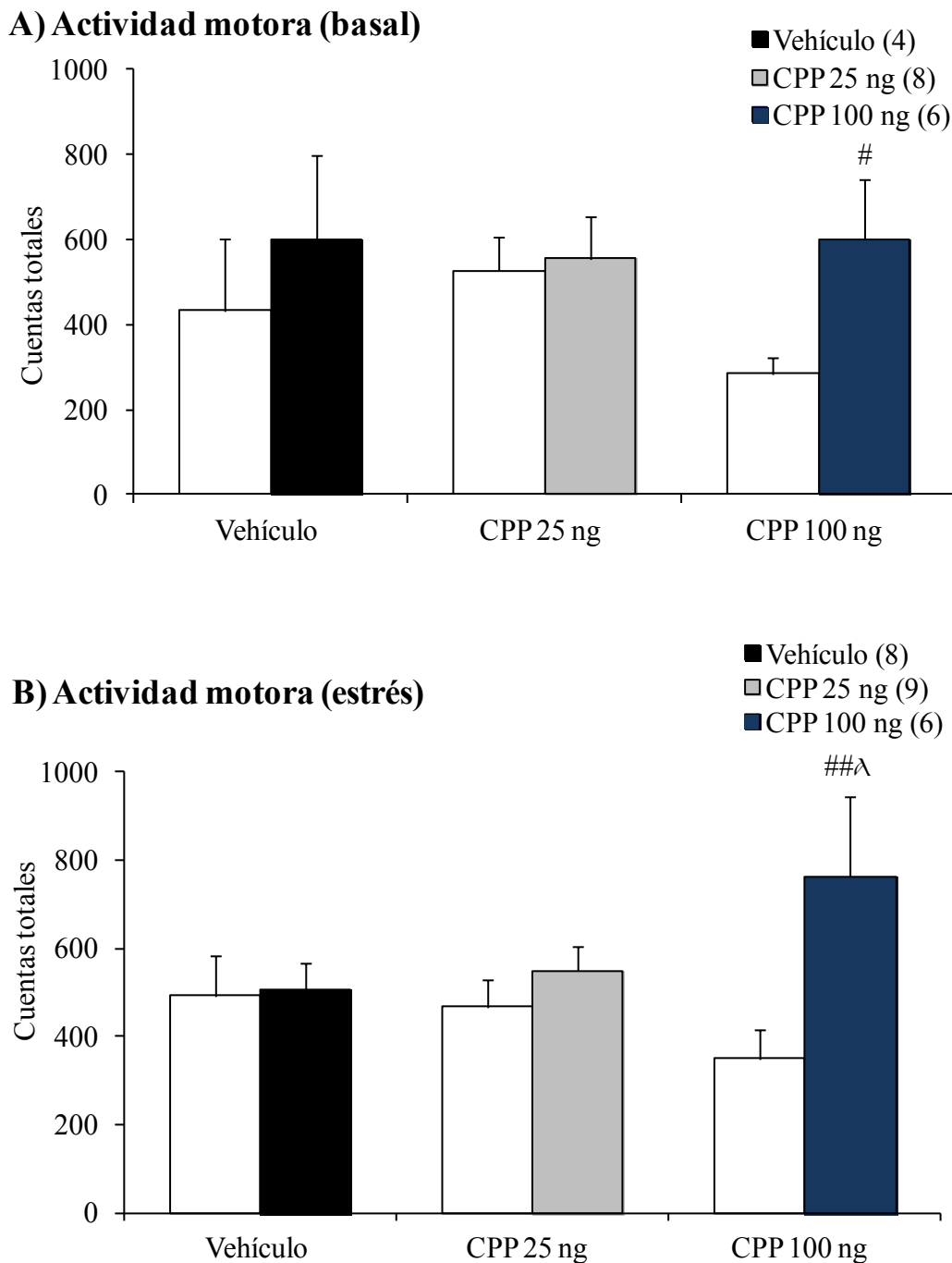


Figura R10. Efecto de la inyección en la CPF del antagonista NMDA CPP (25 y 100 ng) sobre la actividad motora espontánea registrada durante los experimentos de microdiálisis. Las barras en blanco corresponden a la actividad motora basal (pre-inyección) respectiva de cada grupo. Los datos (media \pm EEM) se presentan en cuentas totales de actividad. El número de animales se presenta en paréntesis. [#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$ comparado con actividad basal (pre-inyección); [^] $p < 0,05$ comparado con el grupo de vehículo.

2.2 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala.

La Figura R11 muestra los efectos de la inyección de CPP (25 y 100 ng) en la CPF sobre la concentración extracelular basal (sin estrés) (A) y estimulada por estrés (B) de noradrenalina en la amígdala.

El ANOVA de una vía para el análisis de los niveles basales de noradrenalina (pre-inyección) no mostro diferencias significativas entre los grupos tratados ($F_{2,11} = 0,98$; $p = 0,477$). Las concentraciones extracelulares basales de noradrenalina fueron: Vehículo = $1,31 \pm 0,65$ nM; CPP 25 ng = $0,77 \pm 0,20$ nM; CPP 100 ng = $0,70 \pm 0,19$ nM.

El ANOVA de dos vías para el análisis de los efectos del CPP sobre la concentración extracelular basal (sin estrés) de noradrenalina no mostró un efecto significativo del factor Tratamiento ($F_{2,11} = 1,47$; $p = 0,271$) ni del factor Tiempo ($F_{5,55} = 0,78$; $p = 0,565$) ni una interacción entre ambos factores ($F_{10,50} = 0,87$; $p = 0,559$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas no mostró diferencias significativas en la concentración extracelular basal de noradrenalina tras la inyección de CPP (100 ng) ($F_{1,11} = 1,31$; $p = 0,276$) y de CPP (25 ng) ($F_{1,11} = 0,06$; $p = 0,818$) comparado con el mismo periodo de tiempo (90-240 minutos) en el grupo tratado con vehículo (Figura R11A).

El ANOVA de una vía para el análisis de los niveles basales de noradrenalina (pre-inyección) no mostro diferencias significativas entre los grupos tratados ($F_{1,10} = 0,65$; $p = 0,439$). Las concentraciones extracelulares basales de noradrenalina fueron: Vehículo = $1,54 \pm 0,27$ nM; CPP 25 ng = $1,24 \pm 0,25$ nM.

El ANOVA de dos vías para el análisis de los efectos del CPP sobre la concentración extracelular de noradrenalina estimulada por estrés mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{5,50} = 7,71$; $p < 0,001$), pero no del factor Tratamiento ($F_{1,10} = 0,10$; $p = 0,751$) ni la interacción entre ambos factores ($F_{5,50} = 0,44$; $p = 0,817$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró un incremento significativo de la concentración extracelular de noradrenalina en la amígdala estimulada por estrés ($F_{1,10} = 14,37$; $p = 0,003$) comparado con los niveles post-inyección (periodo 90-120 min) en el

grupo tratado con vehículo. La inyección de CPP (25 ng) 60 minutos antes del estrés no modificó la concentración extracelular de noradrenalina estimulada por estrés en la amígdala ($F_{1,10} = 0,156$; $p = 0,700$) comparada con el grupo tratado con vehículo (Figura R11B).

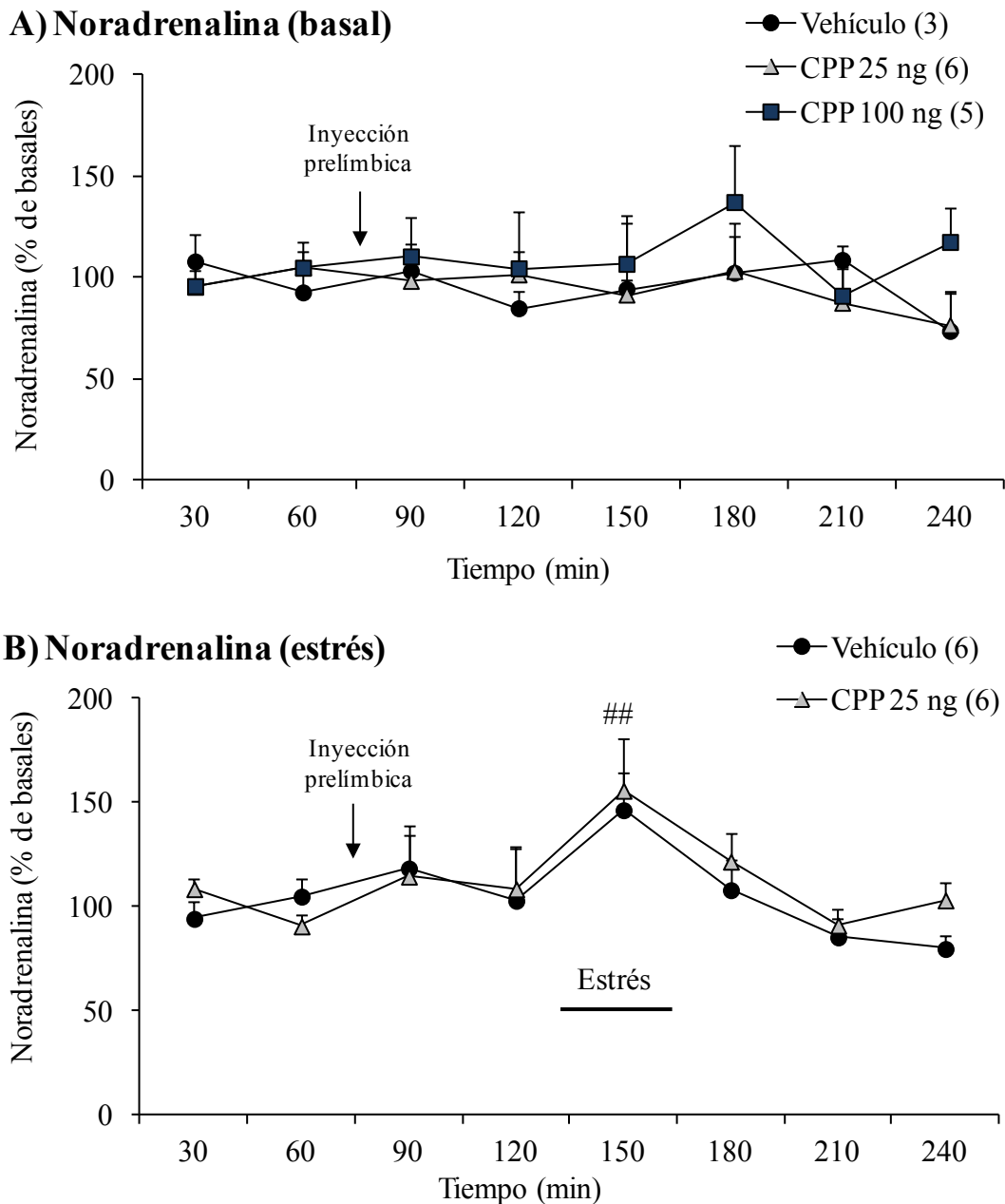


Figura R11. Efecto de la inyección en la CPF del antagonista NMDA CPP (25 y 100 ng) sobre la concentración extracelular basal (A) y estimulada por estrés (B) de noradrenalina en la amígdala. La flecha muestra el momento de la inyección. La barra horizontal marca el periodo de estrés agudo (30 minutos). Los datos (media \pm EEM) se representan en porcentaje respecto a sus correspondientes basales (periodo 30-60 minutos). El número de animales se muestra entre paréntesis. $^{##}p < 0,01$ comparado con los niveles post-inyección (periodo 90-120 min).

2.3 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de corticosterona en la amígdala.

La Figura R12 muestra los efectos de la inyección de CPP en la CPF sobre la concentración extracelular basal (A) y estimulada por estrés (B) de corticosterona en la amígdala.

El ANOVA de una vía para el análisis de los niveles basales de corticosterona (pre-inyección) no mostro diferencias significativas entre los grupos tratados ($F_{2,13} = 0,87$; $p = 0,918$). Las concentraciones extracelulares basales de corticosterona fueron: Vehículo = $0,29 \pm 0,10$ ng/ml; CPP 25 ng = $0,29 \pm 0,06$ ng/ml; CPP 100 ng = $0,33 \pm 0,09$ ng/ml.

El ANOVA de dos vías para el análisis de los efectos de CPP sobre la concentración basal de corticosterona, no mostró efectos significativos del factor Tratamiento ($F_{2,13} = 1,16$; $p = 0,342$), ni del factor Tiempo ($F_{5,65} = 0,64$; $p = 0,662$) ni la interacción entre ambos factores ($F_{10,65} = 0,70$; $p = 0,716$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas no mostró diferencias significativa en la concentración extracelular basal de corticosterona tras la inyección de CPP (100 ng) ($F_{1,13} = 0,768$; $p = 0,396$), y de CPP (25ng) ($F_{1,13} = 0,10$; $p = 0,759$) comparado con el mismo periodo de tiempo (90-240 minutos) en el grupo tratado con vehículo. El análisis tampoco mostró diferencias significativas entre dosis de CPP ($F_{1,13} = 2,26$; $p = 0,157$) (Figura R12A).

El ANOVA de una vía para el análisis de los niveles basales de corticosterona (pre-inyección) no mostro diferencias significativas entre los grupos tratados ($F_{1,11} = 1,30$; $p = 0,279$). Las concentraciones extracelulares basales de corticosterona fueron: Vehículo = $0,24 \pm 0,04$ ng/ml; CPP 25 ng = $0,32 \pm 0,06$ ng/ml.

El ANOVA de dos vías para el análisis de la concentración de corticosterona estimulada por estrés en la amígdala mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{3,33} = 7,54$; $p < 0,001$), pero no del factor Tratamiento ($F_{1,11} = 0,10$; $p = 0,750$) ni la interacción entre ambos factores ($F_{3,33} = 0,05$; $p = 0,981$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró un incremento significativo de la concentración extracelular de corticosterona en la amígdala estimulada por estrés ($F_{1,11} = 5,88$; $p = 0,033$) comparado con los niveles basales post- inyección (periodo 90-120 min) en el grupo tratado con

vehículo. La inyección de CPP (25 ng) 60 minutos antes del estrés no modificó significativamente los incrementos de la concentración extracelular de corticosterona estimulados por estrés en la amígdala ($F_{1,11} = 0,064$; $p = 0,804$) comparada con el grupo tratado con vehículo (Figura R12B).

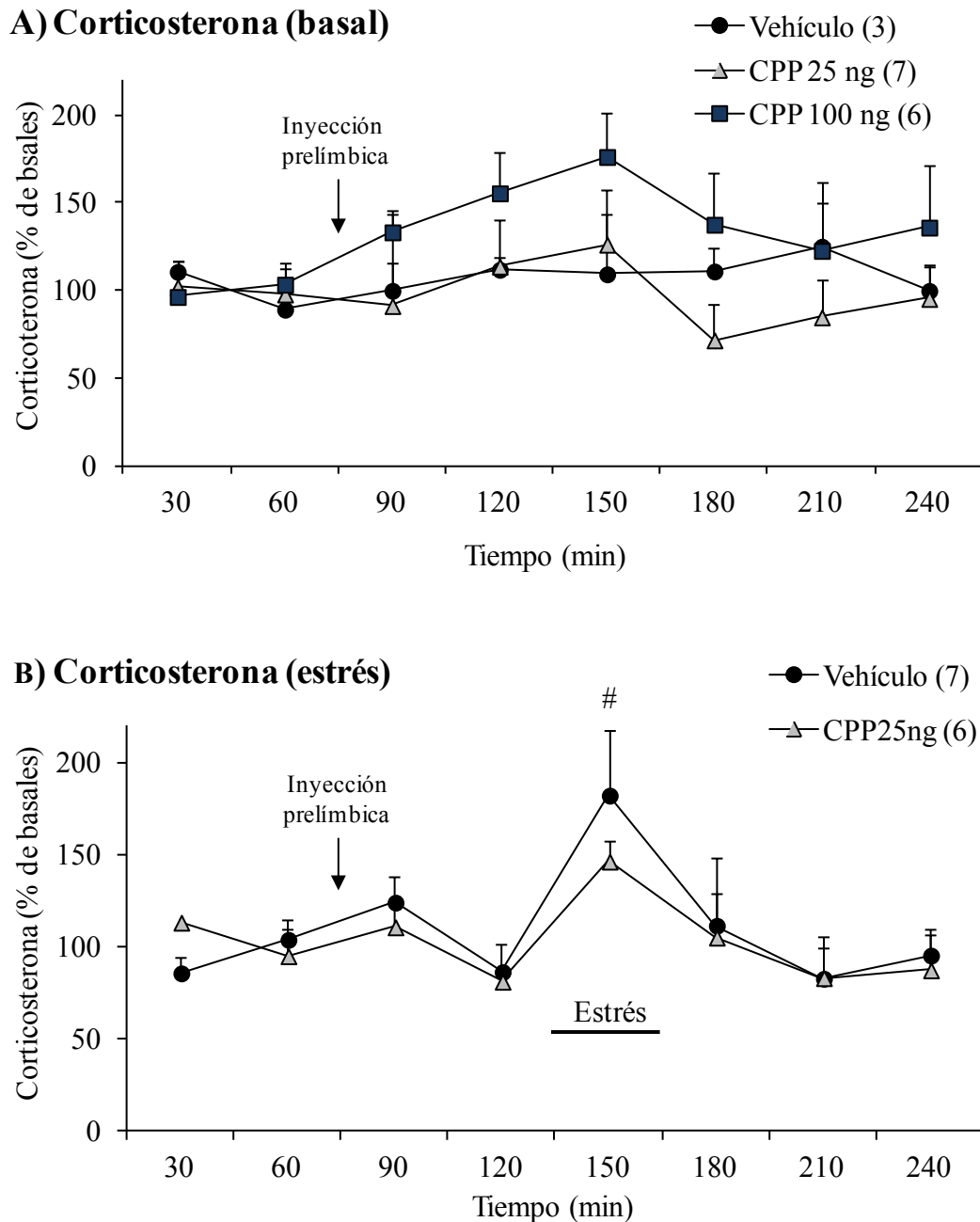


Figura R12. Efecto de la inyección en la CPF del antagonista NMDA CPP (25 y 100 ng) sobre la concentración extracelular basal (A) y estimulada por estrés (B) de corticosterona en la amígdala. La flecha muestra el momento de la inyección. La barra horizontal marca el periodo de estrés agudo (30 minutos). Los datos (media \pm EEM) se representan en porcentaje respecto a sus correspondientes basales (periodo 30-60 minutos). El número de animales se muestra entre paréntesis. # $p < 0,05$ comparado con los niveles post-inyección (periodo 90-120 min).

2.4 Efecto de la inyección de CPP en la CPF sobre la memoria aversiva en un test de evitación pasiva.

La figura R13 muestra el efecto de la inyección de CPP (25 ng) en la CPF sobre la latencia en un test de evitación pasiva.

El test de Mann-Whitney no mostró diferencias significativa del efecto de la inyección local en la CPF de CPP (25 ng) en la latencia de entrada durante el entrenamiento ($Z=0,02$; $p=0,987$) comparado con el grupo tratado con vehículo. La inyección de CPP (25 ng) redujo de forma significativa la latencia en el Test 24 h ($Z=2,309$; $p=0,020$) comparado con el grupo tratado con vehículo.

En la gráfica insertada en la figura R12 se muestra la distribución de puntos correspondientes a los valores de latencia durante el Test 24 h de cada uno de los animales incluidos en el experimento. En el grupo tratado con vehículo hubo más animales con latencias superiores a 600 segundos (12 de 18 animales) comparado con el grupo tratado con CPP (25 ng) (4 de 18).

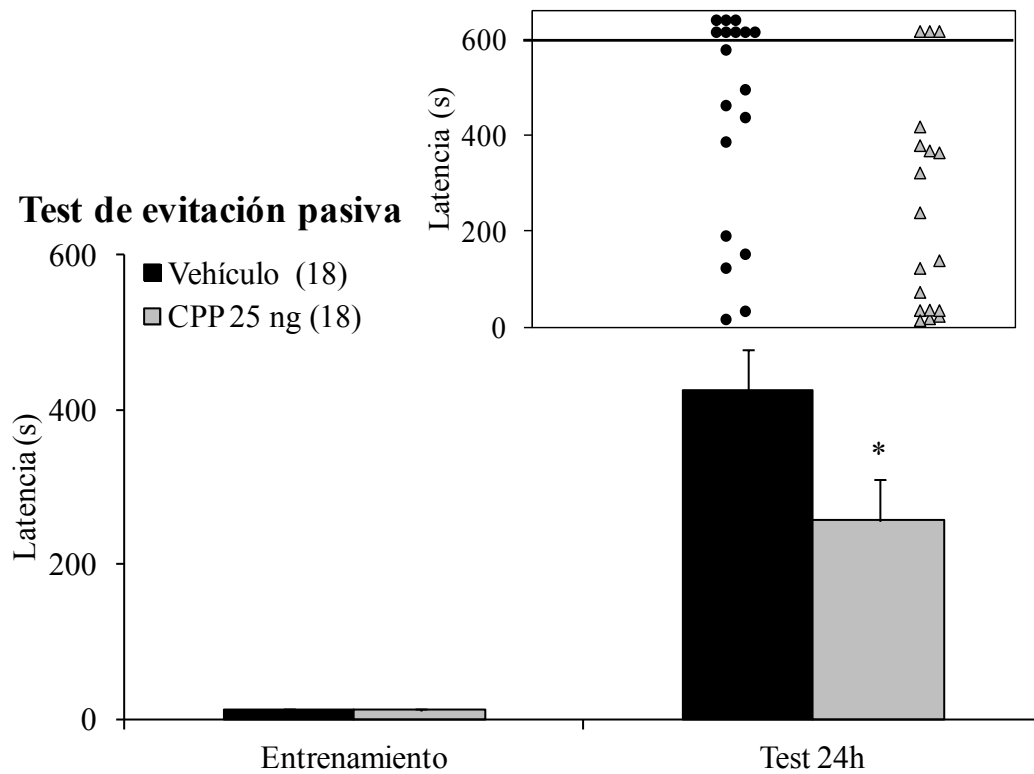


Figura R13. Efecto de la inyección en la CPF del antagonista NMDA CPP (25 ng) sobre la latencia de entrada en un test de evitación pasiva y agregado las latencias de entrada durante el Test 24h de cada uno de los animales (cada punto representa un animal). La línea negra indica el límite máximo de 600 s fijado para la entrada de los animales. Los datos (media \pm EEM) se muestran como latencia en segundos (s). El número de animales se muestra entre paréntesis. * $p < 0,05$, comparado con el grupo de vehículo.

V. Discusión

Los resultados más relevantes obtenidos en el bloque experimental II son:

- 1) La inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF no modificó las concentraciones extracelulares de noradrenalina y corticosterona en la amígdala, en respuesta a estrés agudo.
- 2) La inyección de CPP en la región prelímbica de la CPF redujo la latencia de entrada 24 horas tras recibir un shock eléctrico en la patas en un test de evitación pasiva.

Estos resultados sugieren que la hipofunción de los receptores NMDA en la CPF aunque no modifica la actividad de las proyecciones noradrenérgicas a amígdala ni del eje HHA en respuesta a estrés, si altera el procesamiento de la memoria a largo plazo de un estímulo aversivo.

Alteraciones de la CPF y respuesta a estrés.

Como se ha mostrado en la sección de resultados, el estrés agudo incrementó la concentración extracelular de noradrenalina y corticosterona en la amígdala de la rata. Estos resultados están en línea con estudios previos que sugieren que el estrés activa proyecciones noradrenérgicas y dopaminérgicas que llegan a la amígdala así como el eje HHA (Galvez *et al.*, 1996; Inglis & Moghaddam, 1999; Bouchez *et al.*, 2012). La noradrenalina y la corticosterona junto con otros neuro-moduladores, contribuyen en el procesamiento de estímulos emocionales; añadido a esto, desarrollan una función crucial en la respuesta fisiológica a estrés (Pezze & Feldon, 2004; Morilak *et al.*, 2005; Roozendaal *et al.*, 2009b).

En este contexto la corteza prelímbica ejerce un control destacado en la regulación de la respuesta a estrés (Ulrich-Lai & Herman, 2009; Amat *et al.*, 2005). De hecho, la manipulación farmacológica de la actividad de esta región modifica la actividad de sistemas neurotransmisores en diversas áreas límbicas (como la amígdala, el hipocampo o el núcleo accumbens) así como los niveles de corticosterona en plasma en respuesta a estrés (Doherty & Gratton, 1996, 1999; Del Arco & Mora, 2008a; Weinberg *et al.*, 2010; Del Arco *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2012b). Estudios

experimentales en animales de laboratorio y estudios clínicos en humanos han sugerido que una alteración en la interacción entre la CPF y la amígdala así como otras áreas límbicas durante la respuesta a estrés puede producir alteraciones en el procesamiento de estímulos emocionales y contribuir al desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Thompson *et al.*, 2004; Phillips & Seidman, 2008; Pitman *et al.*, 2012; Andolina *et al.*, 2013; Anticevic *et al.*, 2013).

La hipofunción de los receptores glutamatérgicos mediante antagonistas NMDA altera la función de la CPF (Suzuki *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004; Burgos-Robles *et al.*, 2007; Homayoun & Moghaddam, 2005; Kargieman *et al.*, 2007) y produce alteraciones conductuales en animales de laboratorio que asemejan a algunos de los síntomas descritos en pacientes con psicosis (Takahata & Moghaddam, 2003). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el bloqueo de los receptores NMDA en la CPF produce una hiperactividad cortico-límbica que se refleja conductualmente en forma de hiperactividad motora. En concreto, la inyección en la CPF del antagonista NMDA CPP, en una dosis relativamente elevada (1 µg) incrementó las concentraciones extracelulares basales de dopamina y corticosterona en áreas límbicas como el núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo (Del Arco *et al.*, 2008, 2011). En base a estos estudios, se investigó si una actividad anormal de la corteza prelímbica mediada por inyecciones locales de CPP puede alterar la actividad del sistema noradrenérgico en la amígdala y del eje HHA, en respuesta a estrés.

En el presente trabajo de investigación primero, se seleccionó una dosis de CPP que no produjese alteraciones conductuales ni neuroquímicas en condiciones basales, evitando así un posible factor de confusión con los efectos del estrés. Puesto que la inyección local en la CPF la dosis de CPP 100 ng produjo un incremento significativo de la actividad motora aunque no de las concentraciones de noradrenalina y corticosterona en la amígdala. Se eligió la dosis de CPP 25 ng para los experimentos de estrés. La inyección de CPP 25 ng no modificó el incremento en la concentración extracelular de noradrenalina y corticosterona estimulados por estrés en la amígdala. Estos resultados indican que la reducción de la actividad de los receptores NMDA en la CPF no modifica la activación de las proyecciones del sistema noradrenérgico ni el eje HHA en respuesta a estrés. Estos resultados están en contraste con estudios previos que muestran que la activación de la corteza prelímbica con picrotoxina reduce el aumento de

corticosterona en plasma inducido por estrés (Garrido *et al.*, 2012b). La inyección de antagonistas NMDA en la CPF activa proyecciones eferentes a áreas subcorticales (Del Arco *et al.*, 2012) por lo que los resultados descritos en esta Tesis sugieren que la dosis de 25 ng de CPP no es suficiente para activar las proyecciones que regulan la actividad del eje HHA.

Alteraciones de la CPF y memoria emocional

La inyección de CPP 25 ng en la corteza prelímbica produjo una reducción significativa de la latencia de entrada en un test de evitación pasiva. Estos resultados confirman que la inyección del antagonista NMDA CPP (25 ng) en la CPF altera la función de esta región cerebral y sugieren que estos receptores están involucrados en el procesamiento a largo plazo de memoria asociada a estímulos aversivos (Gilmartin & Helmstetter, 2010). Aunque bien es cierto que la implicación de los receptores NMDA en la memoria emocional puede depender del protocolo experimental (Izquierdo *et al.*, 2007). Debido a que la interacción entre la CPF y la amígdala es esencial para la formación de memoria emocional (Roozendaal *et al.*, 2009a; Sotres-Bayon & Quirk, 2010; Joëls *et al.*, 2011; Sierra-Mercado *et al.*, 2011), el efecto del CPP descrito en los resultados puede implicar a estas dos áreas cerebrales. Estos resultados descartan un papel de estos moduladores en los efectos del CPP en la adquisición de memoria aversiva. En apoyo a esta hipótesis estudios de nuestro laboratorio y de otros han mostrado que la inyección de antagonistas NMDA en la CPF activa proyecciones eferentes a áreas subcorticales (Del Arco *et al.*, 2008, 2011; Nowak *et al.*, 2012). Además, la estimulación de la región prelímbica de la CPF mediante inyecciones de picrotoxina, antagonista del receptor GABA_A reduce la latencia de entrada en el test de evitación pasiva (Garrido *et al.*, 2012b). También es interesante destacar que estudios recientes indican que la interacción entre neuronas piramidales e interneuronas en la CPF resulta esencial para la correcta sincronización de la actividad de las primeras y el correcto procesamiento de la memoria durante un estímulo aversivo (Courtin *et al.*, 2014).

Por otro lado, diversos estudios han mostrado el papel facilitador de la noradrenalina y los glucocorticoides en la amígdala en relación con la memoria aversiva. De hecho, la activación de los receptores de estos moduladores en la amígdala potencia la adquisición de memorias aversivas (Roozendaal *et al.*, 2006a; De Oliveira *et al.*, 2013).

Sin embargo, los resultados del presente trabajo de investigación han mostrado que la alteración de la actividad NMDA de la CPF produce una reducción en la formación de memorias aversivas sin modificar los incrementos de noradrenalina y corticosterona en respuesta a estrés agudo. Estos resultados descartan por tanto un papel de estos moduladores en los efectos del CPP en la adquisición de memoria aversiva.

Alternativamente, otros sistemas neurotransmisores como el glutamato y el GABA, que son muy importantes en la conexión entre la CPF y la amígdala pueden estar participando en los efectos del CPP sobre la memoria, aunque no han sido investigados en este trabajo. De hecho, estudios previos han mostrado que la estimulación de la CPF activa proyecciones eferentes glutamatérgicas que llegan a la amígdala y que activan interneuronas GABA localizadas en la región basolateral o en núcleos intercalados y que participan en la formación de memorias aversivas (Rosenkranz & Grace, 2002; Quirk *et al.*, 2003; Berretta *et al.*, 2005; Likhtik *et al.*, 2005; Andolina *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estos trabajos, se ha propuesto que la inyección local de CPP en la CPF podría estar modificando la actividad GABAérgica en la amígdala a través de eferencias corticales y en consecuencia, el procesamiento emocional (Nowak *et al.*, 2012).

Consideraciones finales

En resumen, estos resultados sugieren que la hipofunción de los receptores NMDA en la región prelímbica de la CPF es capaz de alterar el procesamiento de la memoria a largo plazo de estímulos aversivos sin cambiar los parámetros de respuesta a estrés (incrementos de noradrenalina y corticosterona en amígdala) a corto plazo. Una alteración en el funcionamiento de la CPF puede facilitar una respuesta aberrante a estrés y precipitar el inicio de psicosis en pacientes vulnerables (Moghaddam, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Van Os *et al.*, 2010; Fusar-Poli *et al.*, 2011). Asumiendo que la memoria emocional condiciona la capacidad de los individuos de enfrentarse a posteriores situaciones de estrés (van Winkel *et al.*, 2008), estos resultados apoyan que la disfunción de los receptores NMDA en la CPF pueden contribuir en la vulnerabilidad de los individuos a los efectos del estrés.

BLOQUE EXPERIMENTAL III

Cambios a largo plazo en la actividad de la amígdala en respuesta a un estrés traumático: estudio del efecto del IFS sobre la actividad motora espontánea y la transmisión noradrenérgica en la amígdala.

I. Introducción

La exposición a un estrés de muy alta intensidad puede inducir la sensibilización de la respuesta fisiológica a una gran variedad de estímulos (estresantes o neutros) durante un periodo de tiempo extenso (Stam, 2007a, 2007b; Armario et al., 2008). En concreto, se ha descrito que la exposición a un estrés traumático puede desencadenar el desarrollo de patologías relacionadas con trastornos de ansiedad como el TEPT, definido como una respuesta mal-adaptativa a estrés. El TEPT se caracteriza por un conjunto de alteraciones fisiológicas y conductuales entre las que destacan la ansiedad generalizada y la hipervigilancia (Rasmussen *et al.*, 2008). En concreto, el desarrollo de la hipervigilancia se ha asociado con un mecanismo de aprendizaje no asociativo que implicaría, en parte, la sensibilización generalizada de la respuesta a novedad y por tanto de los sustratos neurobiológicos de la que esta respuesta depende (Stam *et al.*, 2000; Siegmund & Wotjak, 2007a, 2007b; Pamplona *et al.*, 2011). Estudios clínicos en pacientes de TEPT han mostrado alteraciones estructurales y funcionales en diversas áreas del cerebro como en la actividad de amígdala, la CPF y el hipocampo y han resultado claves a la hora de relacionarlas con las alteraciones conductuales en dichos pacientes (Elzinga & Bremner, 2002; Rauch *et al.*, 2006; Etkin & Wager, 2007); añadido a ello, un estudio en roedores ha mostrado alteraciones similares en la amígdala y en la CPF de animales previamente expuestos a un estrés traumático (Liang *et al.*, 2014b).

La hiperactividad del sistema noradrenérgico podría estar implicada en el desarrollo y/o mantenimiento de alguno de los síntomas de TEPT como la ansiedad y la hipervigilancia (Pitman *et al.*, 2012). De hecho, estudios clínicos han mostrado incrementos en los niveles plasmáticos de noradrenalina durante la exposición tanto a estímulos neutros como asociados al trauma (Blanchard *et al.*, 1991; Liberzon *et al.*, 1999), así como una reducción de los síntomas tras la administración sistémica de

fármacos dirigidos a reducir la transmisión noradrenérgica (Raskind *et al.*, 2003; Vaiva *et al.*, 2003; Hoge *et al.*, 2012). En esta misma línea, un estudio en un modelo animal de TEPT ha mostrado una reducción de síntomas similar a los descritos en pacientes, tras la administración sistémica de fármacos bloqueantes de la transmisión noradrenérgica (Olson *et al.*, 2011). Añadido a ello, también se ha mostrado un incremento en la actividad del locus coeruleus en respuesta a estrés en animales previamente expuestos a un estrés traumático (George *et al.*, 2013).

Sin embargo y hasta la fecha, no se han encontrado estudios que muestren variaciones en la dinámica de la transmisión noradrenérgica en la amígdala, ni hasta que punto una excesiva actividad noradrenérgica en la amígdala se relaciona con las alteraciones conductuales descritas en los modelos animales de exposición a trauma. Además estos cambios en la liberación de noradrenalina en la amígdala podrían estar mediando en la inmovilidad en respuesta a novedad producidos por la exposición a estrés traumático. Este conocimiento es fundamental en aras a obtener nuevas herramientas terapéuticas, farmacológicas u otras, para tratar este síndrome psiquiátrico.

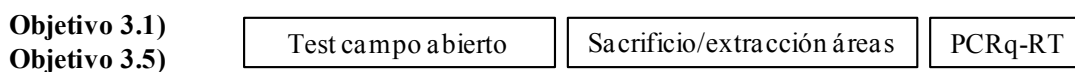
El presente bloque experimenta estudia si la exposición de los animales a un estrés traumático (IFS), produce cambios a largo plazo en la conducta y en la actividad noradrenérgica en la amígdala. El IFS se ha validado como modelo experimental de TEPT y su utilización está ampliamente extendida, pues induce alteraciones conductuales y endocrinas a largo plazo, como la inmovilidad en respuesta a novedad (considerado como índice de hipervigilancia) (van Dijken *et al.*, 1992a, 1992b; Liberzon *et al.*, 2005; Geerse *et al.*, 2006; Daviu *et al.*, 2010; Hendriksen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). En este bloque experimental también se estudia si los cambios en la transmisión noradrenérgica en la amígdala están relacionados con la hipervigilancia y si el mantenimiento de los animales en EA atenúa las alteraciones conductuales producidas por la exposición de los animales a un estrés traumático. Los objetivos concretos del Bloque experimental III son:

- 3.1 Análisis de la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.
- 3.2 Análisis de la concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala en animales control y expuestos a IFS.

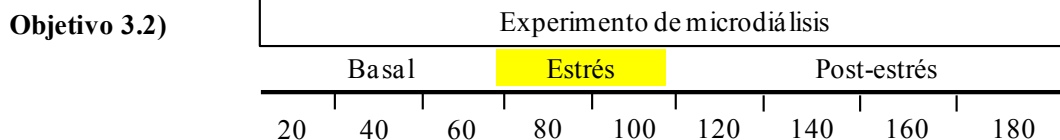
- 3.3 Estudio del efecto de la inyección del antagonista β -adrenérgico propranolol en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.
- 3.4 Estudio del efecto de la inyección del agonista β -adrenérgico clenbuterol y de noradrenalina en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control.
- 3.5 Estudio de la expresión de ARNm de receptores en la amígdala, la CPF y el hipocampo de animales control y expuestos a IFS.
- 3.6 Estudio del efecto del EA sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.

II. Diseño experimental

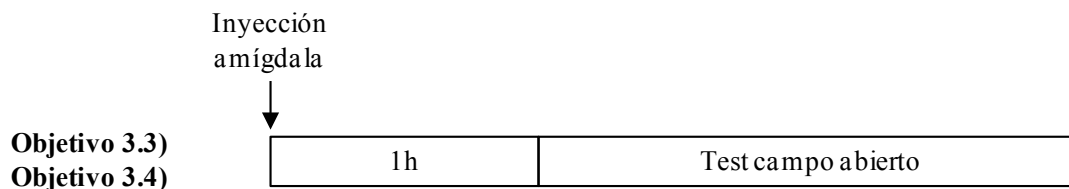
Todos los animales utilizados en este bloque experimental fueron divididos inicialmente en dos grupos experimentales: control y expuestos a IFS (ver apartado 2.2 de material y métodos) manteniéndose posteriormente durante 7 días en sus jaulas. A continuación se llevaron a cabo los experimentos como se muestra en el siguiente protocolo experimental de la Figura R14. En el caso de los experimentos correspondientes a los objetivos 3.2, 3.3 y 3.4 los animales fueron expuestos a IFS después de colocarles los implantes de microdiálisis y microinyecciones correspondientes mediante cirugía.



- Test de campo abierto realizado en oscuridad.
- Sacrificio realizado una semana más tarde de test campo abierto.



- Muestras de microdiálisis cada 20 minutos para medir noradrenalina.
- Estrés: restricción del movimiento (40 minutos).



- Inyección local en la amígdala flujo (0,5 µl/minuto) de:
- Propranolol
- Clenbuterol y noradrenalina en animales control.



- Mantenimiento en condiciones control/EA durante 21 días.

III. Análisis estadístico

Los datos del efecto de la exposición a IFS sobre actividad motora espontánea en campo abierto se analizaron mediante un ANOVA de dos vías con dos factores (Grupo x Tiempo) con medidas repetidas; y un análisis de comparaciones planeadas (análisis *a priori*) de la actividad motora durante los 5 primeros minutos del test (se repite para todos los análisis de la actividad motora). El efecto de la inyección del antagonista β -adrenérgico propranolol (0,5 μ g) sobre la actividad motora espontánea se analizó mediante un ANOVA de tres vías con 3 factores (Grupo x Tratamiento x Tiempo) con medidas repetidas. El efecto de las dosis de propranolol (0,1 0,5 y 1,5 μ g) sobre animales expuestos a IFS durante los 5 primeros minutos del test se analizaron mediante un ANOVA de una vía, mientras que el efecto de las inyecciones de agonistas adrenérgicos clenbuterol y noradrenalina sobre la actividad motora espontánea de animales control se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (Tratamiento x Tiempo) con medidas repetidas. El efecto del EA sobre la actividad motora tras la exposición a IFS se analizó mediante un ANOVA de tres vías con tres factores (Grupo x Exposición a Trauma x Tiempo) con medidas repetidas y un análisis de comparaciones planeadas. Los datos de concentración extracelular de noradrenalina estimulada por estrés en amígdala se analizaron como porcentaje respecto a los niveles basales mediante un ANOVA de dos vías con dos factores (Grupo x Tiempo) con medidas repetidas, y un análisis de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Los niveles basales de noradrenalina, en valores absolutos, se analizaron mediante un ANOVA de una vía con la media de las tres muestras basales (periodo 20-60 minutos). Los datos de expresión de ARNm en la amígdala, la CPF y el hipocampo se analizaron mediante un test *t* de Student.

IV. Resultados

3.1 Análisis de la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.

La figura R15 muestra los perfiles temporales de la actividad motora horizontal 7 días (A) y 28 días (B) tras la exposición a IFS.

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad motora 7 días tras la exposición a IFS mostró un efecto significativo (solo como tendencia) del factor Grupo ($F_{1,17}= 4,44$; $p= 0,050$) y del factor Tiempo ($F_{1,187}=28,77$; $p< 0.001$) así como una interacción entre ambos factores ($F_{1,187}= 10,33$; $p< 0,001$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró una reducción significativa de la actividad horizontal durante los 5 primeros minutos del test en el grupo expuesto a IFS ($F_{1,17}= 92,93$; $p< 0.001$) comparado con el grupo control (Figura R15A).

El ANOVA de dos vías para el análisis de la actividad motora horizontal 28 días tras la exposición a IFS no mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,14}= 4,14$; $p< 0,061$), pero si del factor Tiempo ($F_{11,154}=15,63$; $p< 0,001$) así como una interacción entre ambos factores ($F_{11,154}= 6,72$; $p< 0,001$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró una reducción significativa de la actividad motora horizontal durante los 5 primeros del test en el grupo expuesto a IFS ($F_{1,14}= 75,09$; $p< 0,001$) comprado con el grupo control (Figura R15B).

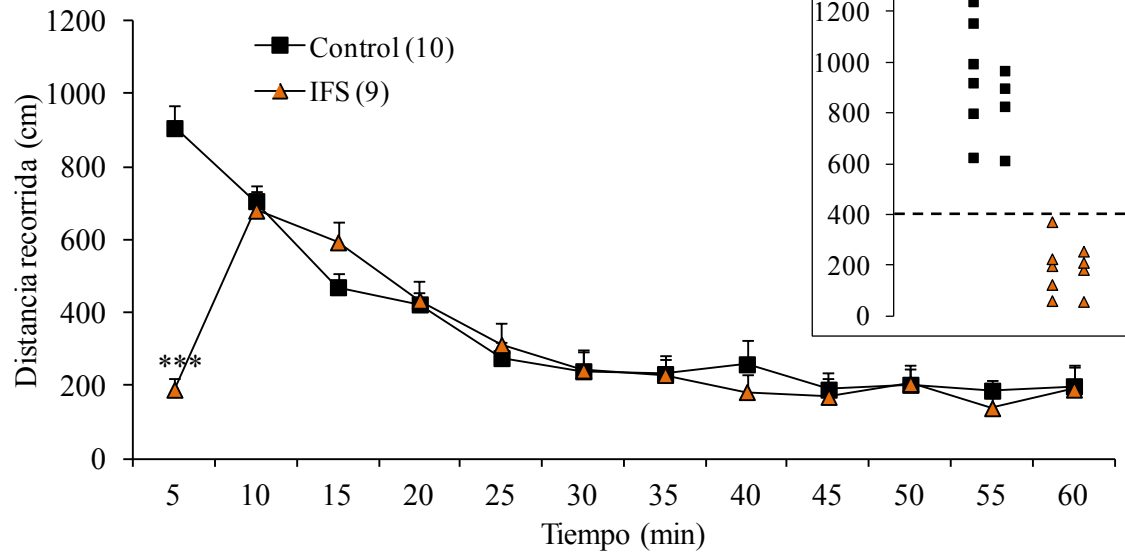
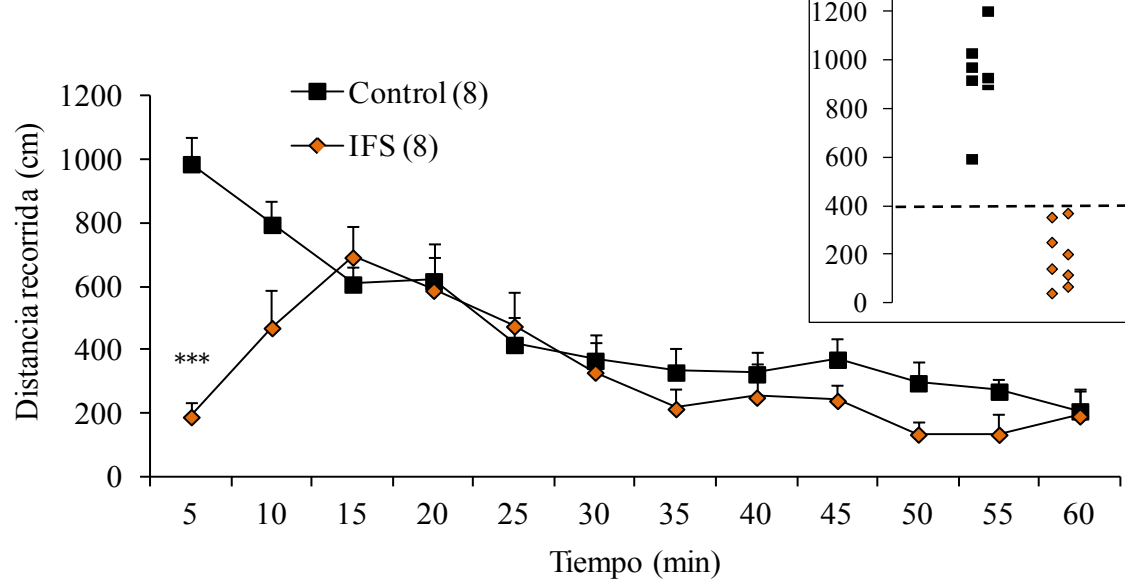
A) Actividad horizontal 7 días post-IFS**B) Actividad horizontal (28 días)**

Figura R15. Actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS. Perfil temporal de la actividad horizontal y agregado la actividad durante los 5 primeros minutos del test en animales 7 días (A) y 28 días (B) tras la exposición a IFS. La línea discontinua de las figuras agregadas refleja una delimitación (arbitraria) de actividad motora que los animales expuestos a IFS no superan. Los datos (media \pm EEM) se muestran como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra en paréntesis. *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control.

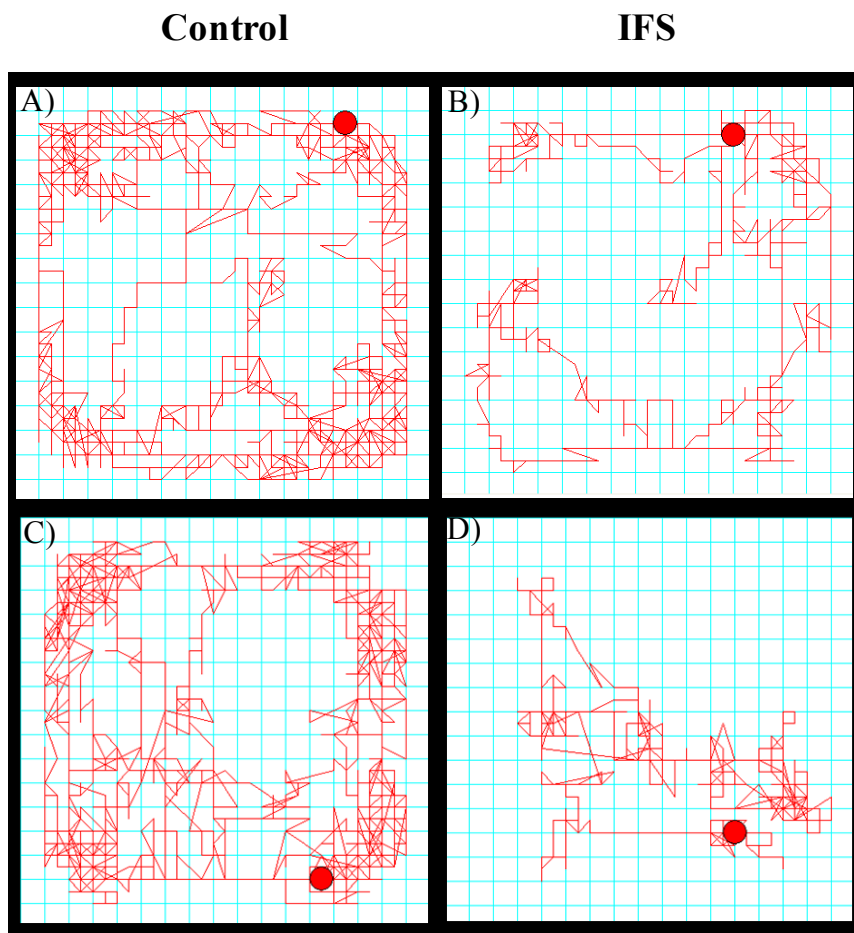


Figura R16. Ejemplos representativos de la actividad motora durante los 5 primeros minutos en el campo abierto de animales correspondientes al grupo control y expuesto a IFS 7 días (A y B) y control y expuesto a IFS 28 días (C y D).

3.2 Concentración extracelular basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala en animales control y expuestos a IFS.

La figura R17 muestra los niveles extracelulares basales y estimulados por estrés de noradrenalina en la amígdala de animales control y expuestos a IFS.

El ANOVA de una vía mostró una reducción significativa ($F_{1,19}= 14,96$; $p= 0,001$) de la concentración extracelular basal de noradrenalina en la amígdala de animales expuestos a IFS, comparado con animales control, como se muestra en la gráfica de barras agregada. Concentraciones extracelular basal de noradrenalina Control= $0,83 \pm 0,09$ nM; IFS= $0,39 \pm 0,07$ nM.

El ANOVA de dos vías para el análisis de los efectos de un estrés agudo sobre la liberación de noradrenalina mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{5,95}= 4,73$; $p< 0,001$), pero no del factor Grupo ($F_{1,19}= 3,36$; $p= 0,083$) ni una interacción entre ambos factores ($F_{5,95}= 1,40$; $p= 0,230$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró un incremento significativo de la liberación de noradrenalina en respuesta a estrés en el grupo expuesto a IFS ($F_{1,19}= 27,48$; $p< 0,001$) pero no en el grupo control ($F_{1,19}= 1,21$; $p= 0,290$) comparado con sus respectivos niveles basales de noradrenalina. El análisis también mostró una diferencia significativa en los efectos del estrés sobre la liberación de noradrenalina en la amígdala de animales expuestos a IFS ($F_{1,19}= 6,76$; $p= 0,018$) comparado con el grupo control (periodo 80-120 minutos).

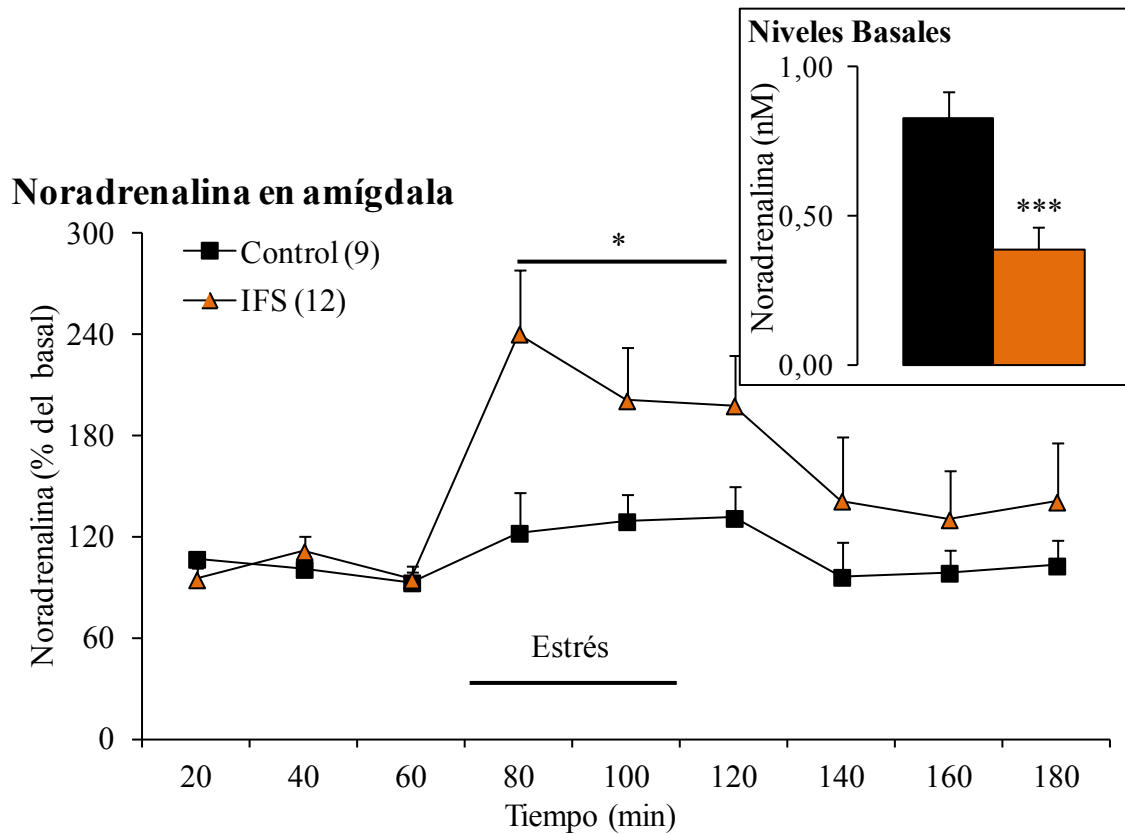


Figura R17. Liberación basal y estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala de animales control y expuestos a IFS. Agregado en gráfica de barras se muestran los niveles basales de noradrenalina. El periodo de estrés (40 minutos) se representa mediante la barra horizontal inferior negra. Los datos (media \pm EEM) se representan en porcentaje (%) respecto a los niveles basales y en valores absolutos para los niveles basales. En paréntesis se muestra el número de animales. † p < 0,05, comparado con el grupo control (periodo 80-120 minutos); *** p < 0,001 comparado con los niveles basales del grupo control.

3.3 Efecto de la inyección del antagonista β -adrenérgico propranolol en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.

Las figuras R18 y R19 muestran el efecto de la inyección local en la amígdala del antagonista β -adrenérgico propranolol, sobre la actividad motora horizontal durante 60 minutos (Figura R18) y durante los 5 primeros minutos del test (Figura R19) en animales control y expuestos a IFS.

El ANOVA de tres vías para el análisis de los efectos de la inyección local en la amígdala de propranolol (0,5 μ g) mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,29}=9,36$; $p=0,005$) y del factor Tiempo ($F_{11,319}=49,83$; $p<0,001$), pero no del factor Tratamiento ($F_{1,29}=1,84$; $p=0,186$). El análisis mostró una tendencia de interacción los factores Grupo y Tratamiento ($F_{1,29}=3,64$; $p=0,066$), un efecto significativo entre los factores Tratamiento y Tiempo ($F_{11,319}=1,93$; $p<0,035$) y entre los factores Grupo y Tiempo ($F_{11,319}=3,15$; $p<0,001$), y una interacción significativa entre todos los factores ($F_{11,319}=4,48$; $p<0,001$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas mostró en los grupos tratados con vehículo, una reducción significativa de la actividad motora en el grupo de animales expuestos a IFS ($F_{1,29}=29,39$; $p<0,001$) comparado con el grupo control. El análisis también mostró que la inyección local en la amígdala de propranolol (0,5 μ g) contrarrestó significativamente la reducción de la actividad motora horizontal producida por la exposición a IFS ($F_{1,29}=19,36$; $p<0,001$). En animales control, la inyección de propranolol (0,5 μ g) redujo significativamente la actividad motora horizontal ($F_{1,29}=11,78$; $p=0,002$) comparado con el grupo control tratado con vehículo. (Figura R19A).

El ANOVA de una vía para el análisis de los efectos de la inyección local en la amígdala de los animales expuestos a IFS de propranolol (0,1 0,5 y 1,5 μ g) durante los 5 primeros minutos del test mostró un incremento significativo de la actividad horizontal con propranolol (1,5 μ g) ($F_{1,26}=6,78$; $p=0,015$) pero no de propranolol (0,1 μ g) ($F_{1,26}=3,79$; $p=0,062$) comparados con el grupo de animales expuestos a IFS tratados con vehículo. El análisis no mostró diferencias significativas en la actividad motora de los animales tratados con propranolol (1,5 μ g) comparados con el grupo

tratado con propranolol (0,5 μg) ($F_{1,26} = 0,51$; $p = 0,480$) ni con el grupo de propranolol (0,1 μg) ($F_{1,26} = 0,77$; $p = 0,388$).

La Figura R19B muestra la dispersión de los valores de actividad motora representados en la Figura R19A. Destaca la homogeneidad tanto del grupo control como el grupo IFS tratado con vehículo.

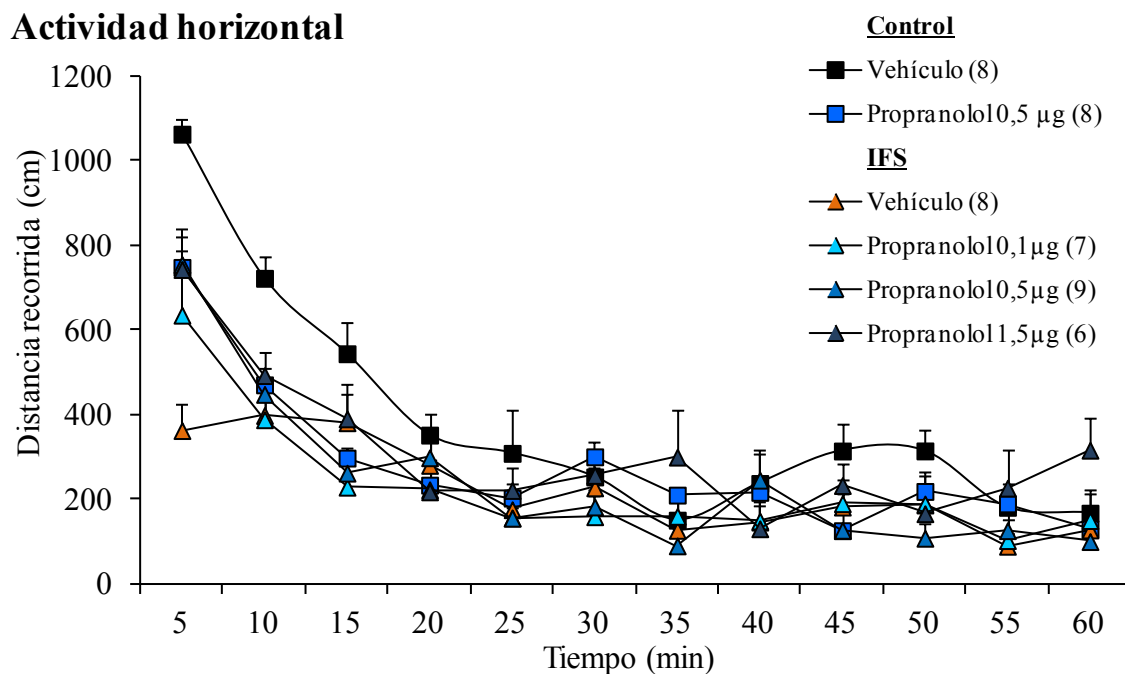
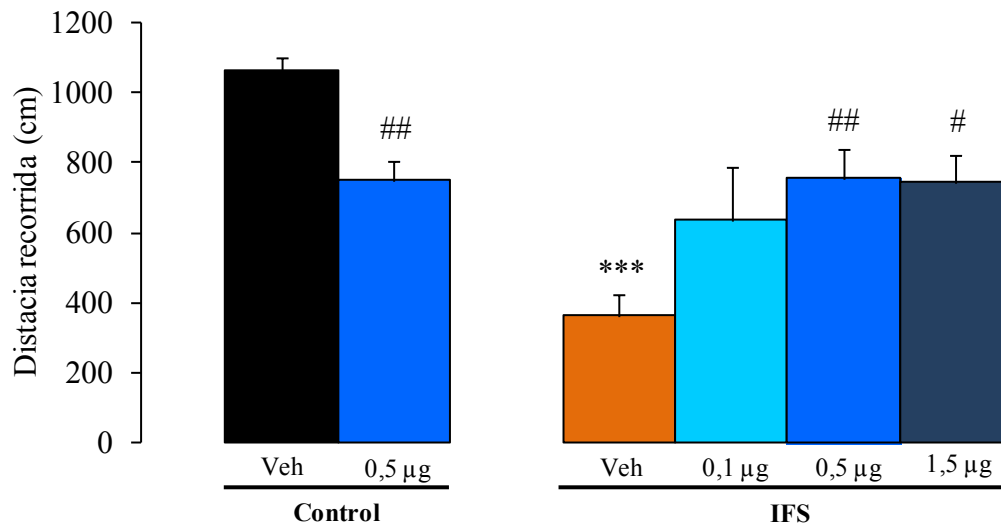


Figura R18. Actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS tras la inyección en la amígdala de propranolol (0,1, 0,5 y 1,5 μg). La inyección tiene lugar 1 hora antes del test. Los datos (media \pm EEM) se representan como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra entre paréntesis.

A) Actividad horizontal 5 minutos



B) Actividad horizontal 5 minutos

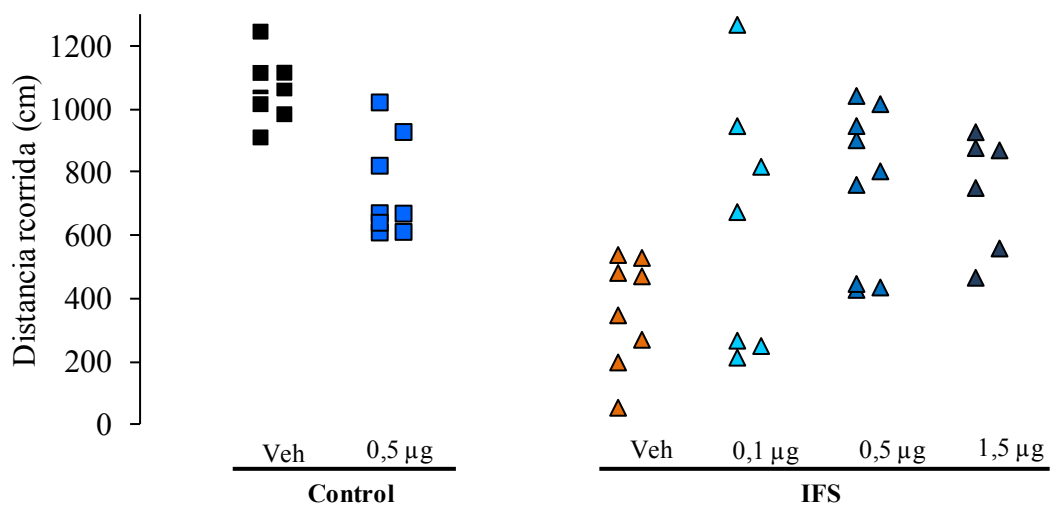


Figura R19. Efecto de la inyección en la amígdala de propranolol (0,1 0,5 y 1,5 µg) sobre la reducción de actividad motora horizontal producida por la exposición a IFS en los 5 primeros minutos del test (A). Dispersión de los valores de actividad motora de cada animal (cada punto representa un animal) durante los 5 primeros minutos del test (B). La inyección tiene lugar 1 hora antes del test. Los datos (media ± EEM) se representan como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra entre paréntesis. *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparados con sus respectivos grupos tratados con vehículo.

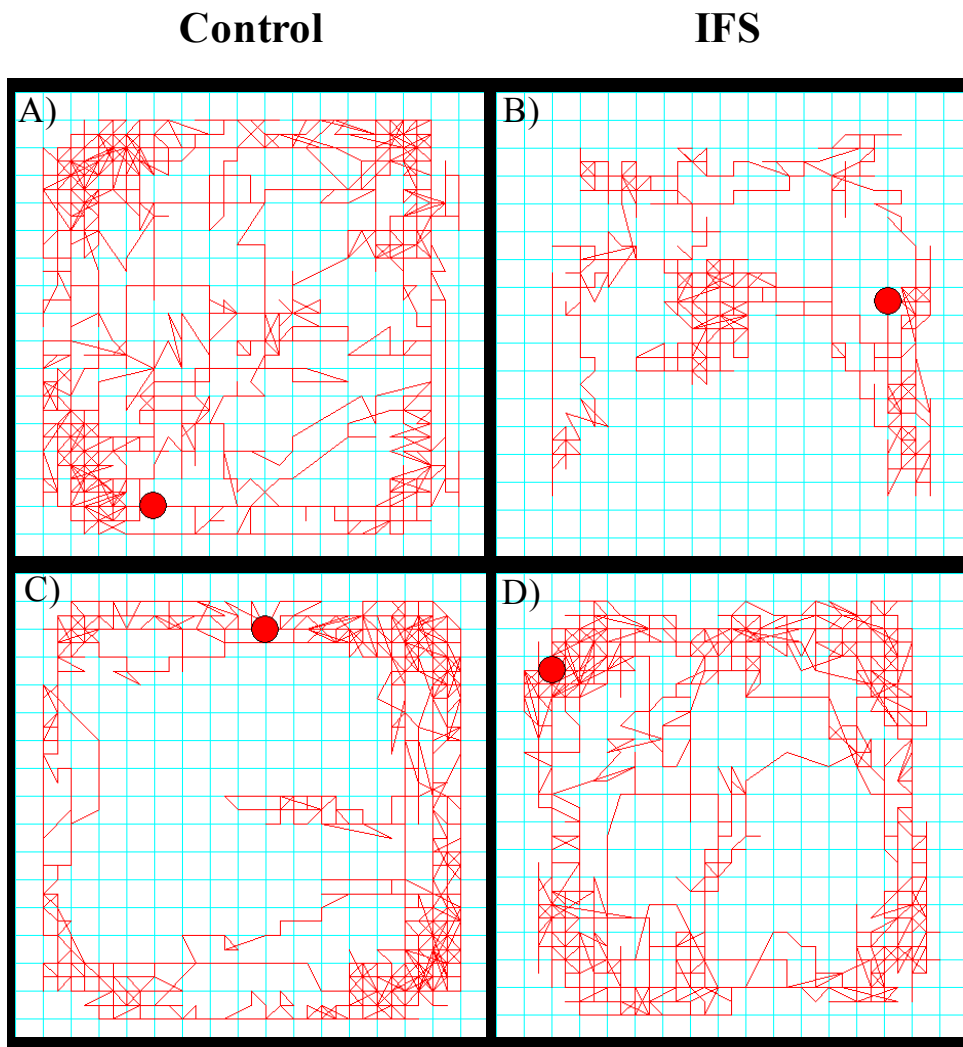


Figura R20. Ejemplos representativos de la actividad motora durante los 5 primeros minutos en el campo abierto de animales control y expuestos a IFS tratados con vehículo (A y B) y propranolol (C y D) 1 hora antes del test.

3.4 Efecto de la inyección del agonista β -adrenérgico clenbuterol y de noradrenalina en la amígdala sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control.

Las Figuras R21 y R22 muestran el efecto de la inyección local del agonista β -adrenérgico clenbuterol (30 ng) y de noradrenalina (1 μ g) sobre la actividad motora horizontal durante 60 minutos en un campo abierto (Figura R21) y durante los 5 primeros minutos de actividad en el test (Figura R22) en animales control.

El ANOVA de dos vías para el análisis de los efectos de la inyección local en la amígdala de clenbuterol y noradrenalina mostró un efecto significativo del factor Tiempo ($F_{11,176} = 50,54$; $p < 0,001$), pero no del factor Tratamiento ($F_{1,16} = 1,24$; $p = 0,315$) ni una interacción entre ambos factores ($F_{22,176} = 1,54$; $p = 0,067$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas no mostró diferencias significativas en la actividad motora durante los 5 primeros minutos del test tras la inyección de clenbuterol ($F_{1,16} = 0,59$; $p = 0,452$) ni de noradrenalina ($F_{1,16} = 0,003$; $p = 0,956$) comparados con el grupo control tratado con vehículo.

La Figura R22B muestra la dispersión de los valores de actividad motora representados en la Figura R212.

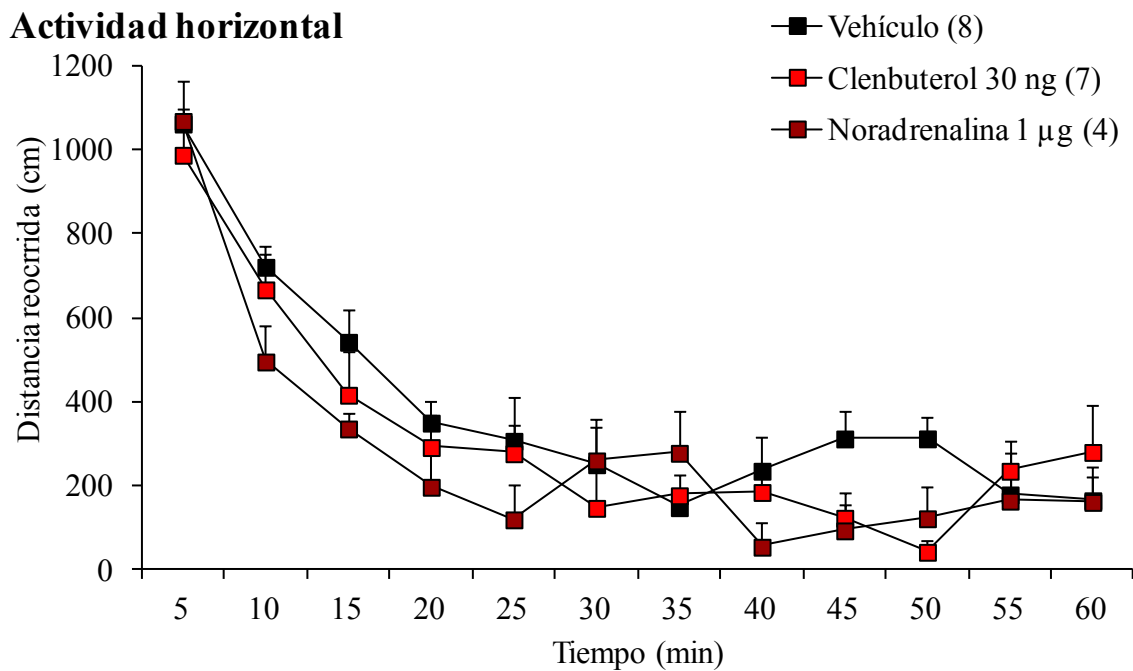


Figura R21. Actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control tras la inyección en la amígdala de clenbuterol (30 ng) y noradrenalina (1 µg) en animales control. La inyección tiene lugar 1 hora antes del test. Los datos (media ± EEM) se representan como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra entre paréntesis.

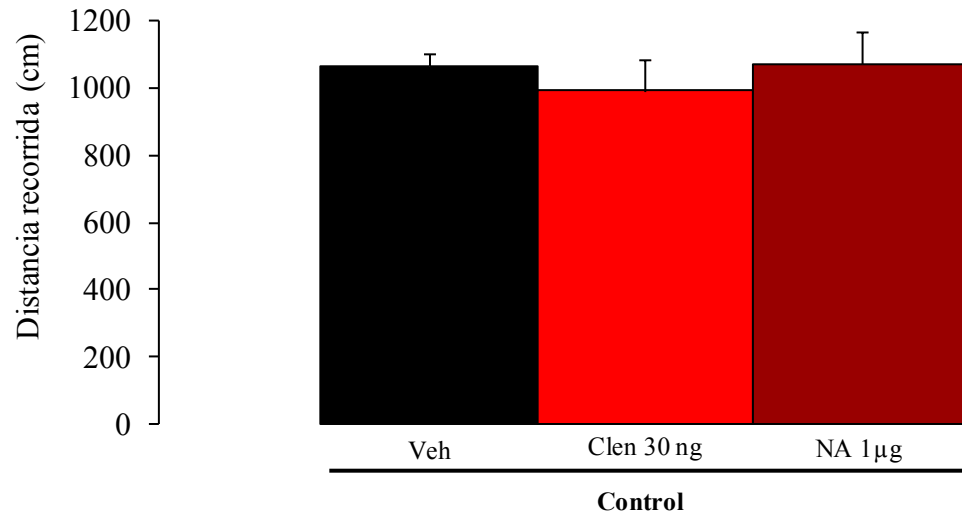
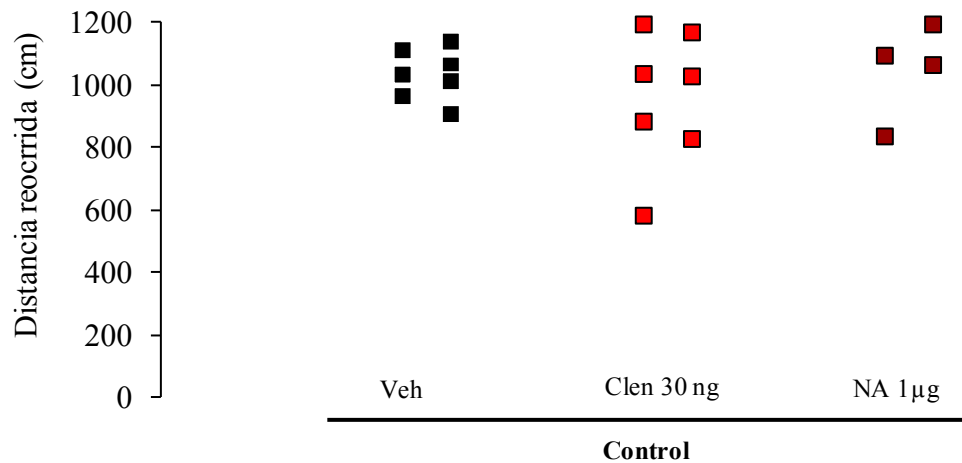
Actividad horizontal 5 minutos**Actividad horizontal 5 minutos**

Figura R22. Efecto de la inyección local en la amígdala de clenbuterol (30 ng) y noradrenalina (1 µg) sobre la actividad motora horizontal en animales control durante los 5 primeros minutos del test (A). Dispersión de los valores de actividad motora de cada animal (cada punto representa un animal). La inyección tiene lugar 1 hora antes del test. Los datos (media ± EEM) se representan como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra entre paréntesis.

3.5 Expresión de ARNm de receptores en la amígdala, la CPF y el hipocampo de animales control y expuestos a IFS.

La Figura R23 muestra los niveles de ARNm obtenidos mediante PCRq-RT de los receptores β -adrenérgicos (subtipos β_1 y β_2), receptores de glucocorticoides (GR y MR) y receptor de cannabinoides (CB1) en la amígdala (A), la CPF (B) y el hipocampo (C) de animales control y expuestos a IFS.

El test t de Student para el análisis de la expresión de ARNm en la amígdala de animales expuestos a IFS no mostró diferencias significativas en los niveles de β_1 ($t_{17}= 1,77$; $p= 0,095$), β_2 ($t_{16}= 0,12$; $p= 0,908$), GR ($t_{15}= 1,68$; $p= 0,114$), MR ($t_{14}= 0,28$; $p= 0,784$) y CB1 ($t_{16}= 0,54$; $p= 0,595$), comparados con el grupo control.

El test t de Student para el análisis de la expresión de ARNm en la CPF de animales expuestos a IFS no mostró diferencias significativas en los niveles de β_1 ($t_{15}= 0,91$; $p= 0,378$), ni del receptor β_2 ($t_{14}= 2,03$; $p= 0,062$); sin embargo, mostró una reducción significativa en los niveles de expresión de ARNm de los receptores GR ($t_{16}= 2,83$; $p= 0,012$) y MR ($t_{16}= 3,05$; $p= 0,008$) así como del receptor CB1 ($t_{16}= 2,18$; $p= 0,044$), comparados con el grupo control.

El test t de Student para el análisis de la expresión de ARNm en el hipocampo de animales expuestos a IFS mostró un incremento en la expresión de ARNm del receptor β_1 ($t_{13}= 2,52$; $p= 0,026$) y β_2 ($t_{13}= 2,25$; $p= 0,043$); pero no mostró diferencias significativas en los niveles de ARNm de GR ($t_{12}= 1,66$; $p= 0,124$) y MR ($t_{14}= 0,28$; $p= 0,784$) ni en el receptor CB1 ($t_{14}= 0,71$; $p= 0,487$), comparados con el grupo control.

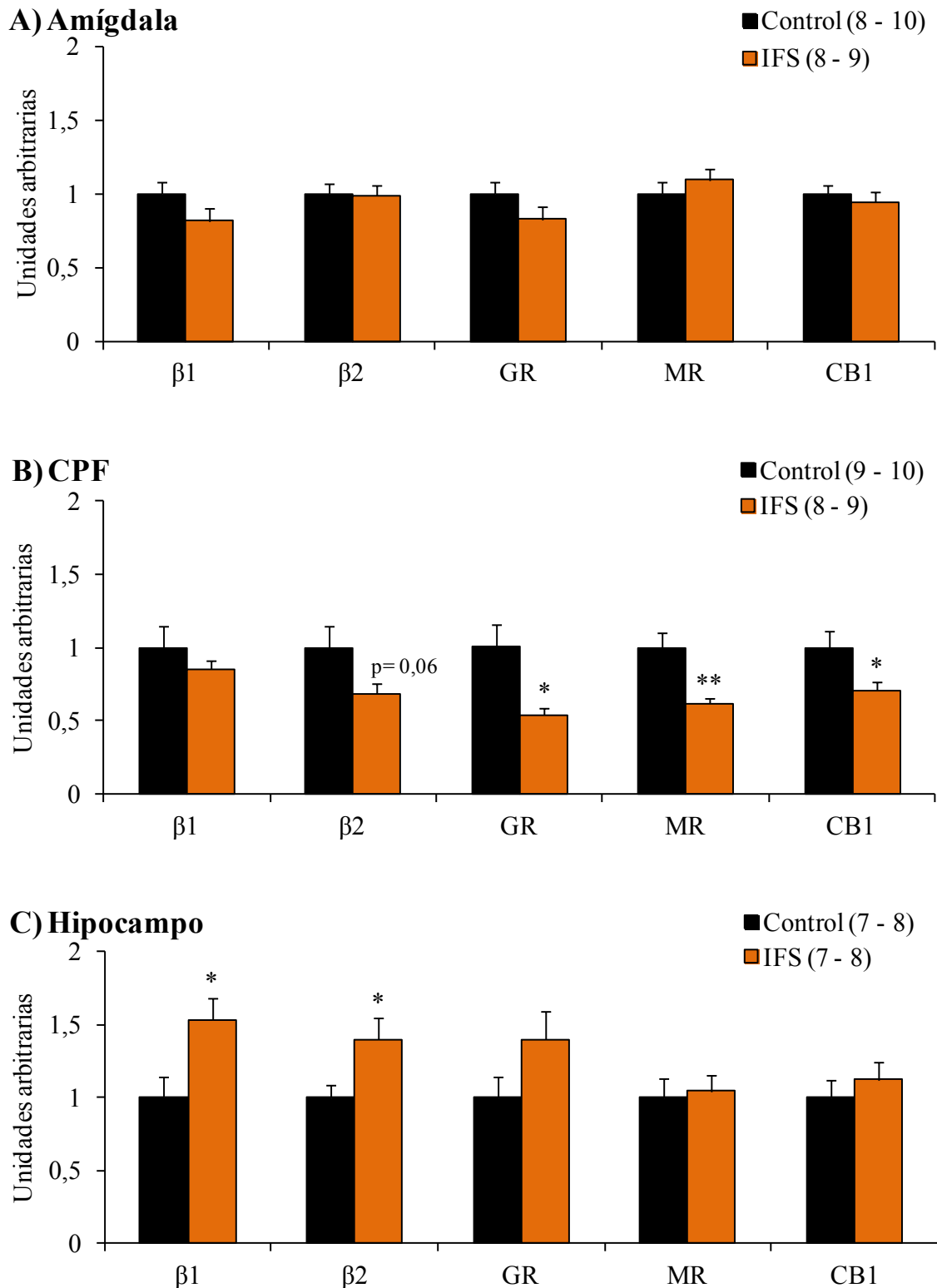


Figura R23. Efecto de la exposición a IFS sobre la expresión de ARNm de receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$, receptores de glucocorticoides GR y MR y receptor CB1 en la amígdala (A), la CPF medial (B) y el hipocampo dorsal (C) de la rata. Los datos (media \pm EEM) se muestran en unidades arbitrarias. El número de animales se muestra en paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con el grupo de animales control.

3.6 Efecto del EA sobre la actividad motora espontánea en respuesta a novedad en animales control y expuestos a IFS.

Las figuras R24 y R25 muestran el efecto del mantenimiento de los animales en EA (durante 21 días) sobre la actividad motora horizontal durante 60 minutos (Figura R23) y durante los 5 primeros minutos del test (Figura R24) en animales control y expuestos a IFS.

El ANOVA de tres vías para el análisis de los efectos del EA sobre la actividad motora horizontal en animales expuestos a IFS mostró un efecto significativo del factor Grupo ($F_{1,38} = 30,77$; $p < 0,001$), del factor Trauma ($F_{1,38} = 4,76$; $p = 0,035$) y del factor Tiempo ($F_{1,418} = 35,91$; $p < 0,001$) así como la interacción entre los factores Grupo y Trauma ($F_{1,38} = 4,20$; $p = 0,047$), los factores Grupo y Tiempo ($F_{1,418} = 4,07$; $p < 0,001$) y los factores Trauma y Tiempo ($F_{1,418} = 12,23$; $p < 0,001$) y una interacción entre todos los factores ($F_{1,418} = 1,88$; $p = 0,406$). El análisis más detallado de comparaciones planeadas de la actividad motora durante los 5 primeros minutos del test mostró que el IFS redujo de forma significativa la actividad motora en los animales mantenidos en condiciones control ($F_{1,38} = 41,60$; $p < 0,001$) y en animales mantenidos en condiciones de EA ($F_{1,38} = 26,19$; $p < 0,001$), comparados con sus respectivos controles (animales no expuestos a IFS y mantenidos en condiciones control y de EA respectivamente). El análisis no mostró diferencias en la actividad motora entre los animales mantenidos en condiciones de EA y animales control expuestos a IFS ($F_{1,38} = 2,16$; $p = 0,150$). Por último, el EA no modificó la actividad motora de los animales durante los 5 primeros minutos del test ($F_{1,38} = 1,50$; $p = 0,228$), comparado con el grupo control (Figura R25A).

La Figura R25B muestra la dispersión de los valores de actividad motora representados en la Figura R25A. Destaca la mayor variabilidad individual mostrada por el grupo de animales expuestos a IFS y posteriormente mantenidos en EA, de manera que 5 de 14 animales presentaron una actividad motora en el rango de la observada en el grupo EA. Por el contrario, la actividad motora de todos los animales del grupo control expuesto a IFS fue menor a la observada en los animales del grupo no expuesto.

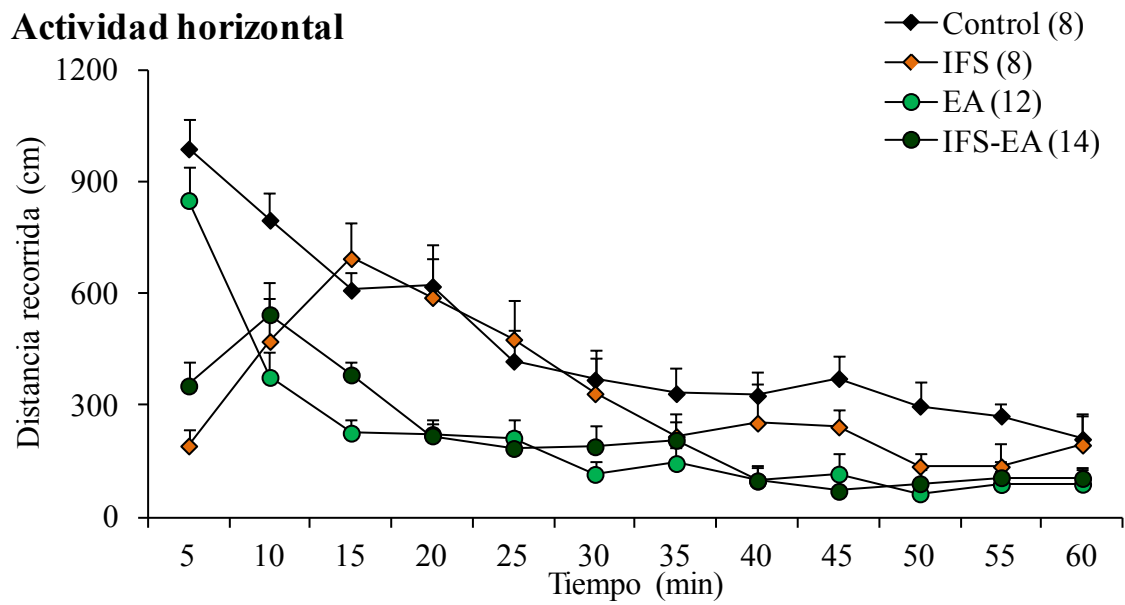
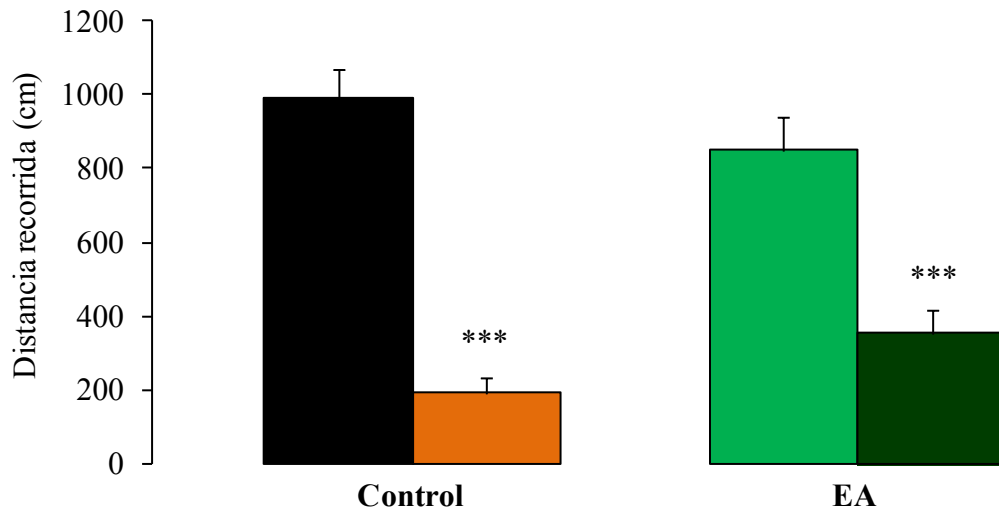


Figura R24. Actividad motora espontánea en respuesta a novedad (28 días tras la exposición a IFS) en animales control y mantenidos en EA durante 21. Los datos (media \pm EEM) se muestran como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra en paréntesis.

A) Actividad horizontal 5 minutos



B) Actividad horizontal 5 minutos

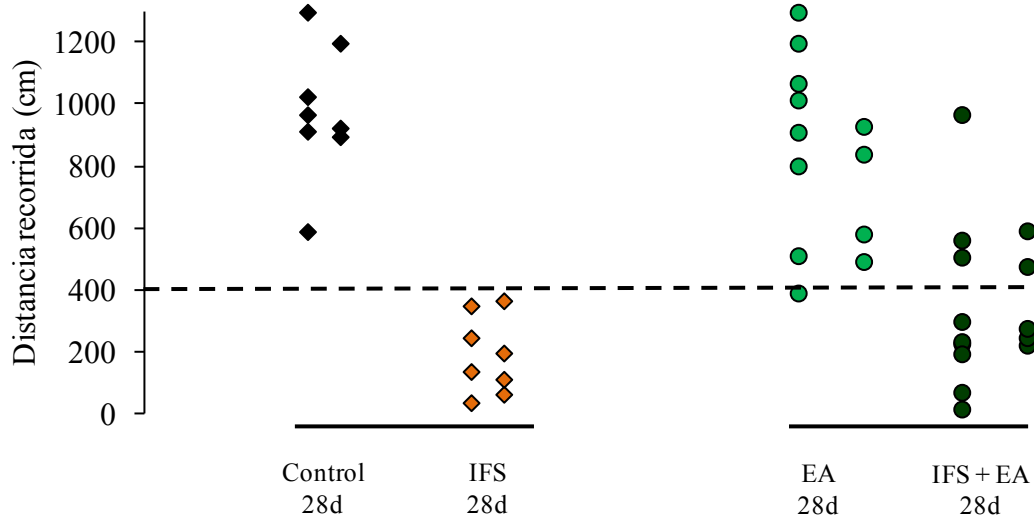


Figura R25. Efecto del mantenimiento en EA durante 21 días sobre la reducción en la actividad horizontal durante los 5 primeros minutos del test producida por la exposición a IFS(A). Dispersión de los valores de actividad motora representados en la figura A (B). Cada punto representa a cada uno de los animales. Los datos (media \pm EEM) se muestran como distancia recorrida en centímetros (cm). El número de animales se muestra en paréntesis. *** $p < 0,001$ comparado con los grupos de animales no expuestos a IFS.

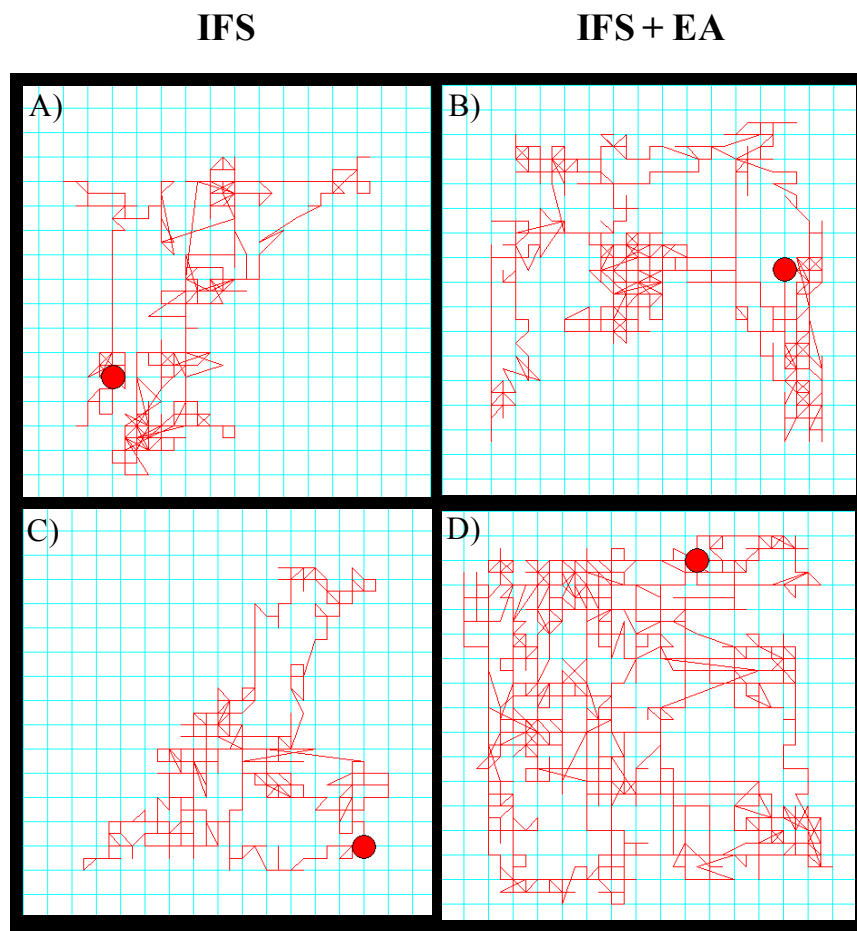


Figura R26. Ejemplos representativos de la actividad motora durante los 5 primeros minutos en el campo abierto de animales mantenidos en condiciones control (A y C) y de EA (B y D) expuestos 28 días antes a IFS. Los ejemplos representativos de los grupos mantenidos en condiciones control pueden observarse en la figura R15 control y expuesto a IFS (figuras C y D, respectivamente).

V. Discusión

Los resultados más relevantes del presente bloque experimental fueron:

- 1) La exposición a IFS redujo la actividad motora durante los 5 primeros minutos del test de campo abierto a largo plazo (7 y 28 días).
- 2) La exposición a IFS incrementó la concentración extracelular estimulada por estrés de noradrenalina en la amígdala. Sin embargo, redujo la concentración extracelular basal de noradrenalina en amígdala.
- 3) La inyección local de propranolol (antagonista β -adrenérgico) en la amígdala contrarrestó la reducción de la actividad motora producida por la exposición a IFS.
- 4) La exposición a IFS alteró la expresión de ARNm de diversos receptores (receptores adrenérgicos β 1 y β 2, receptores de glucocorticoides GR y MR, y receptor cannabionide CB1) en las principales áreas que regulan la respuesta a estrés (CPF, hipocampo y amígdala).

Estos resultados sugieren que la exposición a IFS produce una sensibilización de las proyecciones noradrenérgicas desde el locus coeruleus dirigidas a la amígdala, que es responsable, al menos en parte, de la inmovilidad en respuesta a novedad (considerado como un índice de hipervigilancia).

Efecto de la exposición a IFS sobre la actividad motora en respuesta a novedad

Como se ha mostrado en la sección de resultados la exposición a IFS redujo la actividad motora en respuesta a novedad durante los 5 primeros minutos del test de campo abierto, sin embargo, no se aprecian diferencias en la actividad motora durante el resto del test. Estos resultados muestran que la exposición a IFS no produce una hipoactividad generalizada y coinciden con estudios previos en los que sugieren que la inmovilidad frente a la novedad podría considerarse como un índice de ansiedad, comparándolo con los síntomas de hipervigilancia observados en pacientes con TEPT (van Dijken *et al.*, 1992a, 1992b; Pijlman & van Ree, 2002; Stam *et al.*, 2002; Geerse *et al.*, 2006; Hendriksen *et al.*, 2010; Pamplona *et al.*, 2011). Se ha sugerido que esta

inmovilidad en respuesta a novedad podría ser resultado de una generalización de memoria frente a la novedad, a través de asociación del estímulo traumático con el ambiente novedoso en el que ocurrió y encajarían con el menor número de entradas en el brazo oscuro en un test en cruz elevado (Radulovic et al., 1998; Daviu et al., 2010b). Sin embargo, resultados de inmovilidad similares han sido descritos en otros estudios que emplean el modelo de exposición a depredador como estrés traumático (Campos et al. 2013; Wang et al. 2012), en los que el animal tiende a permanecer más tiempo (y a entrar más veces) en los brazos cerrado en el test en cruz elevado (Cohen *et al.*, 2003, 2006).

Una de las principales críticas a esta alteración conductual es que podría representar un síntoma de indefensión aprendida, más característico de modelos de depresión. Sin embargo, tanto los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral como los mostrados por estudios previos (van Dijken *et al.*, 1992b; Stam *et al.*, 1995; Pijlman and & Ree, 2002) han mostrado que la inmovilidad en respuesta a novedad tiene lugar al inicio del test durante los 5-10 primeros minutos, por lo que no produce una hipoactividad generalizada. Por tanto, este hallazgo descarta tanto un efecto inespecífico del IFS sobre el sistema locomotor como alteraciones conductuales relacionadas con modelos de depresión (Liberzon *et al.*, 2005). Añadido a ello, los modelos de depresión que generan indefensión aprendida, requieren un tipo de estrés en donde haya más episodios o cuya duración sea mayor que la empleada en el modelo de IFS (Liberzon *et al.*, 2005).

La ausencia de variabilidad en la inmovilidad en respuesta a novedad mostrada en los resultados podría resultar contradictoria respecto a la incidencia del TEPT en humanos (en torno al 8% mundial). Sin embargo, algunos estudios han mostrado un incremento de la incidencia del TEPT en grupos poblacionales de riesgo (poblaciones en guerra, mujeres y menores), y también en función de la intensidad del trauma, elevándose hasta tasas del 40 % (de Jong *et al.*, 2001; Olaya *et al.*, 2015). Por otra parte, las condiciones experimentales en las que se desarrollan estos estudios implican una estandarización y homogeneización tanto de las condiciones de vida previa, como durante el desarrollo experimental, así como la homogeneización de las condiciones del estímulo traumático, que permiten la obtención de resultados más homogéneos, pero que sin embargo no reflejan la mayoría de las circunstancias que rodean una experiencia traumática en humanos. Diferentes grupos de investigación han desarrollado modelos experimentales

para el estudio de los posibles mecanismos neurales y moleculares implicados en la variabilidad en el desarrollo y mantenimiento de los síntomas de TEPT (Lebow *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2012).

Efectos de la exposición a IFS sobre la actividad noradrenérgica en la amígdala

La concentración extracelular de noradrenalina en respuesta a estrés moderado (restricción del movimiento 40 minutos) fue mayor en la amígdala de los animales expuestos a IFS. Estos resultados sugieren una mayor actividad de las proyecciones noradrenérgicas del locus coeruleus a la amígdala en animales IFS, y apoyan a estudios previos en los que muestran una alteración en la función de neuronas del locus en ratas previamente expuestas a un estímulo traumático (George *et al.*, 2013). Añadido a esto, otros estudios han mostrado una sensibilización del sistema noradrenérgico tras la exposición de los animales de experimentación a estrés crónico (Irwin *et al.*, 1986; Adell *et al.*, 1988; Nisenbaum *et al.*, 1991; Jedema & Grace, 2003). En el presente bloque experimental también se ha mostrado una reducción en los niveles basales de noradrenalina en animales expuestos a IFS; estos resultados contrastan con los mostrados en un estudio previo midiendo la concentración de noradrenalina en tejido (Hendriksen *et al.*, 2010), sin embargo concuerdan con otros estudios que muestran una reducción de la actividad noradrenérgica en condiciones basales en el locus coeruleus (George *et al.*, 2013) y se ha sugerido podrían ser consecuencia de una adaptación mediada por auto-receptores α_2 que actúan modulando la liberación de noradrenalina (Aghajanian & VanderMaelen, 1982; Strawn & Geraciotti, 2008).

Estudios previos han mostrado incrementos de noradrenalina (empleando el contenido de noradrenalina en homogeneizados de áreas cerebrales) en la CPF, el hipocampo (Wilson *et al.*, 2014), así como un incremento en la tasa de recambio en la amígdala (analizando la concentración de metabolitos de noradrenalina) (Tsuda *et al.*, 1986) en animales previamente expuestos a trauma. A diferencia de estos estudios, nuestros resultados muestran por primera vez variaciones en la dinámica de la transmisión noradrenérgica en la amígdala debido a la experiencia del IFS, y constituyen una evidencia directa que apoya la hipótesis de una sensibilización del sistema noradrenérgico tras la exposición a una experiencia traumática.

Por otra parte, no se observan cambios en la liberación de noradrenalina en amígdala en respuesta a estrés en animales control, a pesar de que estos han sido descritos anteriormente empleando distintos estímulos estresantes (Tanaka *et al.*, 1991; Galvez 1996; McIntyre *et al.*, 2002). Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la intensidad del estímulo estresante siendo el empleado por el presente estudio más moderado. De hecho, se han descrito variaciones en los incrementos de noradrenalina en amígdala en función de la intensidad del estímulo estresante (shock eléctrico) que reciben los animales (Quirarte *et al.*, 1998); Además, estos experimentos se realizaron durante el periodo de actividad (fase oscura) de los animales, en donde se ha demostrado que el estrés agudo genera una menor respuesta del eje HHA (Retana-Márquez *et al.*, 2003). Otra posibilidad reside en el hecho de que la manipulación experimental de los animales (cirugía, habituación al experimentador exposición al test de evitación pasiva...) puede estar relacionada con una desensibilización en respuesta a un estímulo estresante de similar naturaleza, aunque los mecanismos de acción no están claros (Armario *et al.*, 2004, 2008).

Alteraciones conductuales de la exposición a IFS y hiperactividad noradrenérgica en la amígdala.

Teniendo en cuenta el incremento de liberación noradrenérgica producido por la exposición a IFS, se investigó si estos cambios podrían estar mediando en la inmovilidad en respuesta a novedad producidos por la exposición a IFS. La inyección local en la amígdala del antagonista β -adrenérgico propranolol, contrarrestó la inmovilidad en respuesta a novedad de animales expuestos a IFS. Estos resultados apoyan estudios previos en animales que muestran una reducción de la respuesta excesiva a sobresalto (otro síntoma relacionado con hipervigilancia) tras la inyección sistémica de fármacos que actúan como bloqueantes de la transmisión noradrenérgica (Olson *et al.*, 2011). Diversos autores, basados en evidencias indirectas, han implicado una excesiva actividad noradrenérgica en la amígdala como posible responsable, al menos en parte, del desarrollo y persistencia de alguno de los síntomas de hipervigilancia y ansiedad en el TEPT (Southwick *et al.*, 1993,1999a,1999b; Strawn & Geraciotti, 2008; Pitman *et al.*, 2012).

Es importante destacar que el efecto del propranolol en animales IFS no es un efecto inespecífico de la droga. La inyección local de propranolol en animales control tuvo un efecto contrario al obtenido en animales IFS ya que redujo significativamente la actividad motora en respuesta a novedad. Estos resultados confirman que el efecto del propranolol sobre la reducción de la inmovilidad en respuesta a novedad de animales IFS se debe al bloqueo de la excesiva transmisión noradrenérgica en la amígdala de estos animales y constituyen una evidencia directa de la implicación de una excesiva transmisión noradrenérgica en la amígdala como responsable de las alteraciones conductuales producidos por el IFS.

Para comprobar si el incremento de la transmisión noradrenérgica en la amígdala, por sí solo, en ausencia de un estímulo traumático puede ser responsable de la conducta de inmovilidad observada, se llevaron a cabo inyecciones locales en la amígdala de agonistas adrenérgicos en animales control. Como se muestra en el apartado 3.6 de la sección de resultados, las inyecciones locales tanto de clenbuterol (agonista adrenérgico que estimula preferentemente a receptores β_2) como de noradrenalina, no modificaron la actividad motora en respuesta a novedad de estos animales. Estos resultados son interesantes, puesto que sugieren que un incremento de la actividad noradrenérgica en la amígdala no es suficiente para inducir los síntomas de hipervigilancia y que por tanto son necesarias la alteración de componentes post-sinápticos de la transmisión noradrenérgica o de otros neurotransmisores en la amígdala (Harada *et al.*, 2008; Pitman *et al.*, 2012; Bailey *et al.*, 2013). Añadido a esto, también podrían ser necesaria la alteración de la propia transmisión noradrenérgica en otras regiones cerebrales de esos animales (Pitman *et al.*, 2012; Arnsten *et al.*, 2015).

En este contexto, se evaluó la expresión de ARN de los receptores β_1 y β_2 así como de los receptores de glucocorticoides GR y MR y del receptor de endocannabinoides CB1 en la amígdala de animales expuestos a IFS. Como se muestra en la sección de resultados. La exposición a IFS no produjo cambios en la expresión ARNm de estos receptores medidos en la amígdala de los animales expuestos a IFS. Estos resultados sugieren en primer lugar, que los que los síntomas de hipervigilancia (inmovilidad frente a novedad) producidos por el incremento de la actividad noradrenérgica en la amígdala no están mediados por un incremento en la expresión de receptores β -

adrenérgicos en la amígdala de estos animales. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de GR y MR en esta áreas, lo cual coincide con estudios previos en los que se muestran alteraciones morfológicas en las neuronas de amígdala, sin cambios en la expresión de estos receptores (Cui *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha descrito una reducción en los niveles de expresión de ARNm de receptores CB1 en la amígdala de animales previamente expuestos a un depredador natural (Campos *et al.*, 2013a). Sin embargo, no se puede concluir que las alteraciones conductuales del IFS no se deban a la alteración en los receptores estudiados en la amígdala, ya que no se han medido cambios en la expresión proteica o en su funcionalidad..

Junto al estudio en la amígdala, también se evaluó la expresión de los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$, GR y MR y CB1 en la CPF y el hipocampo. En la CPF, la exposición a IFS redujo (aunque no de manera significativa) la expresión de ARNm de $\beta 1$ y $\beta 2$, y además redujo de forma significativa la expresión de GR y CB1 en esta región cerebral. La alteración en la expresión en estos receptores en la CPF resulta interesante, pues se ha descrito que la función del receptor CB1 y la interacción con GR facilitan la inhibición del eje HHA (Hill & Tasker, 2012) y de la amígdala, finalizando así la respuesta a estrés y reduciendo síntomas de ansiedad (McLaughlin *et al.*, 2014). En concordancia con otros resultados que describen una menor actividad de la CPF en estudios con animales previamente expuestos a trauma (Liang *et al.*, 2014), nuestros resultados sugieren que una reducción de la función de estos receptores podría estar relacionada con una menor capacidad de esta región para modular la actividad del eje HHA y de la amígdala en respuesta a estrés.

En el hipocampo, la exposición a IFS incrementó la expresión de ARNm de receptores $\alpha 1$ y $\beta 2$ y se ha sugerido que este incremento puede estar relacionado con el incremento en la transmisión noradrenérgica responsable de alteraciones conductuales de tras la exposición a un estrés traumático (O'Donnell *et al.*, 2004). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de GR, MR o CB1 en el hipocampo de animales expuestos a IFS. Estos resultados contrastan con otros estudios que muestran incrementos en la expresión de GR (Wang *et al.*, 2012; Ganon-Elazar & Akirav, 2013; Korem & Akirav, 2014; George *et al.*, 2015) y los han relacionado con el

incremento en la respuesta de retroalimentación negativa descrita en modelos animales de exposición a trauma y pacientes de TEPT (Yehuda, 2006a).

Efecto del EA sobre la inmovilidad en respuesta a novedad producido por la exposición a IFS

El EA reduce los efectos del estrés moderado y dichos estudios han mostrado cambios conductuales producidos por el EA (ver introducción y bloque experimental I). Se ha propuesto el modelo de EA como un posible tratamiento de patologías relacionadas con desórdenes de ansiedad como el TEPT (Hendriksen *et al.*, 2010) para probar la eficacia de tratamientos alternativos a los farmacológicos que en este síndrome/trastorno resultan parcialmente eficaces y en grupos reducidos de pacientes.

El mantenimiento de los animales en EA 21 durante días tras la exposición a IFS no contrarrestó los efectos de inmovilidad producidos por la exposición a trauma. Estos resultados sugieren que el EA no tiene efecto sobre las alteraciones conductuales producidas por IFS. En contra, otros investigadores han mostrado que el mantenimiento en condiciones de EA normaliza la inmovilidad producida por la exposición a IFS (Hendriksen *et al.*, 2010, 2012). Sin embargo, y al igual que estos estudios previos, el mantenimiento de los animales en EA aumentó la variabilidad individual de actividad motora en respuesta a novedad en los animales previamente expuestos a IFS (5 de 14 animales, lo que constituye un 36% de animales con una conducta similar a los no expuestos a IFS). Esta mayor variabilidad individual contrasta con los resultados mostrados por animales expuestos a IFS en los apartados anteriores donde la actividad motora de todos los animales fue menor a la del grupo control (no expuesto). Debido a esta gran variabilidad en el grupo de animales en EA y a nuestro reducido tamaño muestral el posible efecto del EA reduciendo la inmovilidad inducida por el IFS no alcanza la significación estadística en nuestro parámetro de conducta. Sería interesante analizar qué mecanismos neurobiológicos determinan esta variabilidad y, en consecuencia, la recuperación o no de las alteraciones conductuales provocadas por la exposición al IFS.

Consideraciones finales

En resumen, estos resultados sugieren que la alteración en la respuesta ante la novedad de los animales expuestos a IFS depende, al menos en parte, de una excesiva transmisión noradrenérgica en la amígdala. Sin embargo, el aumento de esta actividad noradrenérgica no es condición suficiente para inducir dicha alteración conductual. Una posible explicación, surge a partir de los resultados que muestran cambios en la expresión de receptores de noradrenalina y otros sistemas neurotransmisores en la CPF y en el hipocampo, lo cual implicaría a estas áreas junto a la amígdala en el desarrollo y/o mantenimiento de las alteraciones conductuales producidas por el IFS. Además estos resultados apoyarían a estudios previos en los que se muestra la necesidad de un periodo de incubación de entre 1 y dos semanas para alcanzar la máxima hiperreactividad en respuesta a novedad, lo cual sugiere la existencia de alteraciones a nivel de plasticidad de conexiones y encajaría con nuestros resultados (van Dijken *et al.*, 1992a; Servatius *et al.*, 1995). En línea con este hallazgo, la exposición a IFS produce una respuesta de inmovilidad ante la novedad a los 7 y 28 días tras la exposición. Añadido a esto, el mantenimiento de los animales expuestos a IFS en condiciones de EA incrementa la variabilidad en la respuesta a novedad, lo que sugiere que el EA puede emplearse como un modelo de tratamiento no farmacológico del TEPT.

***DISCUSIÓN GENERAL
DE RESULTADOS***

1. CPF y regulación de la respuesta a estrés a corto y largo plazo.

La CPF juega un papel fundamental en la flexibilidad conductual, que permite a los organismos adaptarse de manera óptima a cambios en el entorno. La región medial de la CPF actúa como un regulador fundamental de la respuesta a estrés, integrando la función de diversas áreas cerebrales y generando una respuesta conductual adaptativa y dependiente del contexto (Ulrich-Lai & Herman, 2009; Gonzalez *et al.*, 2013; McKlveen *et al.*, 2015). Sin embargo, no se conoce con detalle como la CPF lleva a cabo este proceso de regulación.

Los resultados del bloque experimental I de la presente Tesis Doctoral muestran que la región ventral de la CPF (corteza infralímbica) juega un papel facilitador de la actividad del eje HHA, potenciando la liberación de corticosterona en plasma durante la respuesta a un estrés agudo. Estos resultados, ponen en relieve el papel específico que juega esta región de la CPF en la modulación del eje HHA, y además apoyan la hipótesis de una función parcelada y complementaria de la CPF donde la región ventral facilita y la dorsal inhibe la activación del eje HHA ante un estímulo estresante (Radley *et al.*, 2006, 2012; Ulrich-Lai & Herman, 2009; Garrido *et al.*, 2012b). Estos resultados contrastan sin embargo con los obtenidos en el bloque II de la presente Tesis Doctoral en los que la activación de la corteza prelímbica mediante inyecciones del antagonista de receptores de NMDA CPP, no modificó la liberación de corticosterona inducida por estrés. Esta diferencia puede ser debida a que la dosis de 25 ng de CPP no es suficiente para activar las proyecciones que regulan la actividad del eje HHA.

Los resultados de los bloques I y II también aporta datos relevantes respecto a la modulación de la adquisición de memoria emocional por parte de la CPF. En concreto, se ha mostrado que cambios en la actividad de las cortezas infralímbica y prelímbica producen una alteración de la memoria aversiva a largo plazo cuando son evaluados a través de un test de evitación pasiva. En particular, la inhibición de la corteza infralímbica mediante inyecciones de muscimol redujo la memoria a largo plazo, sugiriendo que esta región potencia la adquisición de la memoria aversiva. Este hallazgo está en concordancia con otros estudios de lesiones en la región infralímbica usando el mismo test conductual para evaluar la memoria aversiva (Jinks & McGregor, 1997). Por el contrario, la estimulación de la corteza prelímbica mediante inyecciones de CPP

redujo la memoria a largo plazo. En un estudio previo del laboratorio se describió que la estimulación de la CPF prelímbica mediante inyecciones de picrotoxina reduce la memoria en el test de evitación pasiva (Garrido *et al.*, 2012b). Estos últimos resultados sugieren que la región prelímbica de la CPF tendría un papel inhibitor de la consolidación de la memoria de estímulos aversivos. En conjunto, los resultados muestran que las dos subregiones de la CPF, infralímbica y prelímbica juegan un papel complementario en la regulación de la adquisición de la memoria emocional. Esto sugiere

La regulación ejercida por la CPF de la respuesta del eje HHA a estrés a corto y largo plazo va a ser determinante en la adaptación fisiológica o en la respuesta mal-adaptativa al estrés. Los cambios en la liberación de corticosterona al torrente circulatorio en respuesta a estrés pueden modular la actividad neuronal en diversas áreas del cerebro y alterar la conducta (Reul & de Kloet, 1985; de Kloet *et al.*, 2008). Además, estudios recientes han mostrado que la corticosterona junto a otros moduladores como la noradrenalina liberados durante estrés agudo en la amígdala, actúan como facilitadores del almacenamiento de la memoria a largo plazo (Roozendaal *et al.*, 2006b, 2009b; Schwabe *et al.*, 2012) lo que convierte a la amígdala en un área clave para la adquisición y consolidación de la memoria emocional (Roozendaal *et al.*, 2009a). Sin embargo la inyección de CPP en la CPF redujo la memoria a largo plazo sin modificar la reactividad del eje HHA ni de las proyecciones noradrenérgicas a la amígdala en respuesta a estrés. Esto sugiere que esta alteración de la memoria emocional no depende de este sistema neurotransmisor ni tampoco que la corticosterona parezca estar implicado en este déficit de memoria. Por tanto, otros moduladores o vías neuronales entre la CPF y la amígdala o entre la CPF y otras áreas distintas de la amígdala serían responsables del efecto de la inyección del CPP en la consolidación de la memoria emocional (Yang & Liang, 2014).

En resumen, los resultados obtenidos en estos estudios respaldan la idea de que la CPF contribuye a la regulación de la respuesta a estrés por su papel tanto en la regulación del eje HHA como en el procesamiento emocional; y apoyan la hipótesis de que la alteración funcional de esta área cerebral puede ser la responsable de la una respuesta estrés aberrante que precipite los síntomas de psicosis en individuos vulnerables a esta patología.

2. Noradrenalina, amígdala y estrés traumático.

La noradrenalina en amígdala lleva a cabo diversas funciones, aunque se ha destacado su implicación en la regulación de la respuesta a estrés, y en la modulación de la memoria emocional. Debido a estas funciones, se ha relacionado una alteración en la actividad noradrenérgica con el desarrollo de patologías psiquiátricas como la psicosis y el TEPT (Galvez *et al.*, 1996; Southwick *et al.*, 1997, 1999b; Roozendaal *et al.*, 2009a).

En el bloque III de la presente Tesis Doctoral se ha empleado el modelo de IFS para investigar la relación entre las alteraciones conductuales producidas por la exposición a un estrés traumático y la transmisión noradrenérgica en amígdala. El IFS produce una reducción en la actividad motora espontánea en respuesta a novedad que han sido utilizados como índice de ansiedad para estudiar la hipervigilancia (Hendriksen *et al.*, 2010; Kinn Rød *et al.*, 2012; Liberzon *et al.*, 2005; van Dijken *et al.*, 1992a,1992b). Como se ha descrito en la sección de resultados, los animales expuestos a estrés traumático mostraron una alteración a largo plazo de la transmisión noradrenérgica en la amígdala en paralelo con la alteración de la respuesta motora ante la novedad. Además la inyección de antagonistas β -adrenérgicos en la amígdala de animales expuestos a estrés traumático contrarrestó la inmovilidad en respuesta a novedad de dichos animales. Estos resultados, apoyan resultados previos que muestran una reducción de las alteraciones conductuales y psicológicas producidas por la exposición a estrés traumático tras la administración sistémica de fármacos bloqueantes de la transmisión noradrenérgica (Raskind *et al.*, 2003; Vaiva *et al.*, 2003; Hoge *et al.*, 2012; Olson *et al.*, 2011) y constituyen una evidencia directa que apoya la implicación de una hiperactividad noradrenérgica en la amígdala como factor clave en el mantenimiento de alguna de las alteraciones conductuales asociadas a la exposición a estrés traumático.

La exposición a un estrés traumático puede producir alteraciones neurofisiológicas a largo plazo que se traducen en alteraciones conductuales que afectan a la capacidad de los individuos para adaptarse al medio cambiante en el que viven (Likhtik & Paz, 2015) lo que conlleva el posible desarrollo de enfermedades psiquiátricas como el TEPT (Pitman *et al.*, 2012). Los modelos animales de exposición a estrés traumático han mostrado alteraciones conductuales a largo plazo similares a las descritas en pacientes de TEPT y apuntan a la amígdala como principal implicado en el desarrollo y

mantenimiento de dichas alteraciones. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral apoyan el papel de la amígdala en el mantenimiento de los síntomas del TEPT, sin embargo, otras áreas del cerebro, como la CPF y el hipocampo, también están implicadas en las alteraciones del estrés traumático (O'Donnell *et al.*, 2004). De hecho, la alteración en la expresión de receptores en la CPF y el hipocampo de los animales expuestos a IFS apoyan la hipótesis esta hipótesis y podrían estar relacionadas con las alteraciones funcionales y estructurales descritas en estas áreas en pacientes de TEPT (Koenigs *et al.*, 2008; Koenigs & Grafman, 2009; Pitman *et al.*, 2012).

3. Enriquecimiento ambiental y estrés

El EA se ha descrito como un factor ambiental que induce cambios neurofisiológicos que inducen una menor reactividad a estrés e incrementa la capacidad de adaptación frente a estímulos aversivos (van Praag *et al.*, 2000; Larsson *et al.*, 2002). En este contexto los resultados obtenidos en el bloque experimental I sugieren que el EA potencia el control que ejerce la corteza infralímbica sobre el eje HHA, apoyando la hipótesis que asocia el incremento en la actividad de esta región cerebral en animales EA como responsable de la menor reactividad a estrés en estos animales (Fernández-Teruel *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001; Schrijver *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Sztainberg *et al.*, 2010). Otros estudios en consonancia con esta hipótesis son los que demuestran que el incremento de la resistencia a estrés de tipo social por parte de los animales mantenidos en EA es dependiente de las proyecciones de la corteza infralímbica sobre áreas límbicas (Lehmann & Herkenham, 2011). En esta línea, varios estudios apoyando esta hipótesis han asociado el incremento de la excitabilidad de la corteza infralímbica con el incremento de la extinción de la memoria aversiva (Mueller *et al.*, 2008; Kaczorowski *et al.*, 2012), lo cual encajaría con los resultados obtenidos de reducción de la latencia de entrada en animales de EA tras la re-exposición al el test de evitación pasiva.

El modelo de EA está siendo investigado como tratamiento de patologías psiquiátricas relacionadas con el estrés como el TEPT (Hendriksen *et al.*, 2010) dado que el tratamiento farmacológico de esta patología no es muy efectivo (Stein *et al.*, 2006, Stein *et al.*, 2007; Steckler & Risbrough, 2012). Los resultados de la presente Tesis Doctoral concuerdan con los obtenidos en estudios previos que muestran una tendencia a la

reducción de las alteraciones conductuales de los animales mantenidos en EA tras la exposición a IFS (Hendriksen *et al.*, 2010, 2012). Es interesante que el mantenimiento de los animales en EA aumentara la variabilidad individual de actividad motora en respuesta a novedad en los animales previamente expuestos a IFS. Esta variabilidad mimetiza lo observado en pacientes de TEPT tras la terapia cognitivo-conductual, lo que permitiría estudiar los mecanismos neurobiológicos de la respuesta a la terapia psicológica. Por tanto, el EA sería un modelo adecuado para ampliar el conocimiento de cómo funciona la terapia psicológica usada en pacientes de TEPT (Linden, 2006).

4. Interacción corteza prefrontal-amígdala-HHA: adaptación y mal-adaptación a estrés.

En las últimas décadas estudios clínicos y en animales de experimentación han puesto énfasis en el estudio de la interacción entre áreas del cerebro para los cambios neurofisiológicos que permiten generar respuestas adaptativas frente a estrés (Hermans *et al.*, 2011, 2014; Livneh & Paz, 2012; Cho *et al.*, 2013; Klavir *et al.*, 2013). Estos estudios proponen que las alteraciones en esta interacción pueden producir respuestas mal-adaptativas que conllevan el desarrollo de patologías psiquiátricas (Shin *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2006; Bremner *et al.*, 2008; Del Arco & Mora, 2009; Kim & Whalen, 2009; Meyer-Lindenberg, 2010; Hayes *et al.*, 2012; Likhtik & Paz, 2015).

La figura D1 ilustra la interacción funcional entre la CPF, la amígdala y el eje HHA de la que depende, en buena medida, la respuesta adaptativa a estrés y que ha sido objeto de investigación en esta Tesis Doctoral. El incremento de corticosterona producidos por estrés está modulado por la CPF, que además modula la memoria dependiente de la amígdala. A su vez, la memoria dependiente de la amígdala depende de los incrementos de los incrementos de corticosterona producidos por estrés. Sin embargo, tanto el estrés traumático como el crónico, pueden alterar la función y por tanto la interacción funcional entre estas áreas cerebrales, lo que puede conllevar el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como el TEPT. Así por ejemplo, el IFS produce alteraciones conductuales que son reflejo a su vez una alteración de la actividad noradrenérgica en la amígdala. El estrés traumático implica la alteración en otras áreas cerebrales a tenor de las alteraciones en la expresión de ARNm de diversos sistemas neurotransmisores y moduladores en la CPF, hipocampo de los animales expuestos a IFS y que podrían

deberse, en parte, a cambios epigenéticos. En este contexto, como se muestra en la figura superior, el EA se ha propuesto como un paradigma de resistencia a estrés ya que reduce la respuesta neuronal y conductual frente a estrés, alterando la transmisión neuroquímica en las áreas que conforman los circuitos cerebrales anteriormente descritos (Fox *et al.*, 2006; Segovia *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2012).

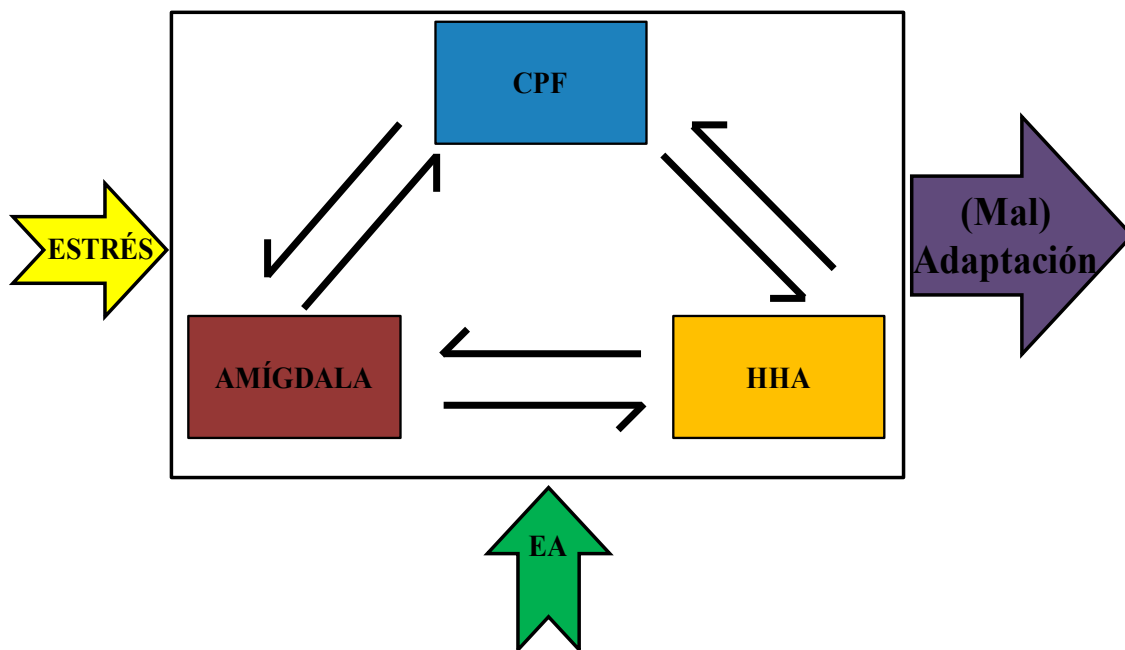


Figura D1. Representación esquemática de las interacciones funcionales estudiadas en la Tesis Doctoral que interaccionan y participan en la regulación de la respuesta a estrés. La actividad de estas interacciones puede verse afectada ante estímulos estresantes moderados generando una respuesta adaptativa a estrés. Sin embargo, el estrés traumático puede producir alteraciones en la actividad de estas áreas y por tanto en la funcionalidad entre los circuitos que se traducen en una respuesta mal-adaptativa estrés y pueden conllevar el desarrollo de patologías psiquiátricas como la psicosis y el TEPT. El EA es otro factor ambiental que puede modificar la funcionalidad entre estos circuitos y se ha destacado por su papel en la inducción de resistencia frente al estrés.

CONCLUSIONES

- 1) La corteza infralímbica juega un papel facilitador de la activación del eje HHA en respuesta a estrés y del procesamiento emocional de estímulos aversivos.
- 2) El EA potencia el control que ejerce la corteza infralímbica sobre el eje HHA y la liberación de corticosterona.
- 3) La hipofunción de los receptores NMDA en la CPF altera el procesamiento a largo plazo de la memoria de estímulos aversivos. Este déficit de memoria no está mediado por cambios en la activación de proyecciones noradrenérgicas a la amígdala ni del eje HHA en respuesta a estrés.
- 4) La exposición a estrés traumático produce una inmovilidad en respuesta a novedad a los 7 y 28 días tras la exposición a IFS, que sería análoga a los síntomas de hipervigilancia observados en pacientes con TEPT.
- 5) La alteración en la respuesta ante la novedad en los animales expuestos a IFS depende, al menos en parte, de una excesiva transmisión noradrenérgica en la amígdala. Sin embargo, el aumento de la actividad noradrenérgica en la amígdala no es condición suficiente para inducir dicha alteración conductual.
- 6) El IFS cambia la actividad noradrenérgica y de otros sistemas neurotransmisores en el hipocampo y la CPF, lo que indica que otras áreas cerebrales, además de la amígdala, contribuyen al desarrollo y/o mantenimiento de las alteraciones conductuales producidas por el IFS.
- 7) El mantenimiento de los animales expuestos a IFS en condiciones de EA incrementa la variabilidad en la respuesta a novedad, lo que sugiere que el EA puede emplearse como un modelo de tratamiento no farmacológico del TEPT.
- 8) Las alteraciones en la interacción entre la CPF, la amígdala y el hipocampo, producen respuestas mal-adaptativas al estrés (modificación de la actividad del eje HHA y del sistema noradrenérgico) que conllevan el desarrollo de patologías psiquiátricas como el TPET.

BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie ED, Keller RWJ, Zigmond MJ, (1988). Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27:897–904.
- Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ, (1989). Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 52:1655–1658.
- Abraham PA, Xing G, Zhang L, Yu EZ, Post R, Gamble EH, Li H, (2008). Beta1- and Beta2- adrenoceptor induced synaptic facilitation in rat basolateral amygdala. *Brain Res* 1209:65–73.
- 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* 50:1678–1681.
- Aghajanian GK, VanderMaelen CP, (1982). Alpha 2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* 215:1394–1396.
- Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, Fuxe K, (2010). Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 64:137–159.
- Akana SF, Chu A, Soriano L, Dallman MF, (2001). Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. *J Neuroendocrinol* 13:625–637.
- Amat J, Baratta M V, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF, (2005). Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8:365–371.
- Amir A, Amano T, Paré D, (2011). Physiological identification and infralimbic responsiveness of rat intercalated amygdala neurons. *J Neurophysiol* 105:3054–3066.
- Andolina D, Maran D, Valzania A, Conversi D, Puglisi-Allegra S, (2013). Prefrontal/amygdalar system determines stress coping behavior through 5-HT/GABA connection. *Neuropsychopharmacology* 38:2057–2067.
- Anticevic A, Tang Y, Cho YT, Repovs G, Cole MW, Savic A, Wang F, Krystal JH, Xu K, (2013). Amygdala connectivity differs among chronic, early course, and individuals at risk for developing schizophrenia. *Schizophr Bull* 40:1105–1116.
- Aoki C, Venkatesan C, Kurose H, (1998). Noradrenergic modulation of the prefrontal cortex as revealed by electron microscopic immunocytochemistry. *Adv Pharmacol* 42:777–780.

- Armario A, Martí O, Vallès A, Dal-Zotto S, Ons S, (2004) Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: neurobiologic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1018:162–172.
- Armario A, Escorihuela RM, Nadal R, (2008). Long-term neuroendocrine and behavioral effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1121–1135.
- Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, (1984) Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey. *Brain Res* 306:9–18.
- Arnsten AF, (1998) The Biology of Being Frazzled. *Science* (80) 280:1711–1712.
- Arnsten AF, (2000) Through the Looking Glass: Differential Noradrenergic Modulation of Prefrontal Cortical Function. *Neural Plast* 7:133–146.
- Arnsten AF, Raskind MA, Taylor FB, Connor DF, (2015). The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Stress* 1:89–99.
- Asan E, (1998). The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 142:1–118.
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J, (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* 46:1309–1320.
- Aston-Jones G, (2005). Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med* 6:3–7.
- Atsak P, Hauer D, Campolongo P, Schelling G, Fornari RV, Roozendaal B, (2014). Endocannabinoid signaling within the basolateral amygdala integrates multiple stress hormone effects on memory consolidation. *Neuropsychopharmacology*: 1–31.
- Atucha E, Roozendaal B, (2015). The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory. *Front Behav Neurosci* 9:1–8.
- Bailey C, Cordell E, Sobin S, Neumeister A, (2013). Recent Progress in Understanding the Pathophysiology of Post-Traumatic Stress Disorder. *27:221–232*.
- Bandín S, Morona R, López JM, Moreno N, González A, (2014). Immunohistochemical analysis of Pax6 and Pax7 expression in the CNS of adult *Xenopus laevis*. *J Chem Neuroanat* 57-58:24–41.
- Baratta M V, Christianson DM, Gomez DM, Zarza CM, Amat J, Masini C V, Watkins LR, Maier SF, (2007). Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate conditioned but not innate fear. *Neuroscience* 146:1495–1503.

- Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M, (2006). Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res* 169:231–238.
- Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B, (2010). Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16655–16660.
- Baxter MG, Murray EA, (2002). The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 3:563–573.
- Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K, (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13:76–83.
- Berretta A, Pantazopoulos H, Caldera M, Pantazopoulos P, Paré D, (2005). Infralimbic cortex activation increases c-fos expression in intercalated neurons of the amygdala. *Neuroscience* 132:943–953.
- Berridge CW, Waterhouse BD, (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33–84.
- Birrell JM, Brown VJ, (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci* 20:4320–4324.
- Björklund A, Dunnett SB, (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202.
- Blanchard E, Kolb L, Prins A, Gates S, McCoy GC, (1991). Changes in plasma norepinephrine to combat-related stimuli among Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis* 179:371–373.
- Boscarino J, (1996). Posttraumatic stress disorder, exposure to combat, and lower plasma cortisol among Vietnam veterans: Findings and clinical implications. *J Consult Clin Psychol* 64:191–201.
- Bouchez G, Millan MJ, Rivet J-M, Billiras R, Boulanger R, Gobert A, (2012). Quantification of extracellular levels of corticosterone in the basolateral amygdaloid complex of freely-moving rats: a dialysis study of circadian variation and stress-induced modulation. *Brain Res* 1452:47–60.
- Bouton ME, (2002). Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 52:976–986.
- Brake WG, Flores G, Francis D, Meaney MJ, Srivastava LK, Gratton A, (2000). Enhanced nucleus accumbens dopamine and plasma corticosterone stress responses in adult rats with neonatal excitotoxic lesions to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 96:687–695.

- Bremner JD, Elzinga B, Schmahl C, Vermetten E, (2008). Structural and functional plasticity of the human brain in posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res* 167:171–186.
- Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J, (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 89:85–93.
- Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J, (2009). A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res* 197:125–137.
- Breuner CW, Orchinik M, (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99–112.
- Brunelin J, D'Amato T, Van Os J, Costes N, Saud Chagny MF, Saoud M, (2010). Increased left striatal dopamine transmission in unaffected siblings of schizophrenia patients in response to acute metabolic stress. *Psychiatry Res - Neuroimaging* 181:130–135.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ, (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53:871–880.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ, (2009). Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci* 29:8474–8482.
- Burns LH, Annett L, Kelly AE, Everitt BJ, Robbins TW, (1996). Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: Implications for limbic-striatal interactions. *Behav Neurosci* 110:60–73
- Campos AC, Ferreira FR, da Silva WA, Guimarães FS, (2013). Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms. *Neurosci Lett* 533:34–38.
- Carlsen J, Zaborszky L, Heimer L, (1985). Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: a combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 234:155–167.
- Carr DB, Sesack SR, (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20:3864–3873.
- Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ, (1986). Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 246:478–499.

- Cecchi M, Khoshbouei H, Morilak DA, (2002). Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. *Neuropharmacology* 43:1139–1147.
- Chang CH, Grace AA, (2013). Amygdala beta-noradrenergic receptors modulate delayed downregulation of dopamine activity following restraint. *J Neurosci* 33:1441–1450.
- Chapillon P, Manneché C, Belzung C, Caston J, (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* 29:41–46.
- Cho JH, Deisseroth K, Bolshakov VY, (2013). Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. *Neuron* 80:1491–1507.
- Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SBE, Letzkus JJ, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler MB, Müller C, Lüthi A, (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468:277–282.
- Civantos Calzada B, Aleixandre de Artiñano A, (2001). Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* 44:195–208.
- Clayton EC, Williams CL, (2000). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 112:151–158.
- Cohen H, Zohar J, Matar M, (2003). The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 3223:463–473.
- Cohen H, Zohar J, Gidron Y, Matar M a, 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, Kozlovsky N, Alona C, Matar M a, Joseph Z, (2012a). Animal model for PTSD: from clinical concept to translational research. *Neuropharmacology* 62:715–724.
- Cohen H, Liu T, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Mathé A, (2012b). The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37:350–363.
- Corcoran C, Walker E, Huot R, Mittal V, Tessner K, Kestler L, Malaspina D, (2003). The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset. *Schizophr Bull* 29:671–692.
- Corcoran KA, Quirk GJ, (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci* 27:840–844.

- Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TCM, Herry C, (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 505:92–96.
- Crawley JN, Evers JR, Paul SM, (1992). Polyamines inhibit N-methyl-D-aspartate antagonist-induced darting behavior in the rat prefrontal cortex. *Brain Res* 586:6–11.
- Cui H, Sakamoto H, Higashi S, Kawata M, (2008). Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience* 152:703–712.
- D’Esposito M, (2007). From cognitive to neural models of working memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:761–772.
- Dahlqvist P, Zhao L, Johansson IM, Mattson B, Johansson BB, Seckl JR, Olsson T, (1999). Environmental enrichment alters nerve growth factor-induced gene A and glucocorticoid receptor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience* 93:527–535.
- Dahlström A, Fuxe K, (1964). A Method for the Demonstration of Monoamine-Containing Nerve Fibres in the Central Nervous System. *Acta Physiol Scand* 60:293–294.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW, (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. In: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp 771–784.
- Dalley JW, Fryer TD, Brichard L, Robinson ESJ, Theobald DEH, Lääne K, Peña Y, Murphy ER, Shah Y, Probst K, Abakumova I, Aigbirhio FI, Richards HK, Hong Y, Baron J-C, Everitt BJ, Robbins TW, (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 315:1267–1270.
- Dallman MF, (2005). Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future. *Front Neuroendocrinol* 26:103–108.
- Daskalakis NP, Yehuda R, Diamond DM, (2013). Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 38:1895–1911.
- Davis M, Rainnie D, Cassell M, (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208–214.
- 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.
- De Blas M, (2011). Glucocorticoides e interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens: efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento.

- De Bruin JP, (1990). Social behaviour and the prefrontal cortex. Uylings HBM, Van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, eds. *Prog Brain Res* 85:485–496; discussion 497.
- De Groote L, Linthorst ACE, (2007). Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience* 148:794–805.
- De Jong JT, Komproe IH, Van Ommeren M, El Masri M, Araya M, Khaled N, van De Put W, Somasundaram D, (2001). Lifetime events and posttraumatic stress disorder in 4 postconflict settings. *JAMA* 286:555–562.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M, (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269–301.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M, (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422–426.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F, (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463–475.
- De Kloet ER, (2008). About stress hormones and resilience to psychopathology. *J Neuroendocrinol* 20:885–892.
- De Kloet ER, Karst H, Joëls M, (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29:268–272.
- De Oliveira AR, Reimer AE, Reis FMC V, Brandão ML, (2013). Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:379–389.
- De Quervain DJF, Roozendaal B, McGaugh JL, (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787–790.
- De Quervain DJF, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B, (2009). Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358–370.
- DeFelipe J, Fariñas I, (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563–607.
- Del Arco A, Mora F, (2001). Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res Bull* 56:125–130.
- Del Arco A, Segovia G, Mora F, (2001). Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. *Neuroreport* 12:4019–4022.

- Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, De Blas M, García-Verdugo JM, Mora F (2007a). Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm* 114:43–48.
- Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F, (2007b). Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 176:267–273.
- Del Arco A, Mora F, (2008a). Prefrontal cortex-nucleus accumbens interaction: In vivo modulation by dopamine and glutamate in the prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 90:226–235.
- Del Arco A, Segovia G, Mora F, (2008b). Blockade of NMDA receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity. *Psychopharmacology (Berl)* 201:325–338.
- Del Arco A, Mora F, (2009). Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: Implications for plasticity and psychiatric disorders. *J Neural Transm* 116:941–952.
- Del Arco A, Ronzoni G, Mora F, (2011). Prefrontal stimulation of GABAA receptors counteracts the corticolimbic hyperactivity produced by NMDA antagonists in the prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 214:525–536.
- Del Arco A, Ronzoni G, Mora F, (2012). Prefrontal cortex NMDA antagonists and amygdala response to stress: Studies on dopamine, noradrenaline and corticosterone dialysate concentrations and aversive memory. 8th FENS Abstr.
- Deppermann S, Storchak H, Fallgatter AJ, Ehlis AC, (2014). Stress-induced neuroplasticity: (Mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD – A critical overview. *Neuroscience* 283:166–177.
- Deutch AY, Roth RH, (1990). The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. Uylings HBM, Van Eden CG, De Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, eds. *Prog Brain Res* 85:367–402; discussion 402–403.
- Devyllder JE, Ben-David S, Schobel SA, Kimhy D, Malaspina D, Corcoran CM, (2013). Temporal association of stress sensitivity and symptoms in individuals at clinical high risk for psychosis. *Psychol Med* 43:259–268.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ, (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13:3839–3847.
- Docherty JR, (1998). Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 361:1–15.
- Doherty MD, Gratton A, (1996). Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in freely-behaving rats. *Brain Res* 715:86–97.

- Doherty MD, Gratton A, (1999). Effects of medial prefrontal cortical injections of GABA receptor agonists and antagonists on the local and nucleus accumbens dopamine responses to stress. *Synapse* 32:288–300.
- Domínguez L, González A, Moreno N, (2015). Patterns of hypothalamic regionalization in amphibians and reptiles: common traits revealed by a genoarchitectonic approach. *Front Neuroanat* 9:3.
- Donoghue JP, Parham C, (1983). Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex. *J Comp Neurol* 217:390–404.
- Dunn JD, Whitener J, (1986). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42:211–217.
- Egorov AV, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O, (2006). Muscarinic control of graded persistent activity in lateral amygdala neurons. *Eur J Neurosci* 24:3183–3194.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herry C, Lüthi A, (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron* 62:757–771.
- Elliott BM, Grunberg NE, (2005). Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 165:187–196.
- Elzinga BM, Bremner JD, (2002). Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)? *J Affect Disord* 70:1–17.
- Etkin A, Wager TD, (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* 164:1476–1488.
- Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL, (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76:1057–1070.
- Fanselow MS, Poulos AM, (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* 56:207–234.
- Farb CR, Chang W, Ledoux JE, (2010). Ultrastructural characterization of noradrenergic axons and Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala. *Front Behav Neurosci* 4:162.
- Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, (1999). Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* 274:10100–10104.

- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF, (1995a). Novelty-induced increase in dopamine release in the rat prefrontal cortex in vivo: inhibition by diazepam. *Neurosci Lett* 189:81–84.
- Feenstra MG, van der Weij W, Botterblom MH, (1995b). Concentration-dependent dual action of locally applied N-methyl-D-aspartate on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex in vivo. *Neurosci Lett* 201:175–178.
- Felten DL, Sladek JR, (1983). Monoamine distribution in primate brain V. Monoaminergic nuclei: anatomy, pathways and local organization. *Brain Res Bull* 10:171–284.
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A, (1997). Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 27:513–526.
- Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A, (2002). Early-life handling stimulation and environmental enrichment. *Pharmacol Biochem Behav* 73:233–245.
- Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL, (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: A critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* 46:1140–1152.
- Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED, (1995). Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam. *Neuroscience* 64:619–628.
- Fischette CT, Komisaruk BR, Edinger HM, Feder HH, Siegel A, (1980). Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Res* 195:373–387.
- Floresco SB, Tse MT, (2007). Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J Neurosci* 27:2045–2057.
- Fox C, Merali Z, Harrison C, (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175:1–8.
- Friedman MJ, Resick PA, Bryant RA, Brewin CR, (2011). Considering PTSD for DSM-5. *Depress Anxiety* 28:750–769.
- Fudge JL, Emiliano AB, (2003). The extended amygdala and the dopamine system: another piece of the dopamine puzzle. *JNeuropsychiatry Clin Neurosci* 15:306–316.
- Fusar-Poli P, Howes OD, Allen P, Broome M, Valli I, Asselin M-C, Montgomery AJ, Grasby PM, McGuire P, (2011). Abnormal prefrontal activation directly related to

- pre-synaptic striatal dopamine dysfunction in people at clinical high risk for psychosis. *Mol Psychiatry* 16:67–75.
- Fuster JM, (1997). *The prefrontal cortex. Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe.* New York: Lippincott-Raven.
- Fuster JM, (2000). Executive frontal functions. *Exp Brain Res* 133:66–70.
- Fuster JM, (2009). *The Prefrontal Cortex, Fourth edition.* London: Academic Press.
- Fuxe K, Goldstein M, Hökfelt T, Joh TH (1970) Immunohistochemical localization of dopamine- β -hydroxylase in the peripheral and central nervous system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1:627–636.
- Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcellino D, Jansson A, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Jacobsen K, Tinner-Staines B, Hagman B, Leo G, Staines W, Guidolin D, Kehr J, Genedani S, Belluardo N, Agnati LF, (2007). From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: Wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 55:17–54.
- Gabbott PLA, Warner T, Jays PRL, Salway P, Busby SJ, (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145–177.
- Galvez R, Mesches MH, McGaugh JL, (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 66:253–257.
- Ganon-Elazar E, Akirav I, (2013). Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. *Psychoneuroendocrinology* 38:1675–1687.
- Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F, (2012a). Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiol Aging* 33:375–382.
- Garrido P, De Blas M, Giné E, Santos Á, Mora F, (2012b). Aging impairs the control of prefrontal cortex on the release of corticosterone in response to stress and on memory consolidation. *Neurobiol Aging* 33:827.e1–e9.
- Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, Santos a, Del Arco a, Segovia G, Mora F, (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *J Neural Transm* 120:829–843.
- Gaykema RP, van Weeghel R, Hersh LB, Luiten PG, (1991). Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain. *J Comp Neurol* 303:563–583.

- Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS, (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* 27:5730–5743.
- George TP, Verrico CD, Xu L, Roth RH (2000) Effects of repeated nicotine administration and footshock stress on rat mesoprefrontal dopamine systems: evidence for opioid mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 23:79–88.
- George S a, Knox D, Curtis AL, Aldridge JW, Valentino RJ, Liberzon I, (2013). Altered locus coeruleus-norepinephrine function following single prolonged stress. *Eur J Neurosci* 37:901–909.
- George S, Rodriguez-Santiago M, Riley J, Rodriguez E, Liberzon I,(2015). The effect of chronic phenytoin administration on single prolonged stress induced extinction retention deficits and glucocorticoid upregulation in the rat medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 232:47–56.
- George TP, Verrico CD, Xu L, Roth RH, (2000). Effects of repeated nicotine administration and footshock stress on rat mesoprefrontal dopamine systems: evidence for opioid mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 23:79–88.
- Geerse GJ, van Gurp LC, Wiegant VM, Stam R, (2006). Individual reactivity to the open-field predicts the expression of cardiovascular and behavioural sensitisation to novel stress. *Behav Brain Res* 175:9–17.
- Gerrits M, Westenbroek C, Fokkema DS, Jongsma ME, Den Boer J a., Ter Horst GJ, (2003). Increased stress vulnerability after a prefrontal cortex lesion in female rats. *Brain Res Bull* 61:627–635.
- Gilmartin MR, Helmstetter FJ, (2010). Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learn Mem* 17:289–296.
- Gloor P, Olivier A, Quesney LF, ANdermann F, Horowitz S, (1982). The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 12:129–144.
- Glover DA., Poland RE, (2002). Urinary cortisol and catecholamines in mothers of child cancer survivors with and without PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 27:805–819.
- Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F, (2015). Environmental enrichment for adult rats: Effects on trait and state anxiety. *Neurosci Lett* 584:93–96.
- Gold AL, Shin LM, Orr SP, Carson MA., Rauch SL, Macklin ML, Lasko NB, Metzger LJ, Dougherty DD, Alpert NM, Fischman AJ, Pitman RK, (2011). Decreased regional cerebral blood flow in medial prefrontal cortex during trauma-unrelated stressful imagery in Vietnam veterans with post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 41:2563–2572.

- Gold PE, (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 46:87–98.
- Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH, (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci* 16:4787–4798.
- Gonzalez C, Kramar C, Garagoli F, Rossato JI, Weisstaub N, Cammarota M, Medina JH, (2013). Medial prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiol Learn Mem* 103:19–25.
- Gordon JA, (2010). Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 13:2–4.
- Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DE, Birnbaum SG, Graham AR, Unterberg S, Graham DL, Vialou V, Bass CE, Terwilliger EF, Bardo MT, Nestler E, (2010). Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol Psychiatry* 67:28–35.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M, (2011). Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol* 209:153–167.
- Groenewegen HJ, Uylings HBM, (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. In: *Progress in Brain Research*, pp 3–28.
- Grunze HCR, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW, Greene RW, (1996). NMDA-Dependent Modulation of CA1 Local Circuit Inhibition. *J Neurosci* 16:2034–2043.
- Halgren E, Walter RD, Cherlow DG, Crandall PH, (1978). Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. *Brain* 101:83–117.
- 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* 89:11–16.
- Harrington J, Perry IJ, Lutomski J, Fitzgerald AP, Shiely F, McGee H, Barry MM, Van Lente E, Morgan K, Shelley E, (2010). Living longer and feeling better: Healthy lifestyle, self-rated health, obesity and depression in Ireland. *Eur J Public Health* 20:91–95.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ, (2002). Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454:15–33.

- Hayes JP, Hayes SM, Mikedis AM, (2012). Quantitative meta-analysis of neural activity in posttraumatic stress disorder. *Biol Mood Anxiety Disord* 2:9 Available at: *Biology of Mood & Anxiety Disorders*.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ, (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:555–579.
- Hendriksen H, Prins J, Olivier B, Oosting RS, (2010). Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. *PLoS One* 5:e11943.
- Hendriksen H, Bink DI, Daniels EG, Pandit R, Piriou C, Slieker R, Westphal KGC, Olivier B, Oosting RS, (2012). Re-exposure and environmental enrichment reveal NPY-Y1 as a possible target for post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology* 63:733–742.
- Hendriksen H, Olivier B, Oosting RS, (2014). From non-pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder to novel therapeutic targets. *Eur J Pharmacol* 732:139–158.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, De Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR, (2006). Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393–411.
- Herman JP, Dolgas CM, Carlson SL, (1998). Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86:449–459.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE, (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151–180.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H, (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 29:1201–1213.
- Hermans EJ, van Marle HJ, Ossewaarde L, Henckens MJ, Qin S, van Kesteren MTR, Schoots VC, Cousijn H, Rijpkema M, Oostenveld R, Fernandez G, (2011). Stress-Related Noradrenergic Activity Prompts Large-Scale Neural Network Reconfiguration. *Science* (80) 334:1151–1153.
- Hermans EJ, Henckens MJ, Joëls M, Fernández G, (2014). Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends Neurosci* 37:304–314.
- Hernández LF, Segovia G, Mora F, (2008). Chronic treatment with a dopamine uptake blocker changes dopamine and acetylcholine but not glutamate and GABA

- concentrations in prefrontal cortex, striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *Neurochem Int* 52:457–469.
- Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR, (1995). Alpha and beta Adrenoceptors: From the Gene to the Clinic. 1. Molecular Biology and Adrenoceptor Subclassification. *J Med Chem* 38:3415–3444.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT-Y, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu Q song, Gorzalka BB, Hillard CJ, (2011). Recruitment of Prefrontal Cortical Endocannabinoid Signaling by Glucocorticoids Contributes to Termination of the Stress Response. *J Neurosci* 31:10506–10515.
- Hill MN, Tasker JG, (2012). Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204:5–16.
- Hoge E, Worthington JJ, Nagurney JT, Chang Y, Kay EB, Feterowski CM, Katzman AR, Goetz JM, Rosasco ML, Lasko NB, Zusman RM, Pollack MH, Orr SP, Pitman RK, (2012). Effect of acute posttrauma propranolol on PTSD outcome and physiological responses during script-driven imagery. *CNS Neurosci Ther* 18:21–27.
- Hökfelt T, Ljungdahl A, Fuxe K, Johansson O, (1974). Dopamine nerve terminals in the rat limbic cortex: aspects of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Science* (80) 184:177–179.
- Homayoun H, Moghaddam B, (2005). Bursting of prefrontal cortex neurons in awake rats is regulated by metabotropic glutamate 5 (mGlu5) receptors: rate-dependent influence and interaction with NMDA receptors. *Cereb Cortex* 16:93–105.
- Homayoun H, Moghaddam B, (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 27:11496–11500.
- Hoover WB, Vertes RP, (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149–179.
- Inglis FM, Moghaddam B, (1999). Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *J Neurochem* 72:1088–1094.
- Introini-Collison B, Ford LF& McGaugh JL, (1995). Memory impairment induced by intraamygdala B-endorphin is mediated by noradrenergic influences. *Neurobiol Learn Mem* 63:200–205.
- Irwin J, Ahluwalia P, Anisman H, (1986). Sensitization of norepinephrine activity following acute and chronic footshock. *Brain Res* 379:98–103.
- Izquierdo I, Netto CA, (1985). Factors that influence test session performance measured 0, 3, or 6 h after inhibitory avoidance training. *Behav Neural Biol* 43:260–273.

- Izquierdo L, Barros DM, da Costa JC, Furini C, Zinn C, Cammarota M, Bevilaqua LR, Izquierdo I, (2007). A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 88:160–166.
- Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B, (2004). NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8467–8472.
- Jacobson L, Zhang R, Elliffe D, Chen K-F, Mathai S, McCarthy D, Waldvogel H, Guan J, (2008). Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. *Exp Gerontol* 43:929–938.
- 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.
- Javitt DC, Zukin SR, (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148:1301–1308.
- Jedema HP, Grace AA, (2003). Chronic exposure to cold stress alters electrophysiological properties of locus coeruleus neurons recorded in vitro. *Neuropsychopharmacology* 28:63–72.
- Jentsch JD, Dazzi L, Chhatwal JP, Verrico CD, Roth RH, (1998). Reduced prefrontal cortical dopamine, but not acetylcholine, release in vivo after repeated, intermittent phencyclidine administration to rats. *Neurosci Lett* 258:175–178.
- Jentsch JD, Roth RH, (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: From NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20:201–225.
- Jinks AL, McGregor IS, (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res* 772:181–190.
- Jodo E, Chiang C, Aston-Jones G, (1998). Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 83:63–79.
- Joëls M, Krugers H, Karst H, (2008). Stress-induced changes in hippocampal function. *Prog Brain Res* 167:3–15.
- Joëls M, Baram TZ, (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459–466.
- Joëls M, Fernandez G, Roozendaal B, (2011). Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends Cogn Sci* 15:280–288.
- Johnston JB, (1923). Further contribution to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol* 35:337–481.

- Jolkkonen E, Pitkänen A, (1998). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the central nucleus. *J Comp Neurol* 395:53–72.
- Jones KR, Myers B, Herman JP, (2011). Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. *Physiol Behav* 104:266–271.
- Joven A, Morona R, González A, Moreno N, (2013). Spatiotemporal patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 expression in the developing brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 521:3913–3953.
- Kaczorowski CC, Davis SJ, Moyer JR, (2012). Aging redistributes medial prefrontal neuronal excitability and impedes extinction of trace fear conditioning. *Neurobiol Aging* 33:1744–1757.
- Kalsbeek a., van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E, (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 349:20–29.
- Kaouane N, Porte Y, Vallee M, Brayda-Bruno L, Mons N, Calandreau L, Marighetto A, Piazza PV, Desmedt A, (2012). Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science* (6075) 335:1510–1513.
- Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F, (2007). Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14843–14848.
- Kawahara H, Yoshida M, Yokoo H, Nishi M, Tanaka M, (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 162:81–84.
- Kazlauckas V, Pagnussat N, Mioranza S, Kalinine E, Nunes F, Pettenuzzo L, O.Souza D, Portela LV., Porciúncula LO, Lara DR, (2011). Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiol Behav* 102:475–480.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH, (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493–495.
- Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB, (1995). Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 52:1048–1060.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE, (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:593–602.
- Kim JJ, Diamond DM, (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453–462.

- Kim MJ, Whalen PJ, (2009). The structural integrity of an amygdala-prefrontal pathway predicts trait anxiety. *J Neurosci* 29:11614–11618.
- Kinn Rød AM, Milde AM, Grønli J, Jellestad FK, Sundberg H, Murison R, (2012). Long-term effects of footshock and social defeat on anxiety-like behaviours in rats: Relationships to pre-stressor plasma corticosterone concentration. *Stress* 15:658–670.
- Klavir O, Genud-Gabai R, Paz R, (2013). Functional connectivity between amygdala and cingulate cortex for adaptive aversive learning. *Neuron* 80:1290–1300.
- Klüver H, Bucy P, (1937). Psychic blindness and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 119:352–353.
- Koenigs M, Huey ED, Raymond V, Cheon B, Solomon J, Wassermann EM, Grafman J, (2008). Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. *Nat Neurosci* 11:232–237.
- Koenigs M, Grafman J, (2009). Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. *Neuroscientist* 15:540–548.
- Kolb B, Whishaw IQ, (1998). Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol* 49:43–64.
- Korem N, Akirav I, (2014). Cannabinoids prevent the effects of a footshock followed by situational reminders on emotional processing. *Neuropsychopharmacology* 39:2709–2722.
- Kosten TR, Mason JW, Giller EL, Ostroff RB, Harkness L, (1987). Sustained urinary norepinephrine and epinephrine elevation in post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 12:13–20.
- Kozak R, Bowman EM, Latimer MP, Rostron CL, Winn P, (2005). Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats impair performance on a test of sustained attention. *Exp Brain Res* 162:257–264.
- Kozak R, Bruno JP, Sarter M, (2006). Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cereb Cortex* 16:9–17.
- Krettek JE, Price JL, (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178:255–280.
- Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R, (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169:215–233.

- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N, (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95–125.
- Lahti AC, (1995). Subanesthetic Doses of Ketamine Stimulate Psychosis in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13:9–19.
- Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA, (1995). Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia.
- Lahti AC, Weiler MA, Michaelidis T, Parwani A, Tamminga CA, (2001). Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25:455–467.
- LaLumiere RT, McGaugh JL, (2005). Memory enhancement induced by post-training intrabasolateral amygdala infusions of β -adrenergic or muscarinic agonists requires activation of dopamine receptors: Involvement of right, but not left, basolateral amygdala. *Learn Mem* 12:527–532.
- Laplante F, Srivastava LK, Quirion R, (2004). Alterations in dopaminergic modulation of prefrontal cortical acetylcholine release in post-pubertal rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *J Neurochem* 89:314–323.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH, (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:193–207.
- Lebow M, Neufeld-Cohen A, Kuperman Y, Tsoory M, Gil S, Chen A, (2012). Susceptibility to PTSD-like behavior is mediated by corticotropin-releasing factor receptor type 2 levels in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* 32:6906–6916.
- LeDoux JE, (1995). Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* 46:209–235.
- LeDoux JE, (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155–184.
- Ledoux JE, (2003). The Emotional Brain , Fear , and the Amygdala. *Cell molecukar Neurobiol* 23:727–738.
- LeDoux JE, (2007). The amygdala. *Curr Biol* 17:868–874.
- Lee EHY, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC, (2003). Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci* 18:2842–2852.
- Lefkowitz RJ, (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25:413–422.
- Leger M, Bouet V, Freret T, Darmaillacq AS, Dacher M, Dauphin F, Boulouard M, Schumann-Bard P, (2012). Environmental enrichment improves recent but not

- remote memory in association with a modified brain metabolic activation profile in adult mice. *Behav Brain Res* 228:22–29.
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L, (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* 163:78–90.
- Lehmann ML, Herkenham M, (2011). Environmental Enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci* 31:6159–6173.
- Leonard CM, (1969). The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res* 12:321–343.
- Lewis DA, Lund JS, (1990). Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: Corticotropin-releasing factor-and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol* 293:599–615.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW, (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312–324.
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G, (2006). Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med* 12:1016–1022.
- Liang Z, King J, Zhang N, (2014). Neuroplasticity to a single-episode traumatic stress revealed by resting-state fMRI in awake rats. *Neuroimage* 103:485–491.
- Liberzon I, Krstov M, Young EA, (1997). Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 22:443–453.
- Liberzon I, Abelson JL, Flagel SB, Raz J, Young EA, (1999). Neuroendocrine and psychophysiological responses in PTSD: a symptom provocation study. *Neuropsychopharmacology* 21:40–50.
- Liberzon I, Khan S, Young EA, (2005). Animal models of posttraumatic stress disorder. In: *Handbook of stress and the brain*, pp 231–250. Elsevier.
- Liberzon I, Sripada CS, (2008). The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. *Prog Brain Res* 167:151–169.
- Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Paré D, (2005). Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci* 25:7429–7437.
- Likhtik E, Paz R, (2015). Amygdala–prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. *Trends Neurosci* 38:158–166.
- Linden DE, (2006). How psychotherapy changes the brain – the contribution of functional neuroimaging. *Mol Psychiatry* 11:528–538.

- Livak KJ, Schmittgen TD, (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402–408.
- Livneh U, Paz R, (2012). Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. *Neuron* 75:133–142.
- Louvard H, Maccari S, Ducrocq F, Thomas P, Darnaudéry M, (2005). Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology* 30:316–324.
- Louvard H, Maccari S, Lesage J, Léonhardt M, Dickes-Coopman A, Darnaudéry M, (2006). Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 31:92–99.
- Louvard H, Maccari S, Vaiva G, Darnaudéry M, (2009). Prenatal stress exacerbates the impact of an aversive procedure on the corticosterone response to stress in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:786–790.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE, (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65:209–237.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C, (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434–444.
- Ma S, Morilak DA, (2005). Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *J Neuroendocrinol* 17:22–28.
- Maley BE, Engle MG, Humphreys S, Vascik DA, Howes KA, Newton BW, Elde RP, (1990). Monoamine synaptic structure and localization in the central nervous system. *J Electron Microscop Tech* 15:20–33.
- Maren S, Quirk GJ, (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844–852.
- Mark GP, Rada PV, Shors TJ, (1996). Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience* 74:767–774.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C, (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807.
- Martín R, Bajo-Grañeras R, Moratalla R, Perea G, Araque A, (2015). Glial cell signaling. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349:730–734.

- Mascagni F, McDonald AJ, (2009). Parvalbumin-immunoreactive neurons and GABAergic neurons of the basal forebrain project to the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 160:805–812.
- Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Ostroff RB, Podd L, (1986). Urinary free-cortisol levels in posttraumatic stress disorder patients. *J Nerv Ment Dis* 174:145–149.
- McBain CJ, Fisahn A, (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11–23.
- McCune SK, Voigt MM, Hill JM, (1993). Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience* 57:143–151.
- McDonald AJ, (1982). Cytoarchitecture of the Central Amygdaloid Nucleus of the Rat. *J Comp Neurol* 418:401–418.
- McDonald AJ, (1992). Projection neurons of the basolateral amygdala: A correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull* 28:179–185.
- McDonald AJ, Mascagni F, Guo L, (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71:55–75.
- McDonald AJ, (1998). Cortical pathway to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55:257–332.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W, (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 66:1121–1188.
- McEwen BS, (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172–189.
- McEwen BS, (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583:174–185.
- McEwen BS, Gray JD, Nasca C, (2015). Recognizing resilience: learning from the effects of stress on the brain. *Neurobiol Stress* 1:1–11.
- McGaugh JL, (2000). Memory-a century of consolidation. *Science* (80) 287:248–251.
- McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE, (2002). Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem* 78:539–552.
- McGaugh JL, Roozendaal B, (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12:205–210.

- McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL, (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci* 16:1223–1226.
- McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL, (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann NY acad sci* 985:273–293.
- McKernan RM, Whiting PJ, (1996). Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19:139–143.
- McKlveen JM, Myers B, Flak JN, Bundzikova J, Solomon MB, Seroogy KB, Herman JP, (2013). Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol Psychiatry* 74:672–679.
- McKlveen JM, Myers B, Herman JP, (2015). The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. *J Neuroendocrinol* 27:446–456.
- McLaughlin RJ, Hill MN, Gorzalka BB, (2014). A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 42:116–131.
- McOmish CE, Hannan AJ, (2007). Enviromimetics: exploring gene environment interactions to identify therapeutic targets for brain disorders. *Expert Opin Ther Targets* 11:899–913.
- Meaney MJ, Aitken DH, (1985). [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 328:176–180.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, Weinberger DR, Berman KF, (2002). Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* 5:267–271.
- Meyer-Lindenberg A, (2010). From maps to mechanisms through neuroimaging of schizophrenia. *Nature* 468:194–202.
- Mikics E, Baranyi J, Haller J, (2008a). Rats exposed to traumatic stress bury unfamiliar objects--a novel measure of hyper-vigilance in PTSD models? *Physiol Behav* 94:341–348.
- Mikics E, Tóth M, Varjú P, Gereben B, Liposits Z, Ashaber M, Halász J, Barna I, Farkas I, Haller J, (2008b). Lasting changes in social behavior and amygdala function following traumatic experience induced by a single series of foot-shocks. *Psychoneuroendocrinology* 33:1198–1210.
- Milad MR, Quirk GJJ, (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70–74.

- Milad MR, Rauch SL, Pitman RK, Quirk GJ, (2006). Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol* 73:61–71.
- Millhouse OE, (1986). The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol* 247:246–271.
- Mitra R, Ferguson D, Sapolsky RM, (2009). Mineralocorticoid receptor overexpression in basolateral amygdala reduces corticosterone secretion and anxiety. *Biol Psychiatry* 66:686–690.
- Mizrahi R, Addington J, Rusjan PM, Suridjan I, Ng A, Boileau I, Pruessner JC, Remington G, Houle S, Wilson AA, (2012). Increased stress-induced dopamine release in psychosis. *Biol Psychiatry* 71:561–567.
- Mlynarik M, Johansson BB, Jezova D, (2004). Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 1018:273–280.
- Moghaddam B, (2002). Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51:775–787.
- Moghaddam B, (2013). A mechanistic approach to preventing schizophrenia in at-risk individuals. *Neuron* 78:1–3.
- Mohajeri MH, Leuba G, (2009). Prevention of age-associated dementia. *Brain Res Bull* 80:315–325.
- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N, (2002). Environmental enrichment and the brain. *Progress in Brain Research*, pp 109–133.
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D, (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423–431.
- Mora F, Myers R, (1977). Brain self-stimulation: direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex. *Science* (80) 197:1387–1389.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A, (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 55:78–88.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body–brain integration. *Brain Res* 1476:71–85.
- Moreno N, González A, (2003). Hodological characterization of the medial amygdala in anuran amphibians. *J Comp Neurol* 466:389–408.

- Moreno N, González A, (2007). Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *J Anat* 211:151–163.
- Morgan MA, LeDoux JE, (1995). Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci* 109:681–688.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO, (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1214–1224.
- Morina N, Wicherts JM, Lobbrecht J, Priebe S, (2014). Remission from post-traumatic stress disorder in adults: a systematic review and meta-analysis of long term outcome studies. *Clin Psychol Rev* 34:249–255.
- Morrison JH, Molliver ME, Grzanna R, (1979). Noradrenergic innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions. *Science* 205:313–316.
- Moser M, Trommald M, Egeleand T, Andersen P, (1997). Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 380:373–381.
- Mueller D, Porter JT, Quirk GJ, (2008). Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci* 28:369–375.
- Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ, (2007). Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol* 505:314–335.
- Mullis KB, (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48:579–582.
- Murison R, Overmier JB, (1998). Comparison of different animal models of stress reveals a non-monotonic effect. *Stress Int J Biol Stress* 2:227–230.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP, (2012). Neural regulation of the stress response: The many faces of feedback. *Cell Mol Neurobiol* 32:683–694.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP, (2014). Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Front Neuroendocrinol* 35:180–196.
- Nicholas AP, Pieribone VA, Hökfelt T, (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: An in situ hybridization study. *Neuroscience* 56:1023–1039.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS, (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569–578.

- Nisenbaum LK, Zigmond J, 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* 11:1478–1484.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ, (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697–709.
- Nowak K, Meyza K, Nikolaev E, Hunt MJ, Kasicki S, (2012). Local blockade of NMDA receptors in the rat prefrontal cortex increases c-Fos expression in multiple subcortical regions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 72:207–218.
- O'Donnell T, Hegadoren KM, Coupland NC, (2004). Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 50:273–283.
- O'Neill KA, Liebman JM, (1987). Unique behavioral effects of the NMDA antagonist, CPP, upon injection into the medial pre-frontal cortex of rats. *Brain Res* 435:371–376.
- Olaya B, Alonso J, Atwoli L, Kessler RC, Vilagut G, Haro JM, (2015). Association between traumatic events and post-traumatic stress disorder: results from the ESEMeD-Spain study. *Epidemiol Psychiatr Sci* 24:172–183.
- Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Araque A, Sousa N, (2015). Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci* 38:535–549.
- 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* 70:441–448.
- Orsini CA., Maren S, (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1773–1802.
- Pabba M, (2013). Evolutionary development of the amygdaloid complex. *Front Neuroanat* 7:27.
- 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* 45:354–360.
- Pape H, Paré D, (2010). Pastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 90:419–463.
- Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE, (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1–9.

- Parker KJ, Buckmaster CL, Schatzberg AF, Lyons DM, (2006). Maternal mediation, stress inoculation, and the development of neuroendocrine stress resistance in primates. *PNAS* 103:3000–3005.
- Paschalis A, Churchill L, Marina N, Kasymov V, Gourine A, Ackland G, (2009). Beta1-Adrenoceptor distribution in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 458:84–88.
- Paxinos G, Watson C, (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Third edition. New York: Academic Press.
- Peña Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM, (2009). Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:1390–1404.
- Pérez de la Mora M, Ferré S, Fuxe K, (1997). GABA-dopamine receptor-receptor interactions in neostriatal membranes of the rat. *Neurochem Res* 22(8):1051–1054.
- Petrovich GD, Swanson LW, (1997). Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Res* 763:247–254.
- Pezze MA, Feldon J, (2004). Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 74:301–320.
- Phelps EA, LeDoux JE, (2005). Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron* 48:175–187.
- Phillips LK, Seidman LJ, (2008). Emotion processing in persons at risk for schizophrenia. *Schizophr Bull* 34:888–903.
- Phillips RG, LeDoux JE, (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.
- Pijlman FT, van Ree JM, (2002). Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. *Behav Brain Res* 136:365–373.
- Pijlman FT, Wolterink G, Van Ree JM, (2003). Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats.
- Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE, (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517–523.
- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A, (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369–391.

- Pitman RK, Orr SP, (1990). Twenty-four hour urinary cortisol and catecholamine excretion in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 27:245–247.
- Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, Milad MR, Liberzon I, (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci* 13:769–787.
- Prager EM, Johnson LR, (2009). Stress at the Synapse: Signal Transduction Mechanisms of Adrenal Steroids at Neuronal Membranes. *Sci Signal*.
- Preuss TM, (1995). Do Rats Have Prefrontal Cortex? *J Cogn Neurosci* 7:1–24.
- Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, Engelien W, Epstein J, Yang Y, Gorman J, LeDoux JA, Silbersweig D, Stern E, (2005). Differential time courses and specificity of amygdala activity in posttraumatic stress disorder subjects and normal control subjects. *Biol Psychiatry* 57:464–473.
- Pryce CR, (2008). Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. *Brain Res Rev* 57:596–605.
- Przybylski J, Roullet P, Sara SJ, (1999). Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623–6628.
- Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL, (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci* 94:14048–14053.
- Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL, (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res* 808:134–140.
- Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Paré D, (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci* 23:8800–8807.
- Quirk GJ, Beer JS, (2006). Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723–727.
- Quirk GJ, Mueller D, (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE, (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967–12976.

- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE, (2009). A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29:7330–7340.
- Radley JJ, (2012). Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. *Front Behav Neurosci* 6:1–10.
- Radley JJ, Anderson RM, Hamilton BB, Alcock JA, Romig-Martin SA, (2013). Chronic stress-induced alterations of dendritic spine subtypes predict functional decrements in and hypothalamo-pituitary-adrenal-inhibitory prefrontal circuit. *J Neurosci* 33:14379–14391.
- 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.
- Ragozzino ME, (2002). The effects of dopamine D1 receptor blockade in the prelimbic-infralimbic areas on behavioral flexibility. *Learn Mem* 9:18–28.
- Rainbow TC, Parsons B, Wolfe BB, (1984). Quantitative autoradiography of b1- and b2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1585–1589.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ, (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238–244.
- Raskind MA, Peskind ER, Kanter ED, Petrie EC, Radant A, Thompson CE, Dobie DJ, Hoff D, Rein RJ, Straits-Tröster K, Thomas RG, McFall MM, (2003). Reduction of nightmares and other PTSD symptoms in combat veterans by prazosin: a placebo-controlled study.
- Rasmussen DD, Crites NJ, Burke BL, (2008). Acoustic startle amplitude predicts vulnerability to develop post-traumatic stress hyper-responsivity and associated plasma corticosterone changes in rats. *Psychoneuroendocrinology* 33:282–291.
- Rauch SL, Shin LM, Phelps EA, (2006). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research-past, present, and future. *Biol Psychiatry* 60:376–382.
- Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV, (1990). Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. *J Comp Neurol* 294:262–280.
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J, (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28:207–227.

- Reul JM, De Kloet ER, (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505–2511.
- Robbins TW, (2005). Chemistry of the mind: neurochemical modulation of prefrontal cortical function. *J Comp Neurol* 493:140–146.
- Robbins TW, Roberts AC, (2007). Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cereb Cortex* 17:i151–i160.
- Robinson TE, Justice JB, (1991). *Microdialysis in the neurosciences*. Amsterdam: Elsevier.
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM, (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32:289–313.
- Ronzoni G, Del Arco A, Mora F, Segovia G, (2014). Changes of noradrenergic activity in the amygdala of the rat contribute to hyperarousal after an acute traumatic event. *FENS Abstr* 7:1766.
- Roosendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL, (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adenoreceptor-cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* 15:553–560.
- Roosendaal B, Okuda S, De Quervain DJ, McGaugh JL, (2006a). Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing defferent memory functions. *Neuroscience* 138:901–910.
- Roosendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL, (2006b). Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6741–6746.
- Roosendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL, (2008). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 90:576–579.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S, (2009a). Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423–433.
- Roosendaal B, McReynolds JR, Van der Zee EA, Lee S, McGaugh JL, McIntyre CK, (2009b). Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. *J Neurosci* 29:14299–14308.
- Roosendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA, (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 30:5037–5046.
- Roosendaal B, McGaugh JL, (2011). Memory modulation. *Behav Neurosci* 125:797–824.

- Rosen JB, Fanselow MS, Young SL, Sircoske M, Maren S, (1998). Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res* 796:132–142.
- Rosenkranz JA, Grace AA, (2002). Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22:324–337.
- Rosenkranz JA, Moore H, Grace AA, (2003). The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J Neurosci* 23:11054–11064.
- Rosenzweig MR, (2003). Effects of differential experience on the brain and behavior. *Dev Neuropsychol* 24:523.
- Rosner W, (1990). The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: Recent advances. *Endocr Rev* 11:80–91.
- Rozeske RR, Valerio S, Chaudun F, Herry C, (2015). Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain Behav* 14:22–36.
- Ruffolo RR, Bondinell W, Hieble JP, (1995). Alpha- and beta-adrenoceptors: from the gene to the clinic. 2. Structure-activity relationships and therapeutic applications. *J Med Chem* 38:3681–3716.
- Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Müller HJ, Grunze H, (2006). A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 59:721–729.
- Sadikot AF, Parent A, (1990). The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: An immunohistochemical study. *Neuroscience* 36:431–447.
- Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J, (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803–834.
- Sah R, Geraciotti TD, (2013). Neuropeptide Y and posttraumatic stress disorder. *Mol Psychiatry* 18:646–655.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163–166.
- Sale A, Maya-Vetancourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L, (2007). Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* 10:679–681.
- Sale A, Berardi N, Maffei L, (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci* 32:233–239.

- Sandi C, Venero C, Guaza C, (1996). Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8:794–800.
- Sandi C, Pinelo-Nava T, (2007). Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast*:1–20.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS, (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6174–6177.
- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H, (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209–224.
- Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS, (2012). Stress effects on memory: an update and integration. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1740–1749.
- Segovia G, Porras A, Mora F, (1997). Effects of 4-aminopyridine on extracellular concentrations of glutamate in striatum of the freely moving rat. *Neurochem Res* 22:1491–1497.
- Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F, (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull* 70:8–14.
- Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F, (2008a). Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res* 187:304–311.
- Segovia G, Del Arco A, Garrido P, De Blas M, Mora F, (2008b). Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochem Int* 52:1198–1203.
- Segovia G, Del Arco A, Mora F, (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm* 116:1007–1016.
- Selye H, (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *CanMedAssocJ* 115:53–56.
- 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* 38:539–546.
- Shah AA, Treit D, (2003). Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res* 969:183–194.
- Shin LM, Orr SP, Carson M, Rauch SL, Macklin ML, Lasko NB, Peters PM, Metzger LJ, Dougherty DD, Cannistraro PA, Alpert NM, Fischman AJ, Pitman RK, (2004).

- Regional cerebral blood flow in the amygdala and medial prefrontal cortex during traumatic imagery in male and female Vietnam veterans with PTSD. *Arch Gen Psychiatry* 61:168.
- Shin LM, Wright CI, Cannistraro PA, Wedig MM, McMullin K, Martis B, Macklin ML, Lasko NB, Cavanagh SR, Krangel TS, Orr SP, Pitman RK, Whalen PJ, Rauch SL, (2005). A functional magnetic resonance imaging study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62:273–281.
- Shin LM, Rauch SL, Pitman RK, (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071:67–79.
- Siegmund A, Wotjak CT, (2007a). A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res* 41:848–860.
- Siegmund A, Wotjak CT, (2007b). Hyperarousal does not depend on trauma-related contextual memory in an animal model of Posttraumatic Stress Disorder. *Physiol Behav* 90:103–107.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ, (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529–538.
- Simpson J, Kelly JP, (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats- behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 222:246–264.
- Sines J, Eagleton G, (1961). Dominant behavior and weight loss following water deprivation in normal rats and rats susceptible to stomach lesions. *Psychol Rep* 9:3–6.
- Soliman A, O’Driscoll GA, Pruessner J, Holahan ALV, Boileau I, Gagnon D, Dagher A, (2008). Stress-induced dopamine release in humans at risk of psychosis: a [¹¹C]raclopride PET study. *Neuropsychopharmacology* 33:2033–2041.
- Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M, (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci* 105:17145–17150.
- Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH, (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 26:113–135.
- Sotres-Bayon F, Bush DE, LeDoux JE, (2004). Emotional Perseveration: An Update on Prefrontal-Amygdala Interactions in Fear Extinction. *Learn Mem* 11:525–535.
- Sotres-Bayon F, Quirk GJ, (2010). Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231–235.

- Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado E, Quirk GJ, (2012). Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs. *Neuron* 76:804–812.
- Southwick SM, Krystal JH, Morgan C a, Johnson D, Nagy LM, Nicolaou A, Heninge GR, Charney DS, (1993). Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50:266–274.
- Southwick SM, Morgan CA, Bremner D, Grillon CG, Krystal JH, Nagy LM, Charney DS, (1997). Noradrenergic alterations in posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 821:125–141.
- Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA, Arnsten A, Charney DS, (1999a). Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46:1192–1204.
- Southwick SM, Morgan CA, Charney DS, High JR, (1999b). Yohimbine use in a natural setting: effects on posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46:442–444.
- Stam R, Bruijnzeel a W, Wiegant VM, (2000). Long-lasting stress sensitisation. *Eur J Pharmacol* 405:217–224.
- Stam R, van Laar TJ, Akkermans LMA, Wiegant VM, (2002). Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation. *Behav Brain Res* 132:69–76.
- Stam R, (2007a). PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 2: animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 31:558–584.
- Stam R, (2007b). PTSD and stress sensitisation: a tale of brain and body Part 1: human studies. *Neurosci Biobehav Rev* 31:530–557.
- Steckler T, Risbrough V, (2012). Pharmacological treatment of PTSD - Established and new approaches. *Neuropharmacology* 62:617–627.
- Stein DJ, Ipser JC, Seedat S, (2006). Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane database Syst Rev*:CD002795.
- Stein MB, Kerridge C, Dimsdale JE, Hoyt DB, (2007). Pharmacotherapy to prevent PTSD: Results from a randomized controlled proof-of-concept trial in physically injured patients. *J Trauma Stress* 20:923–932.
- Stevens JR, (1973). An Anatomy of Schizophrenia? *Arch Gen Psychiatry* 29:177–189.
- Strawn JR, Geraciotti TD, (2008). Noradrenergic dysfunction and the psychopharmacology of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 25:260–271.

- Sullivan RM, Gratton AA, (1999). Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* 19:2834–2840.
- Sullivan RM, Gratton AA, (2002). Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for the psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27:99–114.
- Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y, (2002). Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114:769–779.
- Swanson LW, Petrovich GD, (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323–331.
- Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A, (2010). The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry* 15:905–917.
- Takahata R, Moghaddam B, (1998). Glutamatergic regulation of basal and stimulus-activated dopamine release in the prefrontal cortex. *J Neurochem* 71:1443–1449.
- Takahata R, Moghaddam B, (2003). Activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex sustains the motoric and dopaminergic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 28:1117–1124.
- Tanaka T, Yokoo H, Mizoguchi K, Yoshida M, Tsuda A, Tanaka M, (1991). Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebral microdialysis. *Brain Res* 544:174–176.
- Tavares RF, Corrêa FMA, Resstel LB, (2009). Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87:2601–2607.
- Taylor SF, Liberzon I, Decker LR, Koeppe RA, (2002). A functional anatomic study of emotion in schizophrenia. *Schizophr Res* 58:159–172.
- Taylor SF, Luan Phan K, Britton JC, Liberzon I, (2005). Neural response to emotional salience in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 30:984–995.
- Thierry AM, Tassin JP, Blanc G, Glowinski J, (1976). Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature* 263:242–244.
- Thierry AM, Godbout R, Mantz J, Glowinski J, (1990). Influence of the ascending monoaminergic systems on the activity of the rat prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 85:357–364.
- Thompson JL, Pogue-Geile MF, Grace AA, (2004). Developmental pathology, dopamine, and stress: a model for the age of onset of schizophrenia symptoms. *Schizophr Bull* 30:875–900.

- Torrey EF, Peterson MR, (1974). Schizophrenia and the limbic system. *Lancet* 2:942–946.
- Tsuda A, Tanaka M, Ida Y, Tsujimaru S, Ushijima I, Nagasaki N, (1986). Effects of preshock experience on enhancement of rat brain noradrenaline turnover induced by psychological stress. *Pharmacol Biochem Behav* 24:115–119.
- Turner BH, Herkenham M, (1991). Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. *Journal of Comparative Neurology* 313:295–325.
- Tzschentke TM, Schmidt WJ, (2000). Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol* 14:131–142.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP, (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397–409.
- Uylings HB, Van Eden CG, (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and primates, including humans. pp 31–62. Amsterdam: Elsevier.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B, (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146:3–17.
- Vaiva G, Ducrocq F, Jezequel K, Averland B, Lestavel P, Brunet A, Marmar CR, (2003). Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol Psychiatry* 54:947–949.
- 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* 52:945–951.
- Van Dijken HH, Van Der Heyden JA, Mos J, Tilders FJ, (1992b). Inescapable Footshocks induce progressive and long-lasting behavioral changes in male rats. *Physiol Behav* 51:787–794.
- Van Dijken HH, de Goeij DC, Sutanto W, Mos J, De Kloet ER, Tilders FJ, (1993). Shot inescapable stress produces long-lasting changes in the brain pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 58:57–64.
- Van Marle HJ, Hermans EJ, Qin S, Overeem S, Fernández G, (2013). The effect of exogenous cortisol during sleep on the behavioral and neural correlates of emotional memory consolidation in humans. *Psychoneuroendocrinology* 38:1639–1649.
- Van Os J, Kenis G, Rutten BP, (2010). The environment and schizophrenia. *Nature* 468:203–211.

- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH, (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191–198.
- 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* 34:1095–1105.
- Varela JA, Wang J, Christianson JP, Maier SF, Cooper DC, (2012). Control over stress, but not stress per se increases prefrontal cortical pyramidal neuron excitability. *J Neurosci* 32:12848–12853.
- Veening JG, Swanson LW, Sawchenko PE, (1984). The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res* 303:337–357.
- Venero C, Borrell J, (1999). Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: A microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci* 11:2465–2473.
- Vertes RP, (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vertes RP, (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ, (2006). Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13:728–733.
- Wang HX, Gao WJ, (2009). Cell Type-Specific Development of NMDA receptors in the interneurons of rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 34:2028–2040.
- Wang Q, Yu K, Wang J, Lin H, Wu Y, Wang W, (2012). Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal steroid receptors in rat. *Behav Brain Res* 230:167–174 .
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG, Schertler GFX, (2008). Structure of a Beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454:486–491.
- Weidenfeld J, Itzik A, Feldman S, (1997). Effect of glucocorticoids on the adrenocortical axis responses to electrical stimulation of the amygdala and the ventral noradrenergic bundle. *Brain Res* 754:187–194.
- Weinberg MS, Johnson DC, Bhatt AP, Spencer RL, (2010). Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation. *Neuroscience* 168:744–756.

- Wilensky AE, Schafe GE, LeDoux JE, (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci* 20:7059–7066.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS, (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376:572–575.
- Williams CL, Men D, Clayton EC, Gold PE, (1998). Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behav Neurosci* 112:1414–1422.
- Williams LM, Das P, Harris AW, Liddell BB, Brammer MJ, Olivieri G, Skerrett D, Phillips ML, David AS, Peduto A, Gordon E, (2004). Dysregulation of arousal and amygdala-prefrontal systems in paranoid schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161:480–489.
- Wilson CB, McLaughlin LD, Ebenezer PJ, Nair AR, Francis J, (2014). Valproic acid effects in the hippocampus and prefrontal cortex in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Behav Brain Res* 268:72–80.
- Wingenfeld K, Whooley MA, Neylan TC, Otte C, Cohen BE, (2015). Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-h urinary catecholamines and cortisol: Results from the Mind Your Heart Study. *Psychoneuroendocrinology* 52:83–91
- Wolff SBE, Gründemann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson G, Müller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ, Lüthi A, (2014). Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature* 509:453–458.
- Wood DA, Siegel AK, Rebec G V, (2006). Environmental enrichment reduces impulsivity during appetitive conditioning. *Physiol Behav* 88:132–137.
- Yadid G, Pacak K, Kopin IJ, Goldstein DS, (1993). Modified microdialysis probe for sampling extracellular fluid and administering drugs in vivo. *Am J Physiol* 265:1205–1211.
- Yang CR, Chen L, (2005). Targeting prefrontal cortical dopamine D1 and N-Methyl-D-Aspartate receptor interactions in Schizophrenia treatment. *Neurosci* 11:452–470.
- Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, Liberzon I, (2009). Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 26:1110–1117.
- Yang F-C, Liang KC, (2014). Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 112:186–194.
- Yassa MA., Stark CE, (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci* 34:515–525.

- Yehuda R, Antelman SM, (1993). Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 33:479–486.
- Yehuda R, (2002). Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am* 25:341–368.
- Yehuda R, Golier JA, Halligan SL, Meaney M, Bierer LM, (2004a). The ACTH response to dexamethasone in PTSD. *Am J Psychiatry* 161:1397–1403.
- Yehuda R, Halligan SL, Golier JA., Grossman R, Bierer LM, (2004b). Effects of trauma exposure on the cortisol response to dexamethasone administration in PTSD and major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 29:389–404.
- Yehuda R, (2006a). Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications. In: *Annals of the NY Academy of Sciences*, pp 137–166.
- Yehuda R, Brand S, Yang RK, (2006b). Plasma neuropeptide Y concentrations in combat exposed veterans: Relationship to trauma exposure, recovery from PTSD, and coping. *Biol Psychiatry* 59:660–663.
- Yehuda R, (2009) Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. *Ann NY Acad Sci* 1179:56–69.
- Zaborszky L, Gaykema RP, Swanson DJ, Cullinan WE, (1997). Cortical input to the basal forebrain. *Neuroscience* 79:1051–1078.
- Zanassi P, Paolillo M, Montecucco A, Avvedimento EV, Schinelli S, (1999). Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res* 58:544–552.
- Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H, (2001). Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 121:11–20.

